



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

“Francisco García Salinas”

Unidad Académica de Ciencias Químicas

Maestría en Ciencia y Tecnología Química

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología Química

**Análisis de secuencias de ADN del Virus del Papiloma Humano en
muestras de tejido mamario**

Presenta:

Q.F.B. Erika Maldonado Rodríguez

Directores:

Dra. en C. Irma Elizabeth González Curiel

Dr. Adrián López Saucedo

Dr. en C. Jorge Luis Ayala Luján

Junio 2021

DEDICATORIA

A mi Dios Jesucristo, a quien le debo todo lo que tengo y todo lo que soy, que me da sabiduría, entendimiento y conocimiento, por su infinita bondad, que me acompaña y siempre me levanta.

A mi hermano que aunque ya no está con nosotros siempre será mi inspiración.

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy actualmente. A mi madre, por ayudarme a construir mis sueños, pues sin ella no lo hubiera logrado, por sus consejos, apoyo incondicional y paciencia.

A mi familia y amigos quienes me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular (LPDM), Unidad Académica de Ciencias Químicas, Campus UAZ-Siglo XXI, Carretera Zacatecas-Guadalajara. Km. 6, Ejido “La Escondida”, C.P. 98160, Zacatecas, Zac. Contando con recursos financieros propios del Laboratorio. Bajo la dirección del Dr. en C. Jorge Luis Ayala Luján, el Dr. Adrián López Saucedo y la Dra. en C. Irma Elizabeth González Curiel.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría otorgada con número de registro 936950.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Marisa Hernández Barrales y al Dr. en C. Jorge Luis Ayala Luján, por la confianza que depositaron en mí, por su gran disposición, por el tiempo y esfuerzo que dedicaron para compartir sus conocimientos, por sentar en mi bases de disciplina, honestidad intelectual y perseverancia, por sus correcciones en mi labor científica y por su motivación que ha sido fundamental para mi formación.

Al Dr. Adrián López Saucedo por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimientos.

A la Dra. en C. Irma Elizabeth González Curiel, por sus contribuciones, además de sentar bases de responsabilidad en mí y deseos de superación.

Al M. en MA. Adrián Reyes López por sus valiosos conocimientos, aportes y orientaciones.

Al Ht Ricardo Villalobos por instruirme en el aprendizaje de varias metodologías, así como permitirme realizar algunos procesos en su espacio de trabajo, Laboratorio de Patología de la Clínica No. 1 del IMSS.

A mis compañeros de laboratorio Sanjuana, César, Eleazar, los Ángeles, Violeta, Mariana, Satzy, Odalys, Erick, Esme, Alejandro y Eddie con quien conviví en diferentes periodos de tiempo, pero que gracias a su compañerismo y amistad hicieron más amena mi estancia en el laboratorio. Especialmente agradezco a Susie y Mithzia por instruirme en técnicas experimentales, por su apoyo incondicional y por sonreír por mis logros.

A todos mis compañeros de la MCyTQ quien tuve el placer de conocer, especialmente a Alejandra y Nancy por su amistad y apoyo. A mis compañeros de clase y ahora mis amigos Yessica, Paulina y Miguel quienes me ayudaron y motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

ÍNDICE

Contenido

Lista de tablas	iii
Lista de figuras.....	iv
Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1.- Introducción.....	3
2.-Antecedentes.....	4
2.1.-Anatomía e histología de la glandula mamaria.....	4
2.2.-Principales afecciones de la glándula mamaria	5
2.2.1.-Neoplasias benignas	5
2.2.2.-Neoplasias limítrofes.....	7
2.2.3.-Neoplasias <i>in situ</i>	7
2.2.4-Neoplasias malignas.....	7
2.3.- Cáncer de mama.....	7
2.3.1.- Clasificación del cáncer de mama.....	8
2.3.2.- Factores de riesgo en el cáncer de mama	9
2.3.3.- Virus implicados en cáncer de mama humano.....	11
2.4.-Virus del Papiloma Humano y cáncer	12
2.4.1.- Estructura del VPH	12
2.4.2.-Ciclo vital del VPH	13
2.4.3.- VPH implicado en la etiología de varios tipos de cáncer.....	17
2.5.-Evidencias de la relación del VPH en cáncer de mama.....	17
3.- Justificación	26
4.- Hipótesis	27
5.-Objetivos:	27
6.- Diseño Experimental	28
7.- Material y Métodos.....	29
7.1.- Diseño experimental	29
7.2.- Recolección de muestras.....	29

7.3.- Criterios de inclusión.....	29
7.4.- Técnica histológica y diagnóstico.....	30
7.5.- Extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina	31
7.6.- Verificación de la calidad del ADN extraído.....	32
7.6.1.-Cuantificación espectrofotométrica del ADN	32
7.6.2.- Amplificación de la región de 205 pb del gen β - globina	32
7.7.- Detección de ADN del VPH por PCR en un solo paso	33
7.7.1.-Amplificación de la región de 450 pb del gen L1 del VPH	33
7.7.2.-Amplificación de la región de 150 pb del gen L1 del VPH	33
7.8.- Detección de ADN del VPH por PCR anidada.....	34
7.8.1.-Detección de la región de 150 pb del gen L1 del VPH por PCR en tiempo real	34
7.8.2.-Precauciones para la prevención de contaminación	35
7.9.- Genotipificación del VPH.....	36
7.9.1.-Genotipificación del VPH por LCD-Array HPV-Type 3.5 (Chipron).....	36
7.9.2.-Genotipificación del VPH por PCR en tiempo real	37
7.10.- Detección de proteínas del VPH.....	37
7.11.-Análisis estadístico	38
8.- Resultados.....	39
8.1.- Clasificación histológica de los tejidos mamarios.....	39
8.2.- Análisis de la calidad del ADN extraído	46
8.3.- Detección de ADN del VPH.....	47
8.4.- Genotipificación del VPH.....	58
8.5.- Detección de proteínas del VPH en tejido mamario.....	64
9.-Discusión	66
10.-Conclusión.....	75
11.-Perspectivas	76
12.-Referencias	77
13.- Anexos.....	87
Anexo A.-Comité de bioética.....	87
Anexo B.-Comprobatorios de asistencia a congresos	88

Lista de tablas

Tabla I: Clasificación histológica según la OMS de las neoplasias mamarias (Modificada de: Eble et al. 2003).	6
Tabla II: Tipos de papillomavirus en lesiones genitales (zur Hausen 2002).	13
Tabla III A-D: Estudios positivos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.....	19
Tabla IV A-B: Estudios negativos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.....	24
Tabla V: Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación.	29
Tabla VI: Secuencia de primers y extensión en pares de bases.	35
Tabla VII: Clasificación histológica de los tejidos mamarios.	40
Tabla VIII: Identificación del VPH de acuerdo a la clasificación histológica de los tejidos mamarios.....	52
Tabla IX: Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo a la malignidad.	53
Tabla X: Relación entre el VPH y los parámetros clinicopatológicos de las biopsias mamarias	56
Tabla XI: Genotipos del VPH prevalentes en tejido mamario	59
Tabla XII: Comparación de la frecuencia de genotipos del VPH entre especímenes mamarios benignos o si alteración y malignos	60
Tabla XIII: Frecuencia de genotipos del VPH en diferentes tipos histológicos de mama malignos.....	60
Tabla XIV: Frecuencia de genotipos del VPH en diferentes tipos histológicos de mama benignos y sin alteración.....	61

Lista de figuras

Figura 1: Corte sagital de la glándula mamaria	4
Figura 2: Genoma del VPH.	14
Figura 3: Infección cervical por VPH.....	15
Figura 4: Artículos publicados entre los años 1992-2019 de evidencias de la presencia y ausencia del VPH en tejidos mamarios.....	18
Figura 5: Neoplasias mamarias malignas.	41
Figura 6: Neoplasia mamaria maligna	41
Figura 7: Neoplasia mamaria <i>in situ</i>	42
Figura 8: Neoplasia mamaria limítrofe.....	42
Figura 9: Neoplasias mamarias benignas.....	42
Figura 10: Alteraciones mamarias benignas o no neoplásicas.	43
Figura 11: Tejido mamario sin alteración.....	43
Figura 12: Frecuencia de diagnósticos histológicos en una serie de biopsias mamarias.	44
Figura 13: Frecuencia de diagnósticos por tipo histológico en una serie de biopsias mamarias.....	45
Figura 14: Amplificación del gen β -globina.....	46
Figura 15: Amplificación del gen L1 del VPH usando el par de primers GP5+/6+.....	47
Figura 16: Amplificación del gen L1 del VPH usando el par de primers MY09/11.	48
Figura 17: Amplificación del gen L1 del VPH usando el par de primers GP5+/6+ por PCR anidada.	49
Figura 18: Detección del gen L1 de VPH por PCR en tiempo real con SYBR Green.	49
Figura 19: Análisis de la curva de fusión de los productos de PCR después de la amplificación de un fragmento de 150 pb del gen L1 del VPH usando los primers GP5+/6+.	51
Figura 20: Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo al tipo histológico.....	54
Figura 21: Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo a la malignidad de las muestras mamarias.....	55
Figura 22: Genotipificación de secuencias del VPH presentes en muestras de tejido mamario por hibridación utilizando el ensayo LCD-Array HPV-Type 3.5.	62

Figura 23: Distribución y prevalencia de genotipos de alto y bajo riesgo del VPH en neoplasias malignas, benignas y alteraciones benignas mamarias.	63
Figura 24: Expresión nuclear de la proteína L1 del VPH demostrado por inmunohistoquímica.....	65

Abreviaturas

μl	Microlitros
μM	Micromolar
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFIP	Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas [De sus siglas en inglés (Armed Forces Institute of Pathology)].
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNsh	Ácido Ribonucleico de horquilla corto [De sus siglas en inglés (<i>RNA short hairpin</i>)].
ATP	Adenosín Trifosfato
BAAF	Biopsia por aspiración con aguja fina
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CK	Citoqueratina
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS	Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>
CMV	Citomegalovirus
DAB	Diaminobencidina
ddNTP	Didesoxinucleótidos
dNTP	2'-desoxinucleósido trifosfatos
EDTA	Ácido Etildiaminotetraacético
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico [De sus siglas en inglés (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)].
FCF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
GRB7	Proteína 7 Unida al Receptor del Factor de Crecimiento [De sus siglas en inglés (<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 7</i>)].
GWAS	Estudio de Asociación de Genoma Completo [De sus siglas en inglés (<i>Genome Wide Association Studies</i>)].
HER2 (erbB-2)	Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano [De sus siglas en inglés (<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)].
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer [De sus siglas en inglés (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)].
IHQ	Inmunohistoquímica
ISH	Hibridación <i>In situ</i> [De sus siglas en inglés (<i>In situ Hybridization</i>)].
Kb	Kilo bases
mM	Milimolar
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional para la información Biotecnológica [De sus siglas en inglés (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)].
nm	Nanómetros

pb	Pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino [De sus siglas en inglés (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)].
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa [De sus siglas en inglés (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)].
PCR-q	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa [De sus siglas en inglés (quantitative <i>Polymerase Chain Reaction</i>)].
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas [De sus siglas en inglés (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>)].
Rb	Proteína Retinoblastoma
RE	Receptor a Estrógenos
RP	Receptor a Progesterona
TBE	<i>Tris-Borato-EDTA</i>
TDLU	Unidad Terminal Ducto-Lobulillar [De sus siglas en inglés (<i>Terminal Ductal-Lobular Unit</i>)].
TGF-α	Factor Transformador de Crecimiento Alfa [De sus siglas en inglés (<i>Alpha Transforming Growth Factor</i>)].
Tm	Temperatura de Fusión del ADN [De sus siglas en inglés (<i>Melting Temperature</i>)].
UDG	Uracil ADN Glicosilasa [De sus siglas en inglés (<i>Uracil DNA Glycosylase</i>)].
UV	Ultravioleta
VEB	Virus de Epstein Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida
VPH	Virus del Papiloma Humano
VTMM	Virus del Tumor Mamario Murino

Resumen

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo. Múltiples factores de riesgo se han asociado con el desarrollo de esta neoplasia; sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce el origen. Los carcinógenos biológicos como las infecciones virales desempeñan un papel importante en la iniciación del cáncer y diversos estudios sugieren al Virus del Papiloma Humano (VPH) como posible factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama; sin embargo, hasta la fecha no hay datos concluyentes, por lo que se requieren estudios adicionales para explorar una asociación entre el VPH con esta neoplasia. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de ADN del VPH en tejidos mamarios con patologías tanto malignas como benignas. Un total de 116 biopsias de tejido mamario fueron clasificadas de acuerdo a su diagnóstico histopatológico. Se realizó la extracción del ADN a partir de los tejidos incluidos en parafina utilizando un kit comercial. La detección del ADN del VPH se realizó empleando dos variantes de la técnica de PCR; la técnica de PCR en un solo paso (primers GP5+/6+ y MY09/11) y el método de PCR anidada (MY09/11 externo y GP5+/6+ interno). Las muestras positivas a la amplificación del gen L1 del VPH se sometieron a genotipificación utilizando un ensayo basado en hibridación. El 46.6% de las biopsias mamarias analizadas correspondió a neoplasias malignas; siendo el carcinoma ductal infiltrante el más frecuente con un 81.5%. El fibroadenoma fue la neoplasia benigna más común (90%); mientras la mastopatía fibrosa quística representó a las alteraciones benignas no neoplásicas. Los resultados sugieren la presencia del ADN del VPH en el 26.7% (31/116) de las muestras analizadas y que su presencia fue más frecuente en alteraciones histopatológicamente no malignas. Se identificó una prevalencia inusual del genotipo de bajo riesgo VPH-42 en tejido mamario con patologías benignas, seguido del genotipo de alto riesgo VPH-31. No se identificaron genotipos de alto riesgo en tejidos mamarios diagnosticados con neoplasias malignas. No hubo correlación en el grado de malignidad, el diagnóstico clínico-patológico y el grado de diferenciación celular entre las muestras positivas y negativas para el VPH. La presencia del VPH no es suficiente para establecer una relación causal con el cáncer de mama o alguna patología mamaria; sin embargo, los resultados suscitan un gran interés en la intervención del VPH en patologías mamarias como posible copartícipe mediante una patogénesis molecular distinta a la de otras neoplasias asociadas al VPH.

Abstract

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women in the world. Multiple risk factors have been associated with the development of this neoplasm. However, in most cases, the origin is unknown. Biological carcinogens such as viral infections play an important role in cancer initiation, which is why various studies suggest Human Papillomavirus (HPV) as a possible risk factor for the development of breast cancer; however, to date, there is no conclusive data. Therefore additional studies are required to explore an association between HPV and this neoplasm. The objective of this study was to detect the presence of HPV DNA in breast tissues with malignant and benign pathologies. A total of 116 breast tissue biopsies were classified according to their histopathological diagnosis. DNA extraction from paraffin-embedded tissues was performed using a commercial kit. The detection of HPV DNA was carried out using two variants of the PCR technique; the one-step PCR (primers GP5 + / 6 + and MY09 / 11) and nested PCR (MY09 / 11 external and GP5 + / 6 + internal). Samples positive for HPV L1 gene amplification were genotyped using a hybridization-based assay. 46.6% of the analyzed mammary biopsies corresponded to malignant neoplasms; infiltrating ductal carcinoma was the most frequent with 81.5%. Fibroadenoma was the most common benign neoplasm (90%), while cystic fibrous mastopathy represented benign non-neoplastic alterations. The results suggest the presence of HPV DNA in 26.7% (31/116) of the samples analyzed and, the presence of HPV was more frequent in histopathologically non-malignant alterations. An unusual prevalence of HPV-42 low-risk genotype was identified in breast tissue with benign pathologies, followed by HPV-31 high-risk genotype. No high-risk genotypes were identified in breast tissues diagnosed with malignant neoplasms. There was no correlation in the degree of malignancy, the clinicopathological diagnosis, and the degree of cellular differentiation between the positive and negative samples for HPV. The presence of HPV in breast tissue is not enough to establish a viral etiological role in the development of breast cancer or any breast pathology. However, the results suggest interest in the intervention of HPV in breast pathologies as a possible copartner through molecular pathogenesis different from that of other HPV-associated neoplasms.

1.- Introducción

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres por cáncer en el mundo. Se estima que en el año 2020, el 15.5% (684 996) del total de muertes por cáncer, correspondieron a cáncer de mama. Además el 24.5% (2.2 millones) de casos nuevos por cáncer, fueron atribuidos a esta neoplasia (IARC. 2021). En México el cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la población femenina, ocupando el primer lugar en incidencia con 29 929 casos nuevos y se estima que más de 7 931 mujeres murieron en 2020 por esta causa (IARC. 2021). Según datos del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI) en el año 2019, en Zacatecas el cáncer de mama ocupó el primer lugar como causa de muerte en mujeres con edades de 35 a 64 años. Se estima que en ese año, de un total de 526 defunciones por tumores malignos, 87 (16.5%) se atribuyen a cáncer de mama (INEGI. 2021).

El cáncer de mama es una neoplasia que puede originarse de cualquier tejido conectivo o estructura epitelial, pero ésta última da lugar a las neoplasias mamarias más comunes, siendo el carcinoma ductal infiltrante el más frecuente. Un factor de riesgo es todo aquello que aumenta la probabilidad de desarrollar una enfermedad, tal como el cáncer, por ejemplo: antecedentes familiares, radiaciones, origen étnico e incluso agentes virales entre otros (Momenimovahed and Salehiniya 2019).

La infección persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo (oncogénicos) ha sido reconocida como un factor esencial para el desarrollo de cáncer cervical. Se ha considerado que el VPH también puede causar carcinomas de células escamosas de sitios como la vagina, la vulva, el pene, el ano y el esófago; así como algunos carcinomas de cabeza y cuello (Gupta et al. 2019). Por lo que actualmente se propone como un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Kroupis et al. 2006).

2.-Antecedentes

2.1.-Anatomía e histología de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias son glándulas sudoríparas apócrinas modificadas; compuestas de 15 a 20 lóbulos irregulares de glándulas tubuloalveolares ramificadas. Cada lóbulo está compuesto por agrupaciones en forma de racimos llamados alveolos cubierto de células secretoras y están interconectados por conductos. Los conductos intralobulillares están formados de tejido conectivo denso y en los espacios intralobulillares contiene gran cantidad de tejido adiposo.

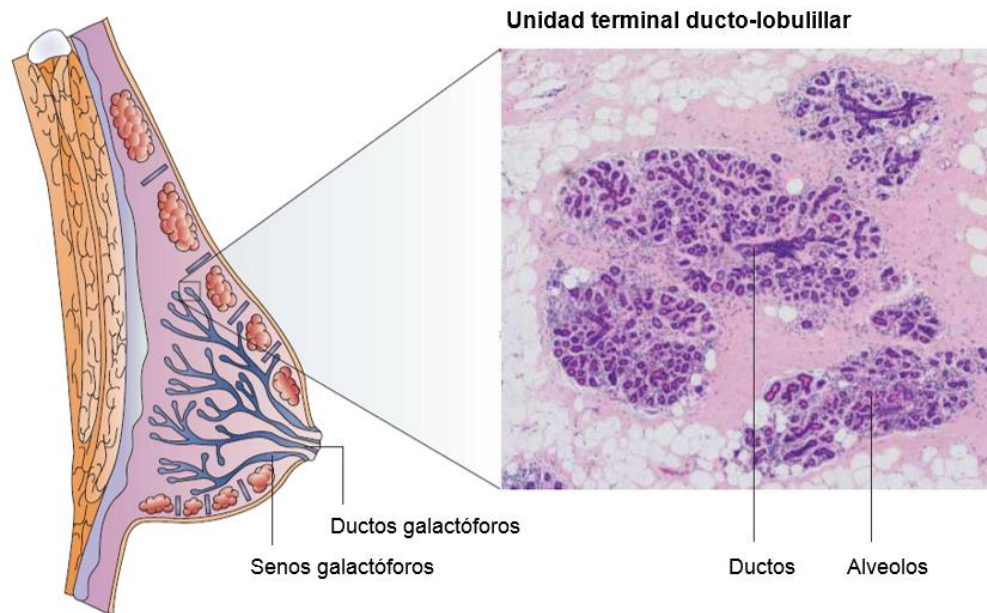


Figura 1: Corte sagital de la glándula mamaria (Modificada de: Smalley and Ashworth 2003).

Cerca del pezón los conductos mamarios se expanden para formar los senos galactóforos, donde se puede almacenar leche, antes de ser drenada a un conducto galactóforo. En sus inicios el sistema de conductos excretores posee un epitelio simple cúbico o simple cilíndrico, que luego se modifica gradualmente hasta adquirir dos capas de células cúbicas a la altura de los senos galactóforos. Cerca de su desembocadura los conductos galactóforos están revestidos de epitelio estratificado plano (Figura 1) (Smalley and Ashworth 2003; Ross and Pawlina 2007).

El sistema de ramificación ductal de la glándula mamaria desemboca en los conductos terminales con sus estructuras acinares asociadas, denominadas Unidades Ductal-Lobulillar Terminal (TDLU), junto con la grasa y el tejido fibroso interlobular. La histología de la TDLU está constituida por células luminares secretoras internas y células mioepiteliales contráctiles externas; además hay pruebas de que existan células troncales en la TDLU (Dimri, Band, and Band 2005). La superficie del pezón y areola son empujados por papilas dérmicas largas. El epitelio es estratificado plano queratinizado (Ross and Pawlina 2007).

2.2.-Principales afecciones de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias pueden sufrir diversas afecciones que van desde alteraciones no neoplásicas, neoplasias benignas, limítrofes, *in situ* y malignas (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003). La mayoría de las neoplasias mamarias se originan en el interior de los conductos o lóbulos como consecuencia de la transformación clonal de una célula (Angulo et al. 2013). Con menos frecuencia, las neoplasias mamarias pueden originarse en los tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama. La clasificación más usada es la emitida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual se muestra en la Tabla I (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003).

2.2.1.-Neoplasias benignas

Las afecciones benignas en la glándula mamaria son muy comunes, se sabe que las mujeres con este tipo de afecciones tienen un mayor riesgo de desarrollo posterior de cáncer de mama y este riesgo puede estratificarse por el grado de anomalía histológica en la biopsia benigna (Visscher et al. 2017). Los hallazgos histológicos en las neoplasias benignas comprenden un espectro muy diverso de cambios que involucran tanto el epitelio de la TDLU como los componentes del tejido conectivo o estroma que lo acompañan. Más de la mitad de las biopsias benignas en la práctica clínica se caracterizan por cambios no proliferativos, que consisten principalmente en quistes simples, fibrosis o fibroadenoma (Hartmann et al. 2005).

Tabla I: Clasificación histológica según la OMS de las neoplasias mamarias (Modificada de: Eble et al. 2003).

Neoplasias Epiteliales		Adenomas	
Carcinoma ductal invasivo, no especificado en otra parte	3	Adenoma tubular	0
Carcinoma tipo mixto		Adenoma de la lactancia	0
Carcinoma pleomórfico	3	Adenoma apócrino	0
Carcinoma con células osteoclásticas gigantes	3	Adenoma pleomórfico	0
Carcinoma con características coriocarcinomasas		Adenoma ductal	0
Carcinoma con características melanóticas			
Carcinoma lobular invasivo	3	Lesiones mioepiteliales	
Carcinoma tubular	3	Mioepiteliosis	
Carcinoma cribiforme invasivo	3	Adenosis adenomioepitelial	
Carcinoma medular	3	Adenomioepitelioma	0
Carcinoma mucinoso y otros neoplasias con abundante mucina		Mioepitelioma maligno	3
Carcinoma mucinoso	3		
Cistadenoma y carcinoma mucinosos de células columnares	3	Neoplasias mesenquimatosos	
Carcinoma de células en anillo de sello	3	Hemangioma	0
Neoplasias neuroendocrinos		Angiomatosis	
Carcinoma neuroendócrino sólido		Hemangioma pericitoma	1
Tumor carcinoide atípico	3	Hiperplasia pseudoangiomatosa del estroma	
Carcinoma de células avendoides pequeñas	3	Miofibroblasto	0
Carcinoma neuroendócrino de células grandes	3	Fibromatosis (agresiva)	1
Carcinoma papilar invasivo	3	Tumor miofibroblástico inflamatorio	1
Carcinoma micropapilar invasivo	3	Lipoma	0
Carcinoma apocrino	3	Angiolipoma	0
Carcinoma metaplásicos	3	Tumor de células granulosa	0
Carcinoma epitelial metaplásico puro	3	Neurofibroma	0
Carcinoma de células escamosas	3	Schwannoma	0
Adenocarcinoma con metástasis de células fusiformes	3	Angiosarcoma	3
Carcinoma adenoescamoso	3	Liposarcoma	3
Carcinoma mucoepidermoide	3	Rabdomyosarcoma	3
Carcinoma metaplásico mixto epitelial/mesenquimatoso	3	Osteosarcoma	3
Carcinoma rico en lípidos	3	Leiomioma	0
Carcinoma secretor	3	Leiomyosarcoma	3
Carcinoma oncócítico	3		
Carcinoma adenoide quístico	3	Neoplasias fibroepiteliales	
Carcinoma de células acinicas (acinosas)	3	Fibroadenoma	0
Carcinoma de células claras ricas en glucógeno	3	Tumor filoides	1
Carcinoma sebáceo	3	Tumor filoides benigno	0
Carcinoma inflamatorio	3	Tumor filoides "límitrofe"	1
Neoplasia lobular		Tumor filoides maligno	3
Carcinoma lobular <i>in situ</i>	2	Sarcoma del estroma periductal	3
Lesiones proliferativas intraductales		Hermartoma mamario	
Hiperplasia ductal			
Atipia epitelial plana		Neoplasias del pezón	
Hiperplasia ductal atípica		Adenoma de pezón	0
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	2	Adenoma siringomatoso	0
Carcinoma microinvasivo		Enfermedad de Paget del pezón	3
Neoplasmas papilares intraductales			
Papiloma central	0	Linfoma maligno	
Papiloma periférico	0	Linfoma difuso de células B	3
Papiloma atípico		Linfoma de Burkitt	3
Carcinoma papilar intraductal	2	Linfoma extranodal de células B tipo MALT	3
Carcinoma papilar intraquístico	2	Linfoma folicular	3
Poliferaciones epiteliales benignas			
Adenosis y sus variantes		Neoplasias metastásicos	
Adenosis esclerosante			
Adenosis apócrina		Neoplasias de la mama masculina	
Adenosis ductal		Ginecomastia	
Adenosis microglandular		Carcinoma	
Adenosis adenomioepitelial		Invasivo	3
Cicatriz radial/lesión esclerosa compleja		<i>In situ</i>	2

Código de comportamiento: 0; Neoplasia benignas, 1; Neoplasia límitrofe 2; Neoplasia *in situ* 3; Neoplasia malignas.

2.2.2.-Neoplasias limítrofes

Las neoplasias que presentan una morfología de benigna a maligna y que no poseen todas las características de malignidad se clasifican como limítrofes. Un ejemplo de ellas es el tumor filoides (Zhang and Kleer 2016), el cual basa en una combinación de varias características histológicas, incluida la celularidad estromal, la atipia nuclear, la actividad mitótica, el crecimiento excesivo del estroma y la apariencia del margen tumoral (Lakhani 2012). Sin embargo, no hay criterios definidos para los parámetros histológicos individuales, por lo que la OMS lo clasifica como benigno, limítrofe o maligno (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003).

2.2.3.-Neoplasias *in situ*

La neoplasia *in situ* es el carcinoma que no ha roto la capa basal y por ello no se ha diseminado. Existen dos tipos de carcinoma de mama no invasivo: carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Ambos tipos se originan a partir de células de la TDLU. El CDIS tiende a llenar y distorsionar espacios de tipo ductal, mientras que el CLIS normalmente expande los acinos de los lobulillos, pero sin alterarlos. Los dos tipos son asociados con un incremento en el riesgo de desarrollar carcinoma invasivo (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003).

2.2.4-Neoplasias malignas

El carcinoma de mama invasivo es un grupo de neoplasias epiteliales malignas caracterizadas por invasión hacia tejido adyacente y una tendencia a realizar metástasis a distancia. La mayoría de estas neoplasias son adenocarcinomas y se cree que son derivados de epitelio parénquima mamario, particularmente de células de la TDLU. Los carcinomas mamarios exhiben un amplio rango de fenotipos morfológicos y tipos histológicos específicos, los cuales tienen características clínicas y pronósticos particulares (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003).

2.3.- Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que presenta distintos fenotipos histológicos, moleculares y clínicos. Los sistemas de clasificación actuales utilizan diferentes marcadores clínico-patológicos y moleculares (Rakha and Green 2017). Existen varios subtipos de cáncer de mama con diferentes patrones morfológicos, de expresión genética y

pronóstico. Estos subtipos se asocian a evoluciones diferentes y en algunos casos, también a tratamientos distintos (Untch et al. 2013).

2.3.1.- Clasificación del cáncer de mama

a) Tipo histológico: Los tipos de cáncer de mama se clasifican de acuerdo a si han penetrado o no la membrana basal limitante, en carcinomas *in situ* o invasivos. Aproximadamente el 70-80% de los carcinomas mamarios corresponde a carcinoma ductal infiltrante (Provenzano, Ulaner, and Chin 2018). Este tipo también es llamado carcinoma mamario invasivo de tipo no especial (NST), por sus siglas en inglés *Invasive Breast Carcinoma of No Special Type*, el cual comprende todas las neoplasias sin las características diferenciales específicas que caracterizan a las otras categorías de cáncer de mama (Tabla I) (Sinn and Kreipe 2013; Hoon Tan et al. 2020).

Los subtipos específicos más comunes incluyen al carcinoma lobular invasivo, tubular, cribiforme, metaplásico, apócrino, mucinoso, papilar y micropapilar, así como carcinoma con características de tipo medular y neuroendocrino. Estos tipos de neoplasias específicas se definen por su morfología, pero también están vinculados a características clínicas, epidemiológicas y moleculares particulares (Sinn and Kreipe 2013; Hoon Tan et al. 2020).

b) Sistema de estadificación: la etapa o estadio del cáncer describe si la neoplasia se ha propagado y a que distancia. La etapa más temprana se identifica como etapa 0 (carcinoma *in situ*), y los demás van desde la etapa I a la IV. El sistema TNM es un sistema alternativo para determinar la estadificación del cáncer, el cual se basa en tres factores: tamaño del tumor (T), presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos (G) y presencia de metástasis a distancia (M). Una vez que se han determinado estos factores, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general. (American Joint Committee Cancer, AJCC, 2019).

c) Grado histológico: el sistema de clasificación más frecuente del cáncer de mama es el grado histológico combinado de Nottingham (modificado de Elston-Ellis del sistema de clasificación Scarff-Bloom-Richardson), también conocido como el sistema de clasificación de Nottingham (Bloom and Richardson 1957; Elston and Ellis 1991), el cual se basa en la evaluación microscópica de las características morfológicas y citológicas de las células

tumorales, incluido el grado de formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el recuento mitótico. Los puntajes asignados a cada uno de los tres factores histológicos se suman, haciendo un posible total de 3 a 9. La suma de estos puntajes estratifica a las neoplasias malignas de mama en tres grados (grado 1: bien diferenciado; grado 2: moderadamente diferenciado y grado 3: poco diferenciado) (Rakha et al. 2008).

d) *Perfil de la expresión génica*: la expresión de receptores hormonales y la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), se han identificado como factores predictivos para pacientes con cáncer de mama. Este perfil permite separar al cáncer de mama en cuatro subtipos moleculares 1) luminal A (positivo para los receptores estrógeno y progesterona, negativo a HER2); 2) luminal B (positivo para los receptores estrógeno y progesterona, sobreexpresión de HER2); 3) HER2 positivo (sobreexpresión de HER2, negativo para receptores de estrógeno y progesterona); 4) tipo basal o triple negativo (negativo para receptores de estrógeno, progesterona y para HER2) (Yersal and Barutca 2014).

2.3.2.- Factores de riesgo en el cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial (Zendehdel et al. 2018) cuya incidencia, mortalidad y tasas de supervivencia varían considerablemente entre las diferentes partes del mundo. Lo que podría deberse a factores demográficos, genéticos, hormonales, estilo de vida y ambientales (Hortobagyi et al. 2005; Momenimovahed and Salehiniya 2019).

a) *Demográficos*: el cáncer de mama es una enfermedad casi exclusiva de las mujeres. Es poco frecuente en hombres con una incidencia menor al 1% de la descrita en las mujeres (Giordano, Buzdar, and Hortobagyi 2002). Después del género, la edad también es un factor de riesgo importante (Thakur et al. 2017). La tasa de incidencia de cáncer de mama aumenta significativamente con la edad y alcanza su pico en la edad de la menopausia (Kim, Yoo, and Goodman 2015; Mahouri, Dehghani Zahedani, and Zare 2007).

b) *Genéticos*: se estima que las variantes genéticas que predisponen a la enfermedad están presentes en aproximadamente el 30% de los casos (Gannon et al. 2018; Sun et al. 2017; Brewer et al. 2017). Este componente heredado es impulsado por una combinación de variantes principalmente en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM* y *CHEK2*, que

confieren un riesgo moderado a alto de padecer la enfermedad junto con variantes comunes en más de 70 locus identificados a través de un estudio de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) (Baretta et al. 2016; Michailidou et al. 2015). Los genes BRCA1/2 codifican para proteínas supresoras de tumores cuya deficiencia conduce a la desregulación del ciclo celular. Se estima que los genes BRCA1/2 son responsables de aproximadamente el 20-25% de los casos de cáncer de mama hereditarios y del 5-10% de todos los casos de cáncer de mama (Sun et al. 2017).

c) Hormonales: los estrógenos endógenos y exógenos están relacionados con el riesgo de padecer cáncer de mama. Las principales fuentes de estrógenos exógenos son los anticonceptivos orales y la terapia de remplazo hormonal (Momenimovahed and Salehiniya 2019; Sun et al. 2017). Esto debido a que los estrógenos son agentes mitógenos (Cóppola, Nader, and Aguirre 2005). El riesgo también se incrementa por factores reproductivos como la menarquia temprana, menopausia tardía, edad avanzada en el primer embarazo, la baja paridad y la falta de lactancia materna (Mourouti et al. 2015). Se estima que cada retraso de 1 año en la menopausia, aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama a un 3%, y cada retardo de 1 año en la menarquia o cada nacimiento adicional disminuye el riesgo en un 5-10% respectivamente (Sun et al. 2017).

d) Estilo de vida: existe evidencia de que la obesidad y el sobrepeso en la edad adulta, especialmente después de la menopausia están asociados con un aumento del riesgo de padecer cáncer de mama (Mourouti et al. 2015). Esto debido a las mayores tasas de conversión de precursores androgénicos en estrógenos, a través de la aromatización periférica en el tejido adiposo (Chen et al. 2016). Por otra parte varios estudios han abordado el papel de los carcinógenos del alcohol y su correlación con este tipo de cáncer (Miller et al. 2018; Mourouti et al. 2015).

e) Ambientales: la exposición a radiación ionizante, especialmente mientras las glándulas mamarias están en desarrollo podría producir lesiones en el genoma (Mourouti et al. 2015). Por otro lado, desde hace tiempo se evaluó la idea de que determinados tipos de neoplasias malignas humanas pudieran tener un origen viral (Baltzell et al. 2012). Aproximadamente el 18-20% de los carcinomas humanos han sido asociados con agentes virales (Kouloura et al.

2018; Salman et al. 2017) y se reconoce que el cáncer de mama está relacionado con este tipo de factores de riesgo ambientales (Fernandes et al. 2018).

2.3.3.- Virus implicados en cáncer de mama humano

El descubrimiento de que un tumor mamario de ratón podría ser causado por un agente viral, condujo a la hipótesis de que un agente similar podría desempeñar un papel en la glándula mamaria humana. En 1943 Bittner *et al.*, demostraron 3 cofactores en el desarrollo de neoplasias mamarias espontáneas en ratones: 1) susceptibilidad heredada, 2) influencias hormonales y 3) un factor transmisible en la leche materna. Este factor transmisible desde entonces se ha demostrado que es un retrovirus, ahora conocido como VTMM. Este virus es oncogénico en el medio estrogénico de ratones hembras de cepas con una susceptibilidad genética a neoplasias mamarias (Bittner 1942). En 1995, Pogo *et al.*, identificaron una secuencia del gen *env*, cuyo producto es una proteína de la envoltura del VTMM, en el 38% de 314 neoplasias mamarias (Wang et al. 1995). En el año 2000, el mismo autor encontró el gen *env* integrado en varios cromosomas de células de cáncer de mama (Brower 2004).

Estudios realizados durante 1970 y 1980 detectaron antígenos virales semejantes al VTMM en leche humana y en células de cáncer de mama. También se ha demostrado que tales agentes tienen actividad de transcriptasa inversa y desde entonces otros estudios han demostrado la presencia de un retrovirus homólogo al VTMM en tejidos de cáncer de mama humano (Axel, Schlom, and Spiegelman 1972; Vaidya et al. 1974), en cultivos de células mamarias normales (Furmanski et al. 1974) y en cultivos de células humanas de cáncer de mama (Keydar et al. 1984).

El Virus del Epstein-Bar (VEB) causante del linfoma de Burkitt y del carcinoma nasofaríngeo (Henle and Henle 1966), también se ha asociado con otros tipos de cáncer como el linfoma de células T y el linfoma de Hodgkin. Este virus se transmite principalmente a través de la saliva pero posiblemente también vía sexual (Higgins et al. 2007). El VEB captó interés como posible agente de cáncer de mama cuando Labrecque *et al.* informaron su presencia en tejido mamario (Labrecque et al. 1995). Diversos estudios sugieren una posible relación en la patogénesis del cáncer de mama causada por infecciones virales, particularmente el VEB, VS-40, VTMM y el VPH (Brower 2004; Lawson et al. 2006).

2.4.-Virus del Papiloma Humano y cáncer

El VPH forma parte de la familia *Papillomaviridae*, estos virus infectan las células epiteliales de la piel y mucosas, siendo su célula diana la situada en la capa basal del epitelio que son capaces de proliferar. Más de 200 genotipos de papilomavirus humanos y animales se han caracterizado y secuenciado, de los cuales aproximadamente 40 tipos infectan la mucosa del tracto anogenital.

Aproximadamente 15 tipos de VPH son clasificados como de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) los cuales se asocian con lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer cervical invasivo. De éstos, el VPH-16 seguido por el VPH-18 son los detectados con mayor frecuencia (Frazer 2004; Islam et al. 2017). Por otro lado, aproximadamente 11 tipos de VPH se clasifican como de bajo riesgo (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81 y CP6108), los cuales están asociados principalmente con verrugas genitales (condilomas) y lesiones cervicales benignas (Tabla II) (Islam et al. 2017; Woodman, Collins, and Young 2007; Gupta and Mania-Pramanik 2019). Hace aproximadamente 35 años, se postuló un papel para el VPH en el cáncer cervical (zur Hausen et al. 1974). La observación crucial por Zur Hausen que la infección con papilomavirus podría ser responsable del cáncer cervical en humanos, fue confirmada posteriormente a través de largos estudios (Wang et al. 2012; zur Hausen, de Villiers, and Gissmann 1981).

2.4.1.- Estructura del VPH

El VPH está formado por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro de aproximadamente 55 nm, el cual contiene al genoma viral. El genoma consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pb (Wang et al. 2012). De acuerdo con la expresión de proteínas durante el ciclo viral, se han identificado dos regiones funcionales del genoma: una región codificante que contiene los genes tempranos, E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y una región que contiene dos genes tardíos que codifican para las proteínas de la cápside, (L1) en mayor proporción y (L2) en menor proporción. Además, el genoma del VPH tiene una región no codificante, denominada región larga de control (LCR), que incluye la mayoría de los elementos reguladores involucrados en la replicación y transcripción del ADN viral (Figura 2). Durante la infección por VPH, las diferentes proteínas virales se expresan secuencialmente (Gupta and Mania-Pramanik 2019).

Tabla II: Tipos de papillomavirus en lesiones genitales (zur Hausen 2002).

Tipo de lesión genital	Tipo de VPH	
	Menos prevalente	Más prevalente
Verrugas genitales	42,44,51,53,83	6,11
Neoplasias intraepitelial	6,11,18,26,30,31,33,34,35,39,40,42,43 45,51,52,53,54,55,56,57,58,59,61,62,64 66,67,68,69,70,71,73,74,79,81,82,83,84	16
Cáncer cervical y otros tipos de cáncer anogenital	18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,58,59,66,68,69	16

2.4.2.-Ciclo vital del VPH

El ciclo de vida del VPH está relacionado con el estado de diferenciación de la célula huésped y se caracteriza por distintas fases de replicación (McBride 2017). Los VPH de alto y bajo riesgo inician la infección por el acceso a las células basales del epitelio estratificado a través de una micro lesión (Figura 3). Se sabe que los mecanismos que permiten la entrada al medio extracelular en la célula es a través de la interacción de la proteína L1 con proteoglicanos de heparán sulfato, provocando un cambio conformacional de L1, lo que expone a la proteína L2, la cual interactúa con otros receptores membranales. Esto desencadena que las partículas virales se internalicen a través de una vía denominada macropinocitosis (Sapp 2013).

Durante la infección, el genoma viral se mantiene en un bajo número de copias como un elemento extracromosómico conocido como *episoma* en las células basales no diferenciadas del epitelio. El VPH se somete a una ronda de replicación transitoria denominada "replicación de establecimiento", que da como resultado un número de copias de 50 a 100 genomas virales por célula. Estos episomas virales se mantienen en células basales no diferenciadas al replicarse junto con los cromosomas de la célula huésped. A partir de entonces, el ciclo de vida del virus se acopla estrechamente al programa de diferenciación de las células basales (Gupta and Mania-Pramanik 2019).

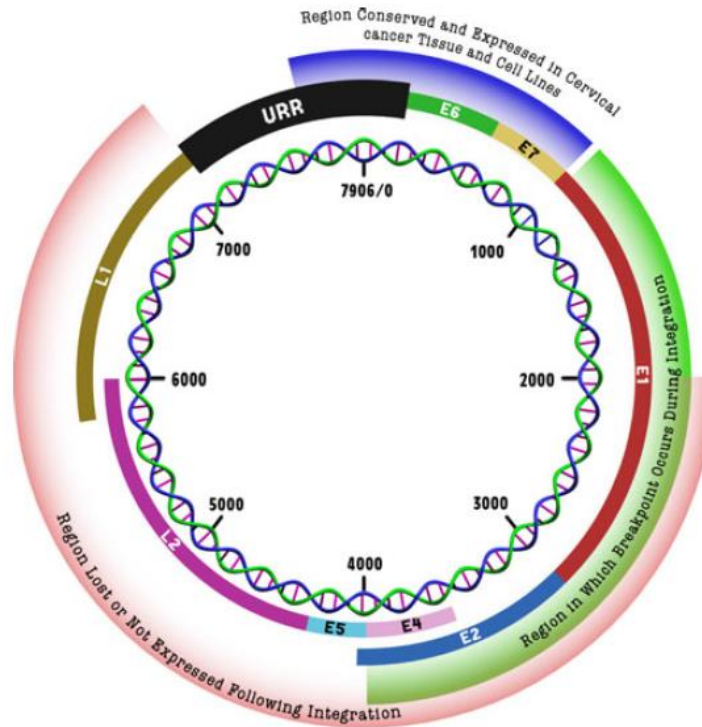


Figura 2: Genoma del VPH. El genoma está dividido en tres porciones: la región **E** de aproximadamente 4000 pb que codifica para las proteínas implicadas principalmente en la replicación del ADN viral y la transformación celular. La región **L** de aproximadamente 3000 pb que codifica para las proteínas estructurales de los viriones. La región Larga de Control **LCR** no codificante de aproximadamente 1000 pb que contiene el origen de replicación del ADN viral y elementos reguladores de la transcripción (Modificada de: Wang *et al.*, 2012).

La replicación del genoma viral requiere a la proteína iniciadora E1, que tiene una actividad de helicasa dependiente de ATP. La proteína E1 se oligomeriza y se ensambla como un doble hexámero en el origen de replicación viral del ADN e interactúa funcionalmente con varios factores de replicación del huésped, como la polimerasa α -primasa, la proteína A de replicación, la topoisomerasa I y la ciclina E/Cdk2 (Hebner and Laimins 2006). La proteína E2 también funciona como un factor de transcripción, capaz de reprimir y transactivar; así como como un mediador de la segregación del genoma, que es esencial para la persistencia viral. La inactivación de E2 afecta el desarrollo de lesiones tumorales promoviendo la expresión de E6 y E7; por el contrario la proteína E2 activa inhibe la transcripción de E6 y E7, causando un aumento en la expresión de p53 y la apoptosis de las células infectadas (Morshed *et al.* 2014; Islam *et al.* 2017; Gupta and Mania-Pramanik 2019).

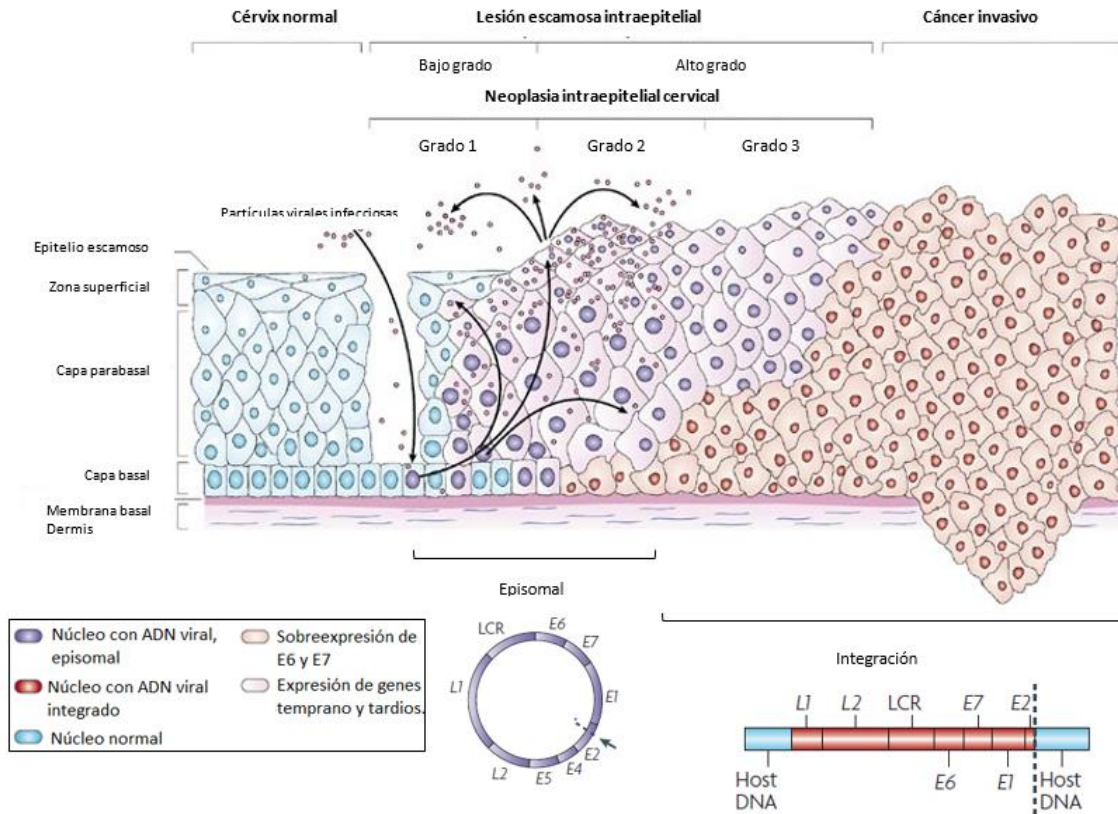


Figura 3: Infección cervical por VPH. El VPH penetra a la capa basal de las células epiteliales, donde el virus expresa las proteínas E1 y E2. Las proteínas E5, E6, E7 son capaces de inducir la hiperplasia epitelial. En las capas más superficiales de la epidermis se expresan las proteínas L1 y L2 que codifican la cápside del virus y posteriormente ocurre el ensamblaje de las partículas virales (Modificada de: Woodman *et al*, 2007).

A medida que las células infectadas experimentan diferenciación, se induce la expresión génica tardía y la replicación del genoma viral. Las proteínas E4 y E5 son necesarios para la amplificación viral (Gupta and Mania-Pramanik 2019). La proteína E4 se asocia con los filamentos intermedios de queratina, lo que afecta su estabilidad mecánica y puede facilitar la liberación de partículas virales (Wang et al. 2012). Además como resultado de la actividad de E4, se produce un engrosamiento del estrato espinoso lo que origina coilocitosis (Morshed et al. 2014). La proteína E5 puede tener funciones similares, y la interrupción de la expresión de E5 afecta el ciclo de vida de los subtipos del VPH de alto riesgo. El hecho de que la expresión de E5 no se detecte generalmente en el cáncer cervical después de la integración del genoma viral demuestra que E5 no es esencial para el mantenimiento del fenotipo transformado. La integración del genoma viral en un cromosoma huésped también conduce a la pérdida de la expresión de E5. La proteína E5 se asocia con membranas intracelulares y

transforma las células mediante la activación de receptores tirosina cinasa, como el receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, a través de un mecanismo independiente del ligando (DiMaio and Mattoon 2001).

Para mantener activa la maquinaria de replicación celular, las proteínas virales E6 y E7 se expresan y desacoplan la detención y diferenciación del crecimiento celular principalmente a través de la inactivación de p53 y pRb, respectivamente. La inactivación de pRb por E7 obliga a las células infectadas a permanecer en un estado proliferativo y escapar de la salida del ciclo celular, mientras que la anulación de p53 por la proteína E6 asegura la supervivencia celular al prevenir la apoptosis provocada por esta aberrante señal de crecimiento (Islam et al. 2017). La proteína E7 también se asocia con otras proteínas involucradas en la proliferación celular, incluidas las histonas desacetilasas (Longworth and Laimins 2004), los componentes del complejo de transcripción AP1, y los inhibidores de la cinasa dependientes de ciclina p21 y p27 (Antinore et al. 1996; Funk et al. 1997).

La fase productiva del ciclo de vida viral se activa aún más tras la diferenciación epitelial, lo que resulta en la amplificación de los genomas virales a miles de copias por célula en las capas suprabasales. Los genomas amplificados luego se empaquetan en viriones infecciosos por las proteínas L1 y L2, que forman las subunidades de la cápside icosaédrica. Finalmente, el escape viral probablemente se produce por descamación del tejido natural y puede ser facilitado por la capacidad de interrupción de la red de queratina de E4 (Gupta and Mania-Pramanik 2019).

El VPH puede encontrarse en cérvix en forma episomal, integrada o mixta (Woodman, Collins, and Young 2007). La integración del ADN del VPH en el genoma de la célula huésped es un evento clave en la carcinogénesis mediada por el VPH que conduce a una proliferación anormal y progresión maligna (Islam et al. 2017). La integración viral se produce en la región E1 o E2; esto ocasiona una pérdida en el control de la expresión de la proteína E2. Ahora está claro que la relación entre la carga viral y la enfermedad es más compleja de lo que se pensaba. Se ha encontrado al VPH-18 integrado conforme aumenta la seriedad de la lesión; sin embargo se ha identificado al VPH-16 en forma episomal en enfermedades invasivas (Woodman, Collins, and Young 2007).

2.4.3.- VPH implicado en la etiología de varios tipos de cáncer

Se estima que el VPH está relacionado con más del 5% de todos los tipos de carcinomas en humanos (Sapp 2013). La infección por el VPH de alto riesgo ha sido reconocida como un factor esencial para el desarrollo de cáncer cervical (Gupta and Mania-Pramanik 2019), además se ha asociado con el 99.7% de los casos de cáncer cervicouterino, con el 50% de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y con una cuarta parte del cáncer orofaríngeo (Kroupis et al. 2006; Xiong et al. 2017). Así mismo se considera que el VPH puede promover carcinomas de células escamosas de los sitios anogenital y esófago (Liang and Tian 2008). Además se ha reportado la presencia del VPH en una variedad de tipos de cáncer como ovario, glioblastoma, colorrectal, pulmón y mama (Xiong et al. 2017; Brower 2004).

2.5.-Evidencias de la relación del VPH en cáncer de mama

El VPH se ha propuesto como posible factor de riesgo y agente etiológico del cáncer de mama. Esta hipótesis reside en informes que reportan la presencia del VPH de alto riesgo (oncogénicos) especialmente los tipos 16, 18 y 33 en tejidos con neoplasias malignas de mama (Baltzell et al. 2012). En contraste, en varias investigaciones no se reporta la presencia del VPH en tejido mamario. Teniendo en cuenta estos datos contradictorios y la compleja asociación del VPH con otros tipos de cáncer, aún no se ha determinado una relación definitiva entre el VPH y el cáncer de mama (Wang et al. 2012). Existe un creciente interés en esta área en los últimos años, prueba de ello es el incremento de artículos publicados al respecto, a favor y en contra de la presencia del VPH en tejido mamario.

La participación de VPH en cáncer de mama surge a partir de 1991 cuando Band *et al.*, sugirieron que el VPH-16 y 18 podrían inmortalizar células epiteliales mamarias humanas normales, a través de la inhibición de la apoptosis (Band et al. 1991). Poco después en 1992, Di Lonardo *et al.*, mediante técnicas de PCR confirmo la presencia de VPH-16 en muestras de cáncer de mama incluidas en parafina y en ganglios linfáticos metastásicos de cáncer de mama, que respaldan una posible relación entre el VPH y el cáncer de mama (Di Lonardo, Venuti, and Marcante 1992).

Con el objetivo de esclarecer la relación entre el VPH y el cáncer de mama, se realizó una revisión que incluyó 64 estudios los cuales evalúan la presencia del VPH en tejido mamario (Figura 4). Las tablas III A-E y IV enumeran los artículos por orden cronológico de publicación, resumiendo los principales tipos de muestra, la conservación de la muestra, los métodos de detección, la proporción de muestras positivas, así como el genotipo del VPH detectado. Desde el año de 1992 hasta la fecha un número importante de estudios han reportado la presencia del VPH en tejido mamario. En la búsqueda han encontrado diferentes porcentajes de detección del VPH que van desde el 0-86%.

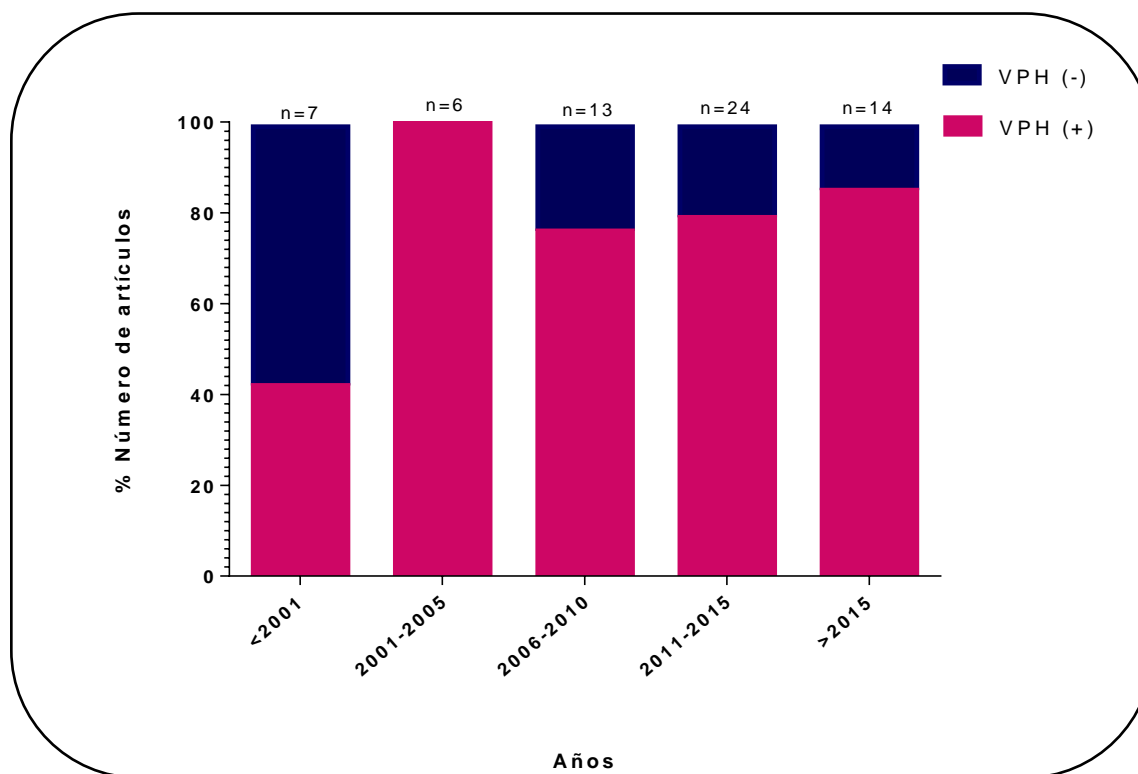


Figura 4: Artículos publicados entre los años 1992-2019 de evidencias de la presencia y ausencia del VPH en tejidos mamarios.

Se considera que las discrepancias en los resultados pueden ser atribuidas al muestreo, al protocolo de procesamiento de tejidos, al método de ensayo, a los primers utilizados, al tamaño de la muestra y a la variación de la prevalencia de infecciones por VPH en las diferentes poblaciones del mundo (Malhone, Longatto-Filho, and Filassi 2018; Wang et al. 2012). Sin embargo, los resultados son controvertidos y suscitan interés en la participación del VPH como posible factor de riesgo en la carcinogénesis mamaria (Malhone, Longatto-Filho, and Filassi 2018).

Tabla III A: Estudios positivos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
Balci <i>et al.</i> , 2019	USA	27 ^j 18 ^a	8 (29.6%) ^j 8 (44.4%) ^a	6, 11, 39 y 82	Tejido embebido en parafina	L1	PCR y HPV type 3.5 LCD array kit. Chipron GmbH (genotipificación)
Khodabandehlou <i>et al.</i> , 2019	Irán	71 ^a 32 ^d	35 (48.6%) ^a 5 (16.1%) ^d	18 más prevalente	Tejido fresco congelado.	L1, E7, E2	RT-PCR, Ensayo INNO-LiPA (Genotificación),
De Carolis <i>et al.</i> , 2019	Italia	273 ^a	83 (30.4%)	16, 18	Tejido embebido en parafina	L1, E1, E7, E6	Hibridación <i>in situ</i> , RT-PCR, espectrometría de masas
Ghaffari <i>et al.</i> , 2018	Irán	72	4 (5.55%)	No se pudo detectar	Tejido embebido en parafina.	L1	PCR convencional, Ensayo CLART® HPV2 (Genotificación).
Cavalcante <i>et al.</i> , 2018	Brasil	103 ^a 95 ^d	51 (49.5%) ^a 15 (15.8%) ^d	6, 11, 18, 31, 33, 52.	Tejido embebido en parafina.	L1, E6, E7	PCR, PCR multiplex, Secuenciación.
Fernandes <i>et al.</i> , 2018	Venezuela	48 ^a 26 ^b	19 (25%)	18 más prevalente	Tejido fresco congelado	L1	Ensayo INNO-LiPA (Genotificación),
Wang <i>et al.</i> , 2017	China	80 ^a	14 (17.3%)		Tejido fresco congelado.		Captura de híbridos.
Naushad <i>et al.</i> , 2017	Pakistan	250	(45) 18%		Tejido embebido en parafina	L1	PCR
Salman <i>et al.</i> , 2017	Reino Unido	110	46 (42%)	39, 18, 45, 16, 35 y 59	Tejido fresco congelado		PCR multiplex, Secuenciación, Western blot y dot blot.

Tabla III B: Estudios positivos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
Islam <i>et al.</i> , 2017	India	272 ^g 41 ^h	174 (63.9%) ^g 29 (71%) ^h	16, 18 y 33.	Tejido embebido en parafina.	L1	PCR en tiempo real, RT-PCR, Secuenciación, Southern blot, análisis de metilación.
Choi <i>et al.</i> , 2016	Corea	123 ^a	22 (17%)	6, 16, 33, 39, 40, 51, 53, 61	Tejido embebido en parafina.		PCR en tiempo real, AnyplexII HPV28, análisis de curvas de fusión.
Lawson <i>et al.</i> , 2016	Australia	28 ⁱ 18 ^d	13 (46%) ⁱ 3 (17%) ^d	16, 18, 33, y 58	Tejido embebido en parafina.	L1	PCR convencional, PCR en tiempo real, Secuenciación, IHQ.
Li <i>et al.</i> , 2015	China	187 ^a 187 ^d 92 ^b	3 (16%) ^a 0 ^d 0 ^b	6, 16 y 18	Tejido embebido en parafina.	L1, E6 de VPH 16 y 18	PCR convencional, secuenciación.
Gannon <i>et al.</i> , 2015	Australia	80 ^a 10 ^d	13 (16%) ^a 1 (10%) ^d		Tejido fresco congelado	L1	PCR convencional.
Lawson <i>et al.</i> , 2015	Australia	40 ^a	33 (82%)	18 más prevalente	Tejido embebido en parafina.	L1	PCR convencional, RT-PCR, PCR <i>in situ</i> , IHQ
Fernandes <i>et al.</i> , 2015	Venezuela	24	(41.67%)	51, 18, 33, 6 y 11.	Tejido fresco congelado	L1	Ensayo INNO-LiPA (Genotificación), IHQ para marcadores.
Fu <i>et al.</i> 2015	China	169 ^a 83 ^b	25 (14.79%) 1 (1.20%)	58	Tejido embebido en parafina	E7	Q-PCR
Ahangar-Oskouee <i>et al.</i> , 2014	Irán	65 ^a 65 ^b	22 (33.8%) ^a 0 ^b	6,16,35,52, 11	Tejido embebido en parafina	L1	PCR anidada
Peng <i>et al.</i> 2014	China	100 ^a 50 ^b	2 (2%) 0	18	Tejido fresco congelado.		Espectrometría de masas
Manzouri <i>et al.</i> , 2014	Irán	55 Ca ^a 51 NC ^b	10 (18.2%) ^a 7 (13.7%) ^b	16,31,11,43 entre otros	Tejido embebido en parafina	L1	Ensayo INNO-LiPA (Genotificación)
Piana <i>et al.</i> , 2014	Italia	40 Ca ^a 40 TN ^c	6 (7.5%) ^a 6 (7.5%) ^c	16,31,45,52, 6 y 66	Tejido embebido en parafina	L1	Ensayo INNO-LiPA (Genotificación)

Tabla III C: Estudios positivos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
Ali <i>et al.</i> , 2014	Irak	129 Ca ^a 24 NC ^b 20 TS ^d	60 (46.5%) ^a 3 (12.5%) ^b 0 (0%) ^d	16,18,31,33	Tejido embebido en parafina		Hibridación <i>in situ</i>
Ting Wang <i>et al.</i> , 2014	China	6 ^a 3 ^b	1 (16%) ^a 2 (66%) ^b	16	Tejido fresco congelado		Captura de VPH, SNVs y Secuenciación.
Liang <i>et al.</i> , 2013	China	224 ^a 37 ^k	48 (21.4%) 6 (16.2%)		Tejido fresco congelado.		Captura de híbridos
Pereira Suarez <i>et al.</i> , 2013	Argentina	61	16 (26%)	11, 16	Tejido fresco congelado	L1, E6, E7	PCR convencional, RT-PCR, Secuenciación.
Herrera-Goepfert <i>et al.</i> , 2013	México	20	8 (40%)	16, 18	Tejido embebido en parafina	L1, E6	Q-PCR.
Sigaroodi <i>et al.</i> , 2012	Irán	79 ^a 51 ^b	15 (25.9%) ^a 1 (2.4%) ^b	16, 18, 23, 6, 11, 15, 124	Tejido embebido en parafina	L1	PCR, Secuenciación.
Glenn <i>et al.</i> , 2012	Australia	50 ^a 40 ^d 27 ^a 18 ^d	25 (50%) ^a 8 (40%) ^d 10 (37%) ^a 18 (35) ^d	18	Tejido fresco congelado, Tejido embebido en parafina.	E6, para VPH 16,18 y 33.	PCR convencional PCR <i>in situ</i>
Antonsson <i>et al.</i> , 2011	Australia	54	27 (50%)	18	Tejido fresco congelado	L1	PCR, Secuenciación, Hibridación <i>in situ</i>
Baltzell <i>et al.</i> , 2011	USA	70	2 (2.9%)* 4 (5.7%)**	16	Tejido embebido en parafina	L1	Hibridación <i>in situ</i> *, PCR <i>in situ</i> **
Mou <i>et al.</i> , 2011	China	62	4 (6.5%)	16, 18	Tejido fresco	L1	Reverse dot blot, Secuenciación
Aguayo <i>et al.</i> , 2010	Chile	46	4 (8.7%)	16	Tejido embebido en parafina	L1, E6, E7, E2	PCR convencional, Q- PCR
Herrera-Goepfert <i>et al.</i> , 2010	México	70	17 (24%)	16,33	Tejido embebido en parafina	E6, E2	PCR convencional, Q- PCR
Heng <i>et al.</i> , 2009	Australia	26 ^a 17 ^b	8 (30.7%) ^a 3 (17.6%) ^b	16,18	Tejido embebido en parafina	L1	PCR <i>in situ</i> , PCR convencional, Secuenciación, Microscopía óptica

Tabla III D: Estudios positivos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
De León <i>et al.</i> , 2009	México	51	15 (29.4%)	16,18	Tejido embebido en parafina	L1	PCR, secuenciación
N Akil <i>et al.</i> , 2008	Canadá	113	69 (61.06%)	33, 35, 18, 16, 31.	Tejido embebido en parafina	L1, E6, E7.	PCR múltiple, IHQ,
Choi YL <i>et al.</i> , 2008	Japón	123	8 (6.5%)				
Mendizabal <i>et al.</i> , 2008	México	67	3 (4.4%)	16, 18, 33	Tejido embebido en parafina	E1	PCR, Secuenciación
Khan <i>et al.</i> , 2008	Japón	124	26 (21%)	16, 6, 18, 33	Tejido embebido en parafina	E6	PCR convencional, Q-PCR
Gumus <i>et al.</i> , 2006	Turquía	50 ^a 50 ^b	37(74%) ^a 16(32%) ^b	33, 18	Tejido fresco congelado	L1	PCR
Kroupis <i>et al.</i> , 2006	Grecia	107	17 (15.9%)	16, 59, 58, 73, 82	Tejido fresco congelado	L1, E6, E7, E4	PCR
Tsai <i>et al.</i> , 2005	Taiwan	69	8 (12.9%)		Tejido fresco congelado	L1	PCR, Southern blot
Kan <i>et al.</i> , 2005	Australia	50	24 (48%)	16	Tejido fresco congelado	E6	PCR
de Villiers <i>et al.</i> , 2004	USA	29 ^a 29 ^e	25 (86%) ^a 20 (69%) ^e	11,6,16,57,27,66,87,37 Nuevo: DL250	Tejido embebido en parafina	L1	PCR, Secuenciación e Hibridación <i>in situ</i>
Damin <i>et al.</i> , 2004	Brasil	101 ^a 41 ^b	25 (24.75%) ^a 0 ^b	16, 18	Tejido embebido en parafina	E6	PCR
Widschwendter <i>et al.</i> , 2004	Austria	11	7 (64%)	Múltiple, predominó 16, 18 y 31	Tejido embebido en parafina	L1	PCR, inmunoensayo enzimático ELISA
Tao <i>et al.</i> , 2002	China	82	19 (67.9%)	16, 18	Tejido embebido en parafina	E6, E7	PCR
Yu <i>et al.</i> , 2000	China	32	14 (43.8%)	33	Tejido embebido en parafina	E6	PCR, Southern blot

Tabla III E: Estudios positivos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
Hennig <i>et al.</i> , 1999	Noruega	41 ⁱ	19 (46.3%)	16	Tejido embebido en parafina	L1, E6	PCR, Hibridación <i>in situ</i>
Di Lonardo A. <i>et al.</i> , 1992	Italia	40	12 (29.4%)	16	Tejido embebido en parafina	L1, E6	PCR, Hibridación <i>in situ</i>

Carcinoma mamario^a. Alteraciones mamarias benignas^b. Triple Negativo^c. Tejido mamario Sano^d. Pezón^e. Tejido mamario normal adyacente a tejido cancerígeno^f. Muestra pre-terapéutica^g. Muestra tratada con quimioterapia neoadyuvante^h. Pacientes con carcinoma mamario y displasia cervical previaⁱ. Papiloma intraductal^j. Fibroadenoma^k.

Tabla IV A: Estudios negativos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
Kouloura <i>et al.</i> , 2018	Italia	201	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina	E1	PCR, Microarrays.
Bønløkke <i>et al.</i> , 2018	Dinamarca	Total: 193 Casos:93 ⁱ Controles: 100 ^a	1 (0.52%)* 3 (1.55%)**	16, 56	Tejido embebido en parafina	E6/E7 L1	Semi-Q-PCR*, Hibridación inversa SPF 10 LiPA 25.**
Zhou <i>et al.</i> , 2015	China	77 ^a 77 ^f	0	Ninguno	Tejido fresco congelado	L1	PCR
Vernet-Tomas <i>et al.</i> , 2015	España	78	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina		Ensayo DEIA (Genotipificación)
Chang <i>et al.</i> , 2012	China	48 ^a 30 ^b	0 ^a 3 (10%)	Ninguno	Tejido fresco congelado	E7	Q-PCR, Hibridación <i>in situ</i>
Silva <i>et al.</i> , 2011	Brasil	79	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina	L1	PCR
Hedau <i>et al.</i> , 2011	India	228	0	Ninguno	Tejido fresco congelado	L1, E6, E7	PCR convencional, Q-PCR
Hachana <i>et al.</i> , 2010	Tunisia	123	0	Ninguno	Tejido fresco congelado	L1,E1,E6 y E7	PCR, Hibridación <i>in situ</i>
De Cremoux <i>et al.</i> , 2008	Francia	50	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina	L1	PCR múltiple
Lindel <i>et al.</i> , 2007	Suiza	81	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina	L1	PCR
Czerwenka <i>et al.</i> , 1996	Austria	20 ^a	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina	L1	PCR
Gopalkrishna <i>et al.</i> , 1996	India	30	0	Ninguno	26 BAAF 4 Tejidos embebido en parafina	E6	PCR, Southern blot

Tabla IV B: Estudios negativos a la presencia de ADN del VPH en tejidos de cáncer de mama.

Autor y año	País	Número de muestras	Prevalencia (%)	Subtipo detectado	Fuente de la muestra	Región amplificada por primers	Método
Wrede <i>et al.</i> , 1992	Reino Unido	95	0	Ninguno	Tejido fresco congelado	E7	PCR, Southern blot
Bratthauer G.L. <i>et al.</i> , 1992	USA	28	0	Ninguno	Tejido embebido en parafina	L1	PCR, Hibridación <i>in situ</i>

Carcinoma mamario^a. Alteraciones mamarias benignas^b. Triple Negativo^c. Tejido mamario Sano^d. Pezón^e. Tejido mamario normal adyacente a tejido cancerígeno^f. Muestra pre-terapéutica^g. Muestra tratada con quimioterapia neoadyuvante^h. Pacientes con carcinoma mamario y displasia cervical previaⁱ. Papiloma intraductal^j. Fibroadenoma^k.

3.- Justificación

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común que afecta a las mujeres en todo el mundo. En México en el año 2020, se presentaron 40.5 casos nuevos por cada 100,000 habitantes y en Zacatecas del total de muertes por cáncer, el 16.5% se atribuyen a esta neoplasia. La transformación maligna del tejido mamario representa un proceso complejo y multifactorial en el que la edad, antecedentes familiares, cambios genéticos, radiación y factores hormonales pueden desempeñar un papel importante en la alteración de las vías celulares y un crecimiento celular descontrolado. A pesar de extensas investigaciones, los factores de riesgo para una proporción significativa de carcinomas mamarios permanecen sin identificar. Esto genera interés en la identificación de nuevos factores de riesgo que contribuyen a la patogénesis del cáncer de mama.

Varios autores han sugerido que el aumento en la incidencia de esta enfermedad puede estar vinculada a factores ambientales. Estas observaciones han sustentado el interés de una posible etiología infecciosa para el desarrollo de cáncer de mama esporádico. Desde el año de 1992, la infección por el VPH se ha propuesto como posible factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. Esto basado en estudios que reportan la presencia de secuencias de diferentes tipos del VPH de alto riesgo (oncogénicos) en tejidos de carcinomas mamarios; sin embargo, hasta la fecha los resultados han sido controversiales y aun no concluyentes, por lo que se requieren estudios adicionales para demostrar una asociación entre el VPH y el cáncer de mama.

4.- Hipótesis

Los genotipos de VPH de alto riesgo se encuentran en los tejidos mamarios diagnosticados con neoplasias malignas.

5.-Objetivos:

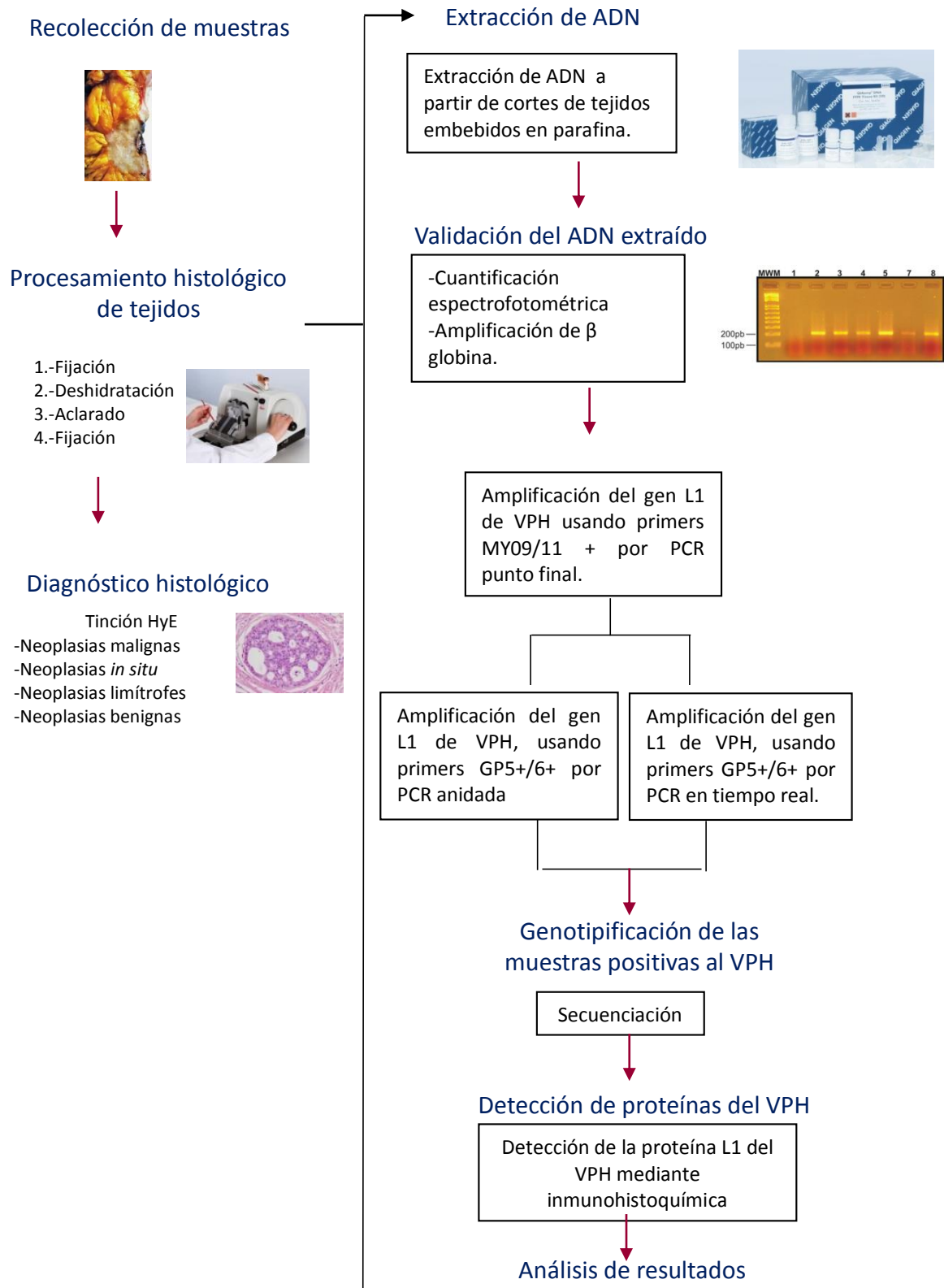
Objetivo General

Detectar y genotipificar al Virus del Papiloma Humano en biopsias de tejido mamario procedentes de mujeres residentes del estado de Zacatecas.

Objetivos Particulares

- 1.-Clasificar las biopsias de tejido mamario recolectadas en función de su diagnóstico histopatológico.
- 2.- Detectar la presencia del ADN del Virus del Papiloma Humano y determinar su genotipo para conocer la prevalencia de los subtipos de alto y bajo riesgo en tejido mamario.
- 3.-Correlacionar la identificación del VPH con el grado de malignidad, el diagnóstico clínico-patológico y el grado de diferenciación en biopsias de tejido mamario.

6.- Diseño Experimental



7.- Material y Métodos

7.1.- Diseño experimental

Este es un estudio observacional, descriptivo, transversal de tipo exploratorio. El protocolo se diseñó de acuerdo con las directrices de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 que garantiza el respeto de todos los seres humanos y protege su salud, sus derechos y la confidencialidad de la información personal (Salud 2012). Considerado por la regulación Mexicana en investigación en salud como un estudio seguro que no necesita consentimiento informado (De La Madrid 2014). El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Área de Ciencias de la Salud perteneciente a la Universidad Autónoma de Zacatecas.

7.2.- Recolección de muestras

Un total de 134 biopsias fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina fueron recuperadas del banco de muestras del Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular (LPDM) L28 ubicado en el Campus UAZ Siglo XXI en la extensión del edificio L1. Estas muestras fueron donadas del sector salud público y privado, durante un periodo de 10 años 2009-2019. Además se obtuvo información clínica de los pacientes.

7.3.- Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión, no inclusión y eliminación de muestras se describen en la Tabla V.

Tabla V: Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación.

Criterios de inclusión	Criterios de no inclusión	Criterios de eliminación
Productos de mastectomía o biopsia mamaria, procedentes de pacientes de sexo femenino y masculino.	Biopsias de tejido mamario que no cuenten con información clínica del paciente.	Biopsias lisadas debido a un mal procesamiento en la técnica histológica.
Productos de mastectomía o biopsia mamaria (tejido mamario, ganglios linfáticos axilares y complejo areola-pezón).		Muestras negativas a la amplificación del gen constitutivo β -globina.

7.4.- Técnica histológica y diagnóstico

Las biopsias frescas fueron tratadas con formaldehído de concentración desconocida inmediatamente después de la extirpación quirúrgica. Posteriormente un especialista realizó la incisión de las biopsias con diferente bisturí para cada tejido, con el fin de evitar contaminación entre muestras. La técnica histológica se realizó de forma manual. Las biopsias fueron recogidas en cajillas procesadoras y tratados con una segunda solución de formaldehído (High Purity®) al 10% amortiguado con PBS (137Mm NaCl, 2.7Mm KCl, 10Mm NaHPO₄, 2Mm KH₂PO₄) durante 24 horas.

Las biopsias fueron deshidratadas en etanol al 70% durante 1 hora, seguido de 3 cambios de etanol (J. T. Jaker®) al 96% durante 1 hora cada uno y 3 cambios de etanol absoluto durante 1 hora cada uno. El aclaramiento se llevó a cabo en 2 cambios de xileno (High Purity®) durante 1 hora cada uno y la inclusión consistió en 2 cambios de parafina (Ultra Par Histo grade J. T. Baker®) durante 1 hora cada uno. Por último se seleccionó el molde para la inclusión, de acuerdo con el tamaño de la biopsia, el cual se llenó parcialmente con parafina.

A partir de los tejidos en parafina fueron cortadas secciones de 3µm en un mirotomo (Leica® RM2125RTS) sobre portaobjetos previamente tratados con Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) al 0.1% v/v en agua destilada, para evitar el desprendimiento del tejido. La técnica de tinción fue modificada del Manual de Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de Estados Unidos de América (AFIP) (Prophet et al. 1995).

Los cortes histológicos fueron sometidos a una incubación a 65°C durante 30 minutos con la solución para desparafinar EZ-Prep [1X] (VENTANA®), la cual es una mezcla de detergentes biodegradables. Posteriormente las muestras fueron enjuagadas con agua destilada y teñidas con hematoxilina (según la fórmula de Gill libre de mercurio) durante un minuto. En seguida las muestras se enjuagaron con agua de grifo y fueron decoloradas en un baño rápido de alcohol ácido al 0.5% (HCl 36% en etanol 96%) e inmediatamente éstas fueron enjuagadas con agua de grifo.

El colorante de las muestras se fijó en una solución de carbonato de litio (MERCCK®) al 1% durante un minuto. Posteriormente las muestras fueron sometidas a un baño rápido con alcohol al 96% (preparación para colorante a base de alcohol) y teñidas en una solución de eosina (Sigma Aldrich®) durante 6 segundos. En seguida las muestras fueron deshidratadas en

cambio graduales de etanol (3 cambios de etanol al 96% y 3 cambios de etanol al 100%) durante 30 segundos cada uno. Finalmente las muestras fueron montadas con resina (Entellan MERCK®) a base de xileno.

Cada muestra fue observada en un microscopio óptico (OLYMPUS). Un especialista en patología emitió el diagnóstico histológico y clínico. Asimismo se capturaron las imágenes representativas de cada tejido. Posteriormente, con el apoyo de un especialista en patología se realizó la clasificación histológica con base al diagnóstico y de acuerdo a la clasificación de la OMS (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003). Las biopsias que presentaron lisis debido a una mala fijación, fueron excluidas del estudio

7.5.- Extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina

A partir de los tejidos en parafina, fueron cortadas 10 secciones, de un espesor de 5 μm , los cuales se recogieron en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml. Para evitar contaminación entre muestras, las cuchillas se limpiaron con etanol y fueron expuestas a radiación UV. La extracción de ADN de cada muestra se realizó con el kit “Quick-DNA FFPE Kit” (Zymo research® No. de catálogo D3067) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Cada muestra se trató con una solución para desparafinar (provista por el kit) y se incubó a 55°C durante 1 minuto. Posteriormente las muestras fueron sometidas a una digestión con proteinasa K a temperaturas de 55°C y 94°C durante 14 horas y 20 minutos respectivamente. La purificación del ADN se llevó a cabo con la adición de un buffer de lisis e isopropanol. Posteriormente las muestras se centrifugaron (IEC CL3IR Multispeed. Thermo Scientific®) a 15,000 G durante 1 minuto. El sobrenadante se transfirió a los tubos con columna (Zymo-Spin IIC column), y se centrifugaron a 10,000 G durante 1 minuto. En seguida se eliminó el sobrenadante y se agregaron las soluciones de lavado (provistas por el kit). Las muestras se centrifugaron a 15,000 G durante 1 minuto y se eliminó el flujo. El ADN se eluyó con 50 μl de una solución buffer (proporcionada por el Kit). Las muestras se incubaron 5 minutos y se centrifugaron a 20,000G durante 30 segundos. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Como control negativo para el aislamiento del ADN se procesaron secciones de parafina sin tejido como se describió anteriormente.

7.6.- Verificación de la calidad del ADN extraído

La cantidad, calidad e integridad de ADN extraído fueron analizadas por espectrofotometría a 260 nm y por la amplificación de un fragmento de 200 pb del gen β -globina por la técnica de PCR punto final.

7.6.1.-Cuantificación espectrofotométrica del ADN

La concentración del ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro UV-Vis en el rango ultra violeta, a una longitud de onda de 260nm. Se analizaron 2.5 μ l de cada muestra y las mediciones se realizaron por triplicado. Se utilizó como blanco de absorción la solución de elución provista por el Kit de extracción de ADN.

7.6.2.- Amplificación de la región de 205 pb del gen β - globina

La calidad del ADN y la ausencia de inhibidores de PCR se analizaron mediante PCR punto final para β -globina. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ l, el cual constó de 2.5 μ l de solución amortiguadora (10X), 1.5 μ l de MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l de cada primer KM29/PCO₄ (10 μ M) (Tabla VI), 0.5 μ l de dNTPs (10 mM), 0.25 μ l de Taq polimerasa (5U/ μ l) (Thermo®, EPO402), 2.5 μ l de ADN extraído (20 ng/ μ l) y 14.25 μ l de agua libre de nucleasas, hasta un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de amplificación fueron 2 minutos a 95°C, 39 ciclos a 95°C, 55.4°C y 72°C durante 30 segundos cada temperatura y una amplificación final a 72°C durante 5 minutos. Como control negativo en cada ensayo se analizó agua destilada.

Un volumen total de 6 μ l de productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (Ultra Pure™ RFF 16500-100, Invitrogen™) al 1.5% en TBE 1X (10X Buffer Tris 1M, Ácido bórico 0.9M, EDTA 0.01M), teñido con bromuro de etidio 10mg/ml. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Rango 100pb-12Kpb). Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Q5-710 Quick Screen IBI® Shelton Scientific) y una fuente de poder (Power Station™ 300 Plus. Lab net) a 85 volts durante 30 minutos, seguidos de 95 volts durante 15 minutos. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Wise Uv® modelo WUV-L50), y las imágenes fueron procesadas digitalmente en un equipo fotodocumentador (“EDAS” Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 KODAK vs digital system). Las muestras negativas a la amplificación fueron excluidas del estudio.

7.7.- Detección de ADN del VPH por PCR en un solo paso

Todas las muestras fueron sometidas a una amplificación por PCR convencional usando los primers MY09/MY11 y GP5+/GP6+, descritos en la tabla VI. La secuencia consenso de los primers MY09/11 está localizada dentro del gen L1 del genoma del VPH, son altamente degenerados, lo que permite la detección de más de 25 genotipos del VPH. Éstos se usaron de acuerdo a protocolos publicados anteriormente (Remmerbach et al. 2004). Los primers GP5+/6+ se utilizaron para amplificar una región de aproximadamente 150pb correspondiente al gen L1 del VPH (colocado en la parte interna del amplicon MY09/11), los cuales detectan aproximadamente 37 genotipos del VPH (de Roda Husman et al. 1995).

7.7.1.-Amplificación de la región de 450 pb del gen L1 del VPH

La mezcla de reacción se preparó utilizando 2.5 µl de solución amortiguadora (10X), 1.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de cada primer MY09/MY11 (10 µM) (Tabla VI), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.25 µl de Taq polimerasa (5U/ µl) (Thermo®, EPO402), 5 µl de templado (20 ng/µl) y 16.75 µl de agua libre de nucleasas, hasta un volumen final de 25 µl. Como controles positivos se utilizó ADN [20ng/µl] de las líneas celulares SiHa y caSki, las cuales tienen integrado en su genoma de 1-2 copias y de 400-500 copias respectivamente de ADN del VPH-16 (Evans et al. 2005). Como control negativo de la amplificación se utilizó agua destilada.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador mencionado anteriormente. Se inició con una primera etapa de desnaturalización de 4 min a 95°C. La amplificación se ejecutó por 20 ciclos de amplificación, cada ciclo constó de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, la alineación a una temperatura de 57°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C durante 45 segundos. El paso final de elongación se prolongó 5 minutos para asegurar la completa extensión del ADN amplificado. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.2% en TBE 1X, teñido con bromuro de etidio.

7.7.2.-Amplificación de la región de 150 pb del gen L1 del VPH

La mezcla de reacción se preparó utilizando 2.5 µl de solución amortiguadora (10X), 1.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de cada primer GP5+/GP6+ (10 µM) (Tabla VI), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.25 µl de Taq polimerasa (5U/µl) (Thermo®, EPO402), 5 µl de templado (20 ng/µl) y 16.75 µl de agua libre de nucleasas, hasta un volumen final de 25 µl.

Se inició con una primera etapa de desnaturalización de 4 min a 95°C. La amplificación se ejecutó por 20 ciclos de amplificación, cada ciclo incluyó una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto. La alineación de primers se llevó a cabo en un rango de temperatura de 50-40°C con decrementos de -0.5°C (Sistema Touchdown) (Evans et al. 2005) durante 2 minutos, continuado con una extensión a 72°C durante 1.5 minutos. Este proceso fue seguido por 28 ciclos de amplificación anexos, donde cada ciclo incluirá una etapa de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, la alineación a una temperatura de 40°C por 2 minutos, y una extensión final a 72°C durante 1.5 minutos. La reacción continuó con una extensión final a 72°C durante 4 minutos (de Roda Husman et al. 1995). Se analizaron los controles positivos y negativos descritos anteriormente. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% en TBE 1X, teñido con bromuro de etidio.

7.8.- Detección de ADN del VPH por PCR anidada

El ADN de las muestras que fueron negativas en la amplificación con los primer MY09/MY11, fueron re amplificadas en una PCR anidada usando el par de primers GP5+/6+. El primer conjunto de primers amplifica una región de aproximadamente 450 pb dentro del gen L1 del VPH, mientras que los primers internos generan un fragmento de 150 pb de la regio L1 del VPH, dentro de la secuencia amplificada por el par de primers externos (de Roda Husman et al. 1995).

7.8.1.-Detección de la región de 150 pb del gen L1 del VPH por PCR en tiempo real

La amplificación se realizó con el Platimun SYBR Green pPCR Super Mix-VDG. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25µl, la cual constó de 12.5 µl de Platimun SYBR Green qPCR Super Mix-VDG (Platimun taq DNA polymerase, SYBR Green I dye, Tris-HCl, KCl, MgCl₂ [6mM], dNTPs [400µM], UDG), 1µl de mix primers GP5+/GP6+ [5µM], 2.5µl de ROX Reference Dye Dilución 1:50 [500nM] y 5µl del templado. Las condiciones de amplificación de PCR fueron 2 minutos a 50°C y 2 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo constó de una etapa de desnaturalización a 95° C durante 15 segundos, una alineación de primers a una temperatura de 48.4°C por 30 segundos y una extensión final a 60°C durante 30 segundos. Se analizaron los controles positivos y negativos descritos anteriormente. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador (7500 Fast Real Time PCR System. Applied Biosystems TM), y los datos fueron procesados

con el software 7500 v2.0.6. También se obtuvo el análisis de la temperatura melting (T_m) del ADN amplificado.

7.8.2.-Precauciones para la prevención de contaminación

Estrictos procedimientos se llevaron a cabo con la finalidad de evitar contaminación y la generación de falsos positivos. La extracción del ADN, la preparación de reactivos y la adición de las muestras se llevaron a cabo en laboratorios separados. La preparación de reactivos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (PCR Cabinet ISOCIDE™) y la carga de la muestra de ADN se realizó en una cabina de bioseguridad para PCR (PCR Chamber By Plas Labs Lansing Mi USA). Cada ensayo incluyó controles negativos de amplificación, los cuales contenían agua sin muestra de ADN. Todas las superficies de trabajo se limpiaron con alcohol al 70% antes y después de trabajar, además todo el material se esterilizó con luz UV.

Tabla VI: Secuencia de primers y extensión en pares de bases.

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos 5´-3´		Gen	Tamaño (pb)
PC0 ₄	CAACTTCATCCACGTTACCC	Forward	β- globina	205
KM29	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG	Reverse	β- globina	205
MY09 ^a	CGTCCMARRGGAWACTGATC	Forward	L1 VPH	450
MY11 ^a	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	Reverse	L1 VPH	450
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	Forward	L1 VPH	140-150
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	Reverse	L1 VPH	140-150

^aBases degeneradas: M=A+C, W=A+T, Y=C+T, R=A+G (Kroupis *et al*, 2006).

7.9.- Genotipificación del VPH

La genotipificación del VPH se realizó utilizando dos diferentes ensayos basados en la técnica de PCR que permiten la detección de ADN del VPH. Las muestras positivas a la amplificación del ADN del gen L1 del VPH se sometieron a genotipificación utilizando el ensayo LCD-Array HPV-Type 3.5 (Chipron GmbH, Berlín) el cual permite la identificación de 32 tipos del VPH de bajo, intermedio y alto riesgo. Posteriormente, para corroborar el resultado de las muestras que mostraron un resultado no concluyente o que no mostraron alguno de los 32 genotipos del VPH, se sometieron a genotipificación de forma independiente utilizando un protocolo de PCR en tiempo real basado en primers específicos.

7.9.1.-Genotipificación del VPH por LCD-Array HPV-Type 3.5 (Chipron)

El ensayo utilizó el conjunto de primers “MY09/MY11” los cuales generan un fragmento de aproximadamente 450 pb y una segunda mezcla de “125”, los cuales producen un amplicón de menor longitud, de aproximadamente 125 pb (vor der Holte et al. 2020). Ambas mezclas se utilizaron en reacciones de PCR independientes y los productos amplificados se combinaron antes de la hibridación. La PCR realizó de acuerdo al protocolo del fabricante.

La mezcla de reacción se preparó utilizando 2.5 µl de solución amortiguadora (10X), 2µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl del mix de primers MY09/MY11 o 2 µl del mix de primers 125, 1 µl de dNTPs (10 mM), 0.3 µl de Taq polimerasa (5U/ µl) (Thermo®, EPO402), 5 µl de templado (20 ng/µl) y ajustó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl. Como control positivo se utilizó ADN [20ng/µl] de las línea celular caSki. Como control negativo de la amplificación se utilizó agua destilada. Los ajustes del termociclador se establecieron de la siguiente manera: 3 minutos a 95°C, seguido de 41 ciclos de 1 min a 94°C en la desnaturalización, 1.5 minutos a 45°C en el alineamiento y 1.5 minutos a 72°C en la extensión. El último paso fue un paso de extensión adicional durante 3 minutos a 72°C. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador mencionado anteriormente.

La hibridación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del fabricante. Los productos de PCR marcados fueron hibridados con sondas de captura específicas al subtipo del VPH, inmovilizadas en la superficie del chip LCD. Seguido de lavados, cada campo se incubó con una solución secundaria (enzima-conjugado), después de un paso de lavado, las posiciones

donde los fragmentos de PCR y las sondas de captura se unieron, pudieron ser visualizadas por el sustrato enzimático como una mancha azul. La lectura de datos se realizó usando el software LCD SlideReader V9. La matriz de LCD del kit es capaz de detectar 32 tipos del VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 91 y 91.

7.9.2.-Genotipificación del VPH por PCR en tiempo real

En total se analizaron 14 genotipos del VPH de bajo y alto riesgo por medio de la técnica de PCR en tiempo real usando primers específicos. El análisis de 11 genotipos se realizó usando el kit Uterine Cervix Cancer of High-risk HPV Genotype Related Real Time PCR Kit (VPH 31; 33; 35 y 59; 58 y 52; 39 y 51; 18 y 45 y 68). El kit se basa en la amplificación única o simultánea de dos regiones específicas del genoma de diferentes genotipos del VPH en un tubo (PCR multiplex), lo cual permite la detección de diferentes genotipos simultáneos en una muestra (coinfeción) y genotipos individuales (monoinfección).

El análisis del VPH 16 se realizó usando HPV 16&18 Real Time PCR Kit y la detección de VPH de bajo riesgo 6 y 11 se realizó usando el HPV 6&11 Real Time PCR Kit User Manual. Este último contiene un sistema para identificar posibles inhibidores de PCR mediante la medición de fluorescencia de un control interno. Los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección del fragmento de ADN del VPH se realizó en los canales fluorimétricos FAM y JOE, con el quencher BHQ1. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador mencionado anteriormente y los datos fueron procesados con el software 7500 v2.0.6.

7.10.- Detección de proteínas del VPH

Para mayor validación se realizó una colección de muestras aleatorias equivalente al 32% (10/31) del número de muestras positivas a la presencia del virus para la detección de la expresión de proteínas del VPH por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Se utilizó un anticuerpo monoclonal clon K1H8 (Dako®), el cual reacciona con un epítipo de la proteína L1 del VPH-1 y se ha demostrado que detecta 11 subtipos del virus de alto y bajo riesgo (6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 y 58).

A partir de los tejidos en parafina se obtuvieron secciones de 3µm y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-Lysine al 0.1%. Los cortes histológicos se desparafinaron como se describió anteriormente en la técnica histológica. La recuperación antigénica se realizó por el método de olla de presión Tender Cooker® en EDTA 0.1M durante 5 minutos en microondas. Posteriormente las muestras se enfriaron en un baño de hielo y fueron lavadas con agua destilada. La inhibición de la peroxidasa endógena se realizó en una incubación con una solución de peróxido de hidrogeno al 0.9% de 2-8°C, durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados con agua destilada. Las laminillas fueron colocadas en el cover play con PBS [1X], y se agregó 100µl de anticuerpo primario anti VPH L1 (clona K1H8, Dako®). Las laminillas se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente las muestras fueron lavadas con PBS, y se incubaron 45 minutos con 100µl de anticuerpo secundario biotinilado (Starr Trek Universal HRP Detection System, BIOCARE®). Posteriormente se realizó otro lavado con PBS y las muestras se incubaron durante 45 minutos con 100µl de estreptavidina-HRP (Starr Trek Universal HRP Detection System, BIOCARE®). Pasado el tiempo se realizó un lavado con PBS y se desmontaron las laminillas del cover play. Posteriormente se agregaron 100µl de diaminobencidina (Starr Trek Universal HRP Detection System, BIOCARE®). Ésta se incubó durante 45 segundos y las muestras fueron lavadas con agua destilada. Finalmente se realizó una tinción con hematoxilina (según la fórmula de Gill). Las laminillas fueron visualizadas por microscopía óptica. Como control positivo se utilizaron cortes histológicos de cérvix con neoplasia intraepitelial positivos para el VPH.

7.11.-Análisis estadístico

Se utilizaron medida de tendencia central y de dispersión para variables continuas y discretas. La prueba de normalidad para las variables continuas y discretas se realizó utilizando la prueba de Shapiro Wilks. La prueba de t de Student para dos muestras independientes (prueba paramétrica) y la prueba U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica), se emplearon para evaluar la significancia estadística entre las variables discretas y continuas con el estatus del VPH. La asociación de variables categóricas con el estatus del VPH se realizó mediante la prueba exacta de Fisher y la prueba de chi cuadrada de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo $p < 0.05$, con un intervalo de confianza del 95%. Todos los resultados fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism versión 6.

8.- Resultados

8.1.- Clasificación histológica de los tejidos mamarios

Un total de 135 biopsias mamarias fijadas en formol e incluidas en parafina, se recolectaron del banco de muestras del Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular (LPDM). Las muestras eran procedentes de pacientes de sexo femenino, quienes se sometieron a una mastectomía, para tratar o prevenir alguna alteración en la glándula mamaria. Las biopsias se recolectaron entre enero de 2009 y octubre de 2019.

Todas las muestras fueron teñidas con hematoxilina/eosina y analizadas por un especialista en patología, quien emitió el diagnóstico histológico. Las Figuras 5-11 representan microfotografías de los diagnósticos histológicos, asimismo se describen los hallazgos microscópicos. Un total de 130 biopsias mamarias mostraron buena preservación. Las muestras que presentaron lisis por una mala fijación o mal procesamiento en la técnica histológica, fueron excluidas del estudio. Un total de 116 muestras cumplieron los criterios de inclusión. La clasificación histológica de las biopsias mamarias se resume en la Tabla VII, la cual se realizó conforme a la emitida por la OMS (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003; Sinn and Kreipe 2013).

Los resultados histopatológicos de las 116 biopsias de mama mostraron que el 46.6% (54/116) de las muestras correspondieron a neoplasias malignas, el 4.3% (5/116) a neoplasias *in situ*, el 0.9% (1/116) a neoplasias limítrofes y el 17.2% (20/116) a neoplasias benignas. También se diagnosticaron alteraciones benignas o no neoplásicas de la glándula mamaria, las cuales representaron el 21.6% (25/116) de los tejidos analizados. Adicionalmente se obtuvieron muestras de tejido mamario y ganglios linfáticos axilares sin alteración, las cuales representaron el 9.5% (11/116) del total de las muestras (Figura 12). Dentro del análisis, el 50.9% (59/116) de las biopsias mamarias procedieron de pacientes con cáncer (carcinoma *in situ* e invasivo) y el 49.1% (57/116) procedieron de tipos benignos y muestras sin alteración.

La distribución de los tipos de neoplasias malignas fue de 81.5% (44/54) para carcinoma ductal infiltrante, el cual fue el tipo histológico más frecuente, 14.8% (8/54) para carcinoma lobular infiltrante, 1.9% (1/54) para carcinoma mucinoso y 1.9% (1/54) para carcinoma metaplásico (Figura 13-A). La distribución de los tipos de neoplasias benignas fue de 90%

(18/20) para fibroadenoma, el cual fue la neoplasia benigna más frecuente, 5% (1/20) para adenomioepitelioma y 5% (1/20) para papiloma intraductal (Figura 13-B). Respecto a las alteraciones benignas no neoplásicas, el 60% (15/25) de las muestras fueron diagnosticadas como mastopatía fibrosa quística, el 24% (6/25) correspondieron a mastitis y el 16% (4/25) tuvieron hiperplasia (Figura 13-C).

Tabla VII: Clasificación histológica de los tejidos mamarios.

Diagnóstico histológico	n (%)	
<i>Neoplasias malignas</i>	54 (46.6%)	
Carcinoma ductal infiltrante	44	81.5%
Carcinoma lobular infiltrante	8	14.8%
Carcinoma mucinoso	1	1.9%
Carcinoma metaplásico	1	1.9%
		100%
<i>Neoplasias in situ</i>	5 (4.3%)	
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	5	
<i>Neoplasias limítrofe</i>	1 (0.9%)	
Tumor filoides	1	
<i>Neoplasias benignas</i>	20 (17.2%)	
Fibroadenoma	18	90%
Adenomioepitelioma	1	5%
Papiloma intraductal	1	5%
		100%
<i>Alteraciones benignas o no neoplásicas</i>	25 (21.6%)	
Mastopatía fibrosa quística	15	60%
Mastitis	6	24%
Hiperplasia	4	16%
		100%
<i>Tejido mamario sin alteración</i>	11 (9.5%)	
TOTAL	116 (100%)	

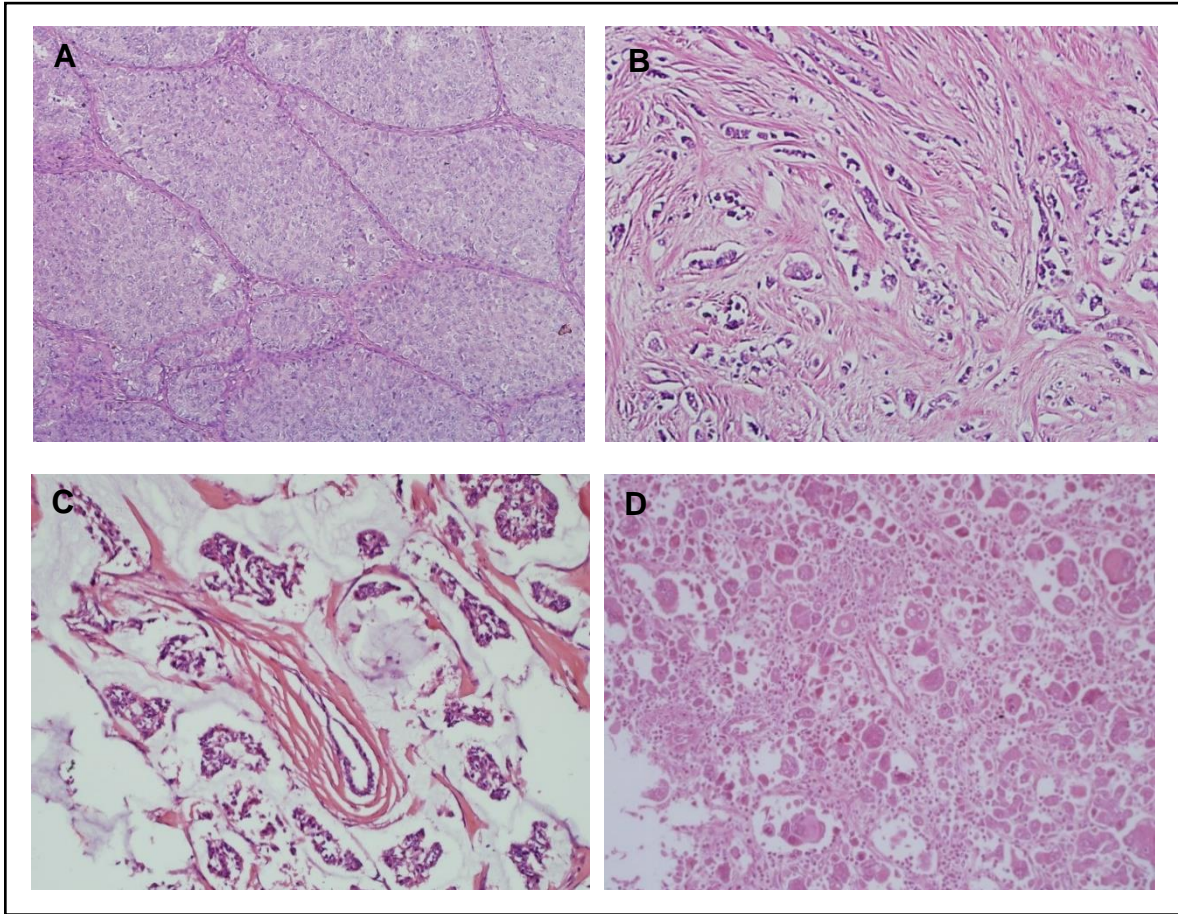


Figura 5: Neoplasias mamarias malignas. (A) Carcinoma ductal infiltrante patrón sólido, separado por septos de tejido conectivo (Objetivo 10X). (B) Carcinoma lobular infiltrante. Se caracteriza por la invasión del estroma en forma de cordones celulares finos, llamada *fila india* (Objetivo 20X). (C) Carcinoma mucinoso. Las células tumorales se aprecian dentro de lagos de mucina (Objetivo 20X). (D) Carcinoma metaplásico (Objetivo 20X). Tinción hematoxilina y eosina.

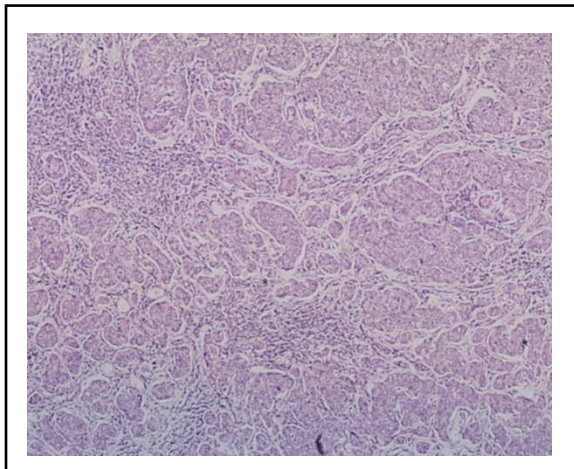


Figura 6: Neoplasia mamaria maligna. Ganglio linfático con metástasis de carcinoma ductal infiltrante (Objetivo 10X). Tinción hematoxilina y eosina.

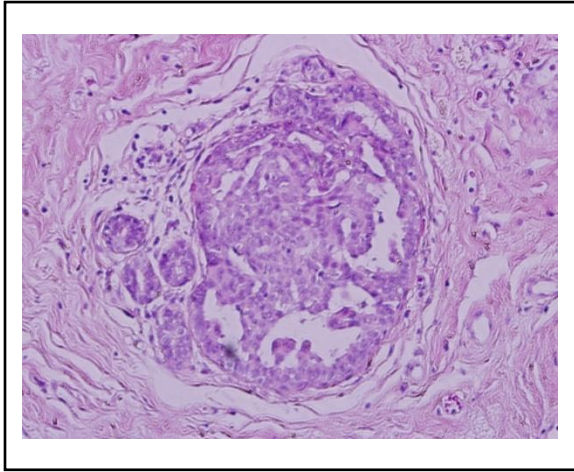


Figura 7: Neoplasia mamaria *in situ*. Carcinoma ductal *in situ*. La membrana basal del conducto está intacta y no existe invasión del estroma (Objetivo 20X). Tinción hematoxilina y eosina.

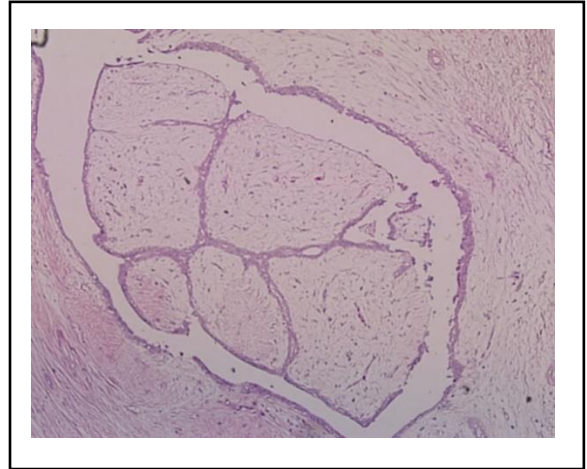


Figura 8: Neoplasia mamaria limítrofe. Tumor filoides. Se observa un adosamiento en forma de hendidura de los ductos formado por células fusiformes. Las células se multiplican siguiendo una forma de hoja (Objetivo 10X). Tinción hematoxilina y eosina.

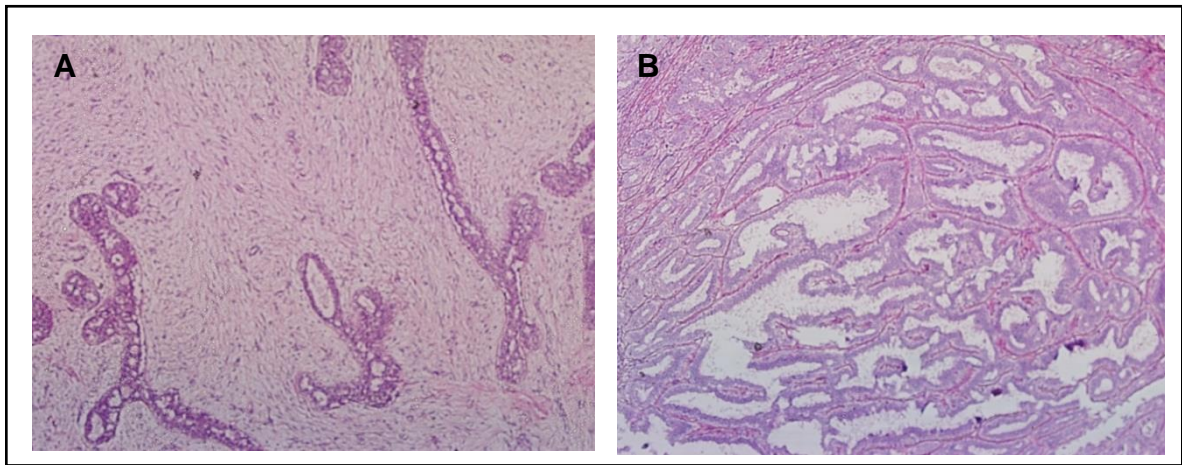


Figura 9: Neoplasias mamarias benignas. (A) Fibroadenoma. Se observa la proliferación de células creando bordes bien delimitados, respecto al tejido normal circundante. (B) Papiloma intraductal. Se observan ductos con formación de estructuras papilares sostenidas por un tallo fibroconectivo. Objetivo 10X. Tinción hematoxilina y eosina.

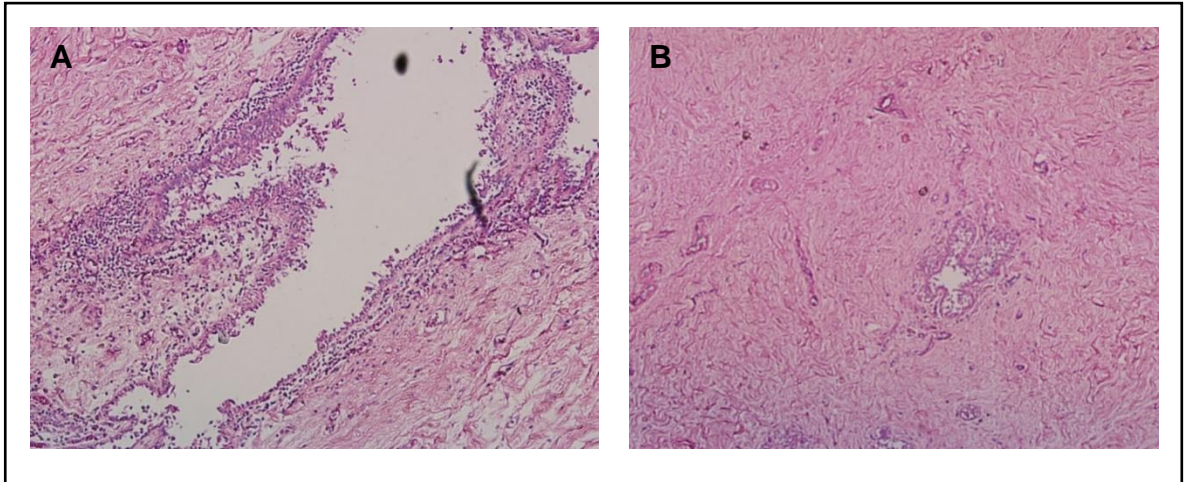


Figura 10: Alteraciones mamarias benignas o no neoplásicas. (A) Mastopatía con hiperplasia. Se observa un ducto con metaplasia apócrina y focos de hiperplasia. (B) Mastopatía fibrosa quística. Se observa tejido fibroso rodeando los ductos. Objetivo 10X. Tinción hematoxilina y eosina.

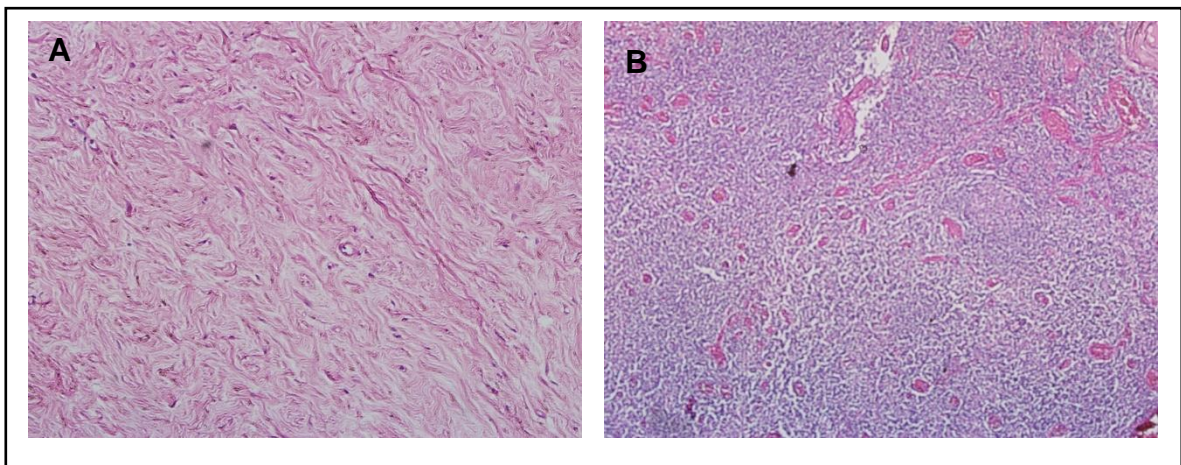


Figura 11: Tejido mamario sin alteración. (A) Tejido mamario. (B) Ganglio linfático. Objetivo 10X. Tinción hematoxilina y eosina.

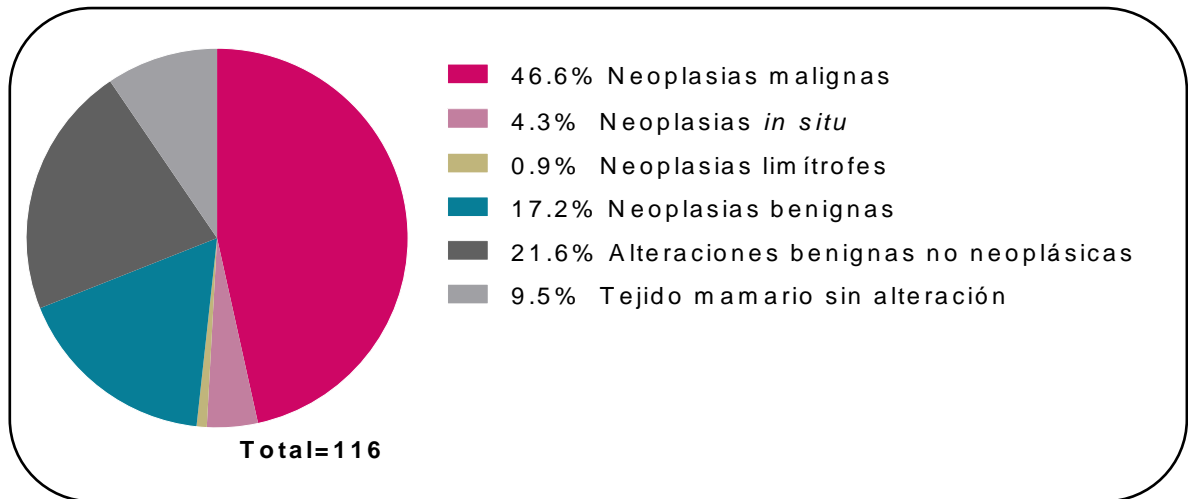


Figura 12: Frecuencia de diagnósticos histológicos en una serie de biopsias mamarias. Los resultados histopatológicos de las 116 biopsias de mama mostraron que el 46.6% de las muestras correspondieron a neoplasias malignas, el 4.3% a neoplasias *in situ*, el 0.9% a neoplasias limítrofes, el 17.2% a neoplasias benignas, el 21.6% a alteraciones benignas no neoplásicas y el 9.5% a biopsias de tejido mamario sin alteración.

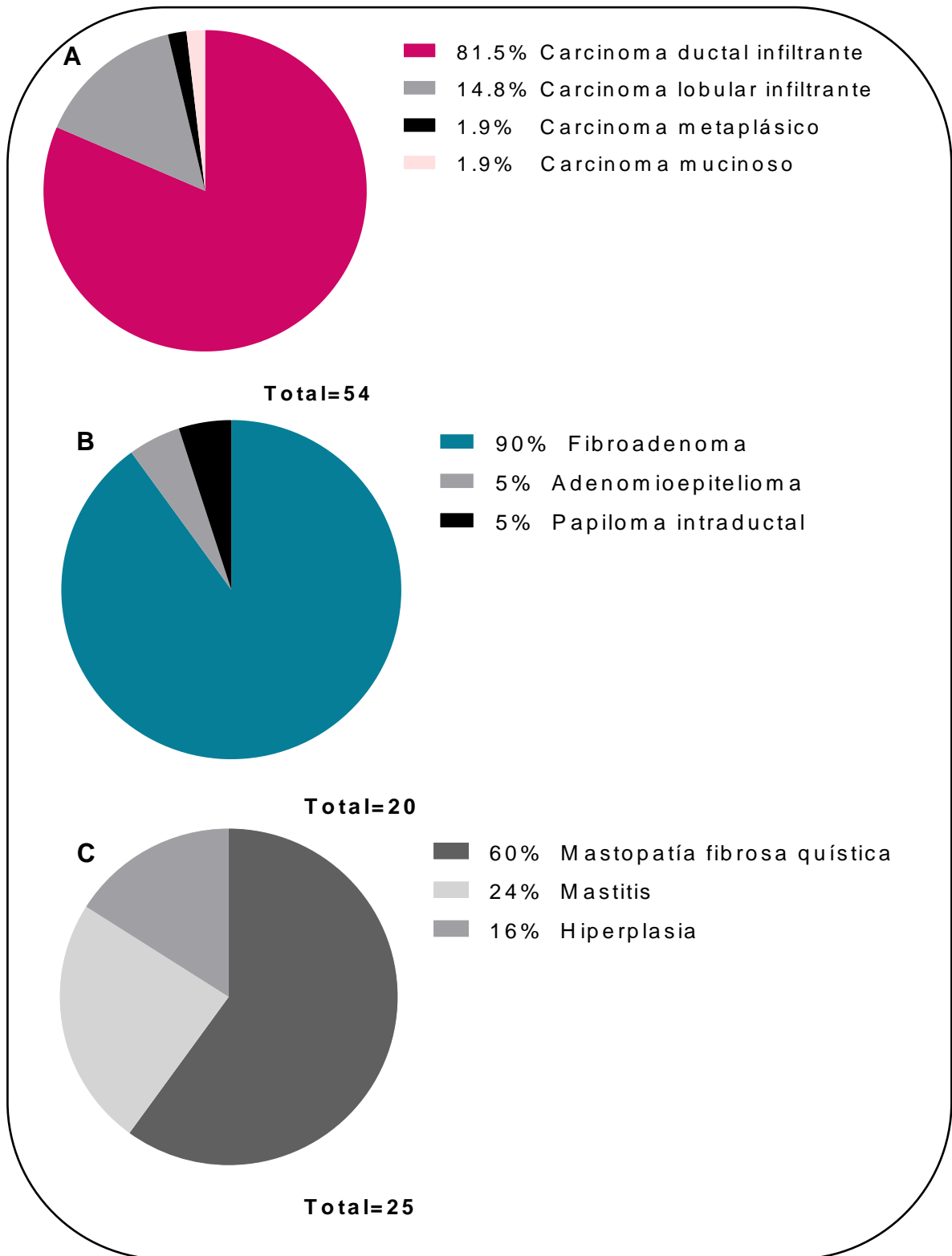


Figura 13: Frecuencia de diagnósticos por tipo histológico en una serie de biopsias mamarias. (A) Tipos histológicos de neoplasias malignas. (B) Tipos histológicos de neoplasias benignas. (C) Tipos histológicos de alteraciones benignas no neoplásicas.

8.2.- Análisis de la calidad del ADN extraído

La integridad, calidad y cantidad del material genético extraído se analizó por espectrofotometría a 260 nm y por la amplificación por PCR de un fragmento de 205 pb del gen humano constitutivo β -globina. La concentración del ADN extraído varió desde 1.66-989ng/ μ l y la pureza en promedio fue de 1.7. En total 116 biopsias mamarias fueron positivas a la amplificación del gen β -globina. Las biopsias que no mostraron la amplificación de β -globina, no fueron incluidas en el estudio. La Figura 14, es una imagen representativa de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, donde se observan las bandas del tamaño esperado (205 pb) correspondientes a la amplificación del gen β -globina.

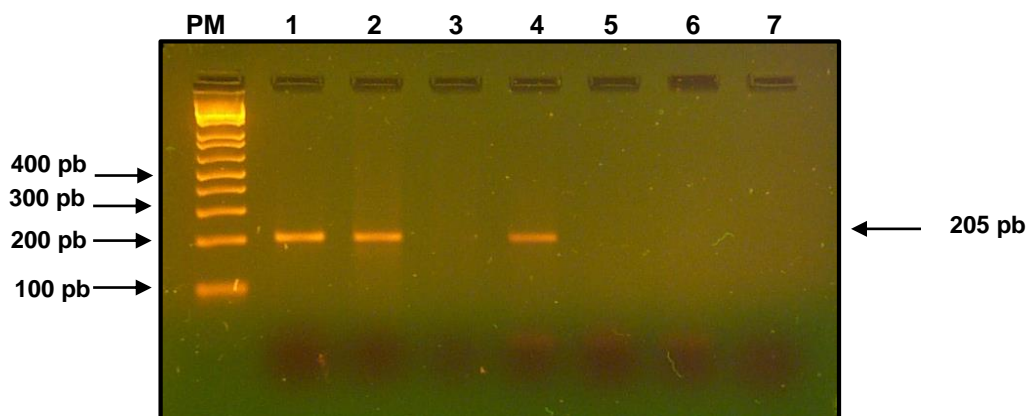


Figura 14: Amplificación del gen β -globina. **PM:** 1Kb Plus DNA Ladder. **Carriles 1-6:** Productos amplificados de muestras de tejidos mamarios. **Carriles 1, 2 y 4:** Amplicones de muestras de ADN de tamaño esperado (205 pb). **Carril 7:** Control negativo de la amplificación. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio.

8.3.- Detección de ADN del VPH

La población de estudio consistió en 116 pacientes con diferentes alteraciones patológicas, cuyas biopsias mamarias fueron recabadas durante un periodo de 10 años (2009-2019). Dos de 116 muestras provinieron de pacientes de sexo masculino. Para confirmar la presencia del ADN del VPH, en este estudio se utilizaron dos variantes de la técnica de PCR; la técnica de PCR en un solo paso (primers GP5+/6+ y MY09/11) y el método de PCR anidada (MY09/11 externo y GP5+/6+ interno). Tanto la PCR convencional como la PCR en tiempo real con SYBR Green se utilizaron en la técnica de PCR anidada.

En general el ADN del VPH se detectó en 31 de 116 muestras de tejido mamario. Se obtuvieron amplicones específicos del VPH en el 13.8% (n=16) cuando se usaron los primers GP5+/6+ en la técnica de PCR de un solo paso. Los resultados de la reacción se muestran en la figura 15, la cual presenta un gel de electroforesis representativo. Una banda de aproximadamente 150 pb se visualizó como producto de la reacción. Por el contrario, cuando se usó el par de primers MY09/11 no se detectó el ADN del virus. La figura 16 es un gel de electroforesis representativo de la amplificación, donde se aprecian muestras negativas a la amplificación del fragmento de 450 pb del gen L1.

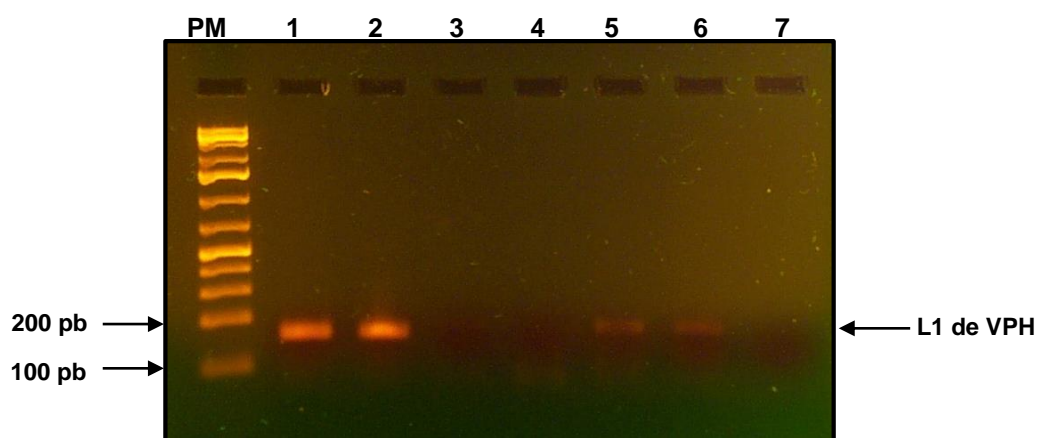


Figura 15: Amplificación del gen L1 del VPH usando el par de primers GP5+/6+. **PM:** 1Kb Plus DNA Ladder. **Carril 1:** Control positivo. Amplicón de células SiHa. **Carril 2:** Control positivo. Amplicón de células CaSki. **Carriles 3-6:** Amplicones de tejidos mamarios. **Carriles 5 y 6:** Amplicones de 150 pb específicos del VPH. **Carril 7:** Control negativo de la amplificación. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X teñidos con bromuro de etidio.

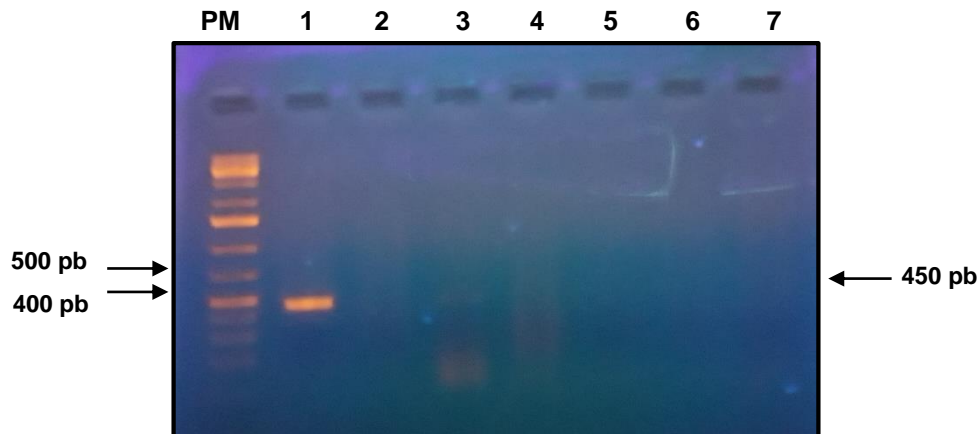


Figura 16: Amplificación del gen L1 del VPH usando el par de primers MY09/11. **PM:** 1Kb Plus DNA Ladder. **Carril 1:** Control positivo. Amplicón de células CasKi. **Carriles 2-6:** Amplicones de tejidos mamarios. **Carril 7:** Control negativo de la amplificación. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio.

Los ensayos de PCR anidada mostraron un incremento en la prevalencia del VPH en comparación al sistema de PCR de un solo paso. La tasa de positividad incrementó al 26.7% (31/116). Los resultados de la PCR anidada usando los primers GP5+/6+ se muestran en las figuras 17 y 18. La figura 17 es una imagen representativa de los resultados por PCR convencional. Una sola banda de aproximadamente 150 pb se visualizaron en los amplicones de tejido mamario. En los controles positivos fueron visibles dos bandas, una de aproximadamente 450 pb y otra de aproximadamente 200 pb. Fueron también visibles otras bandas no específicas. La figura 18 es una imagen representativa de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real usando el mismo par de primers. La curva correspondiente al control positivo amplificó efectivamente y el control negativo no mostró curva de amplificación, lo que indica una amplificación de PCR exitosa.

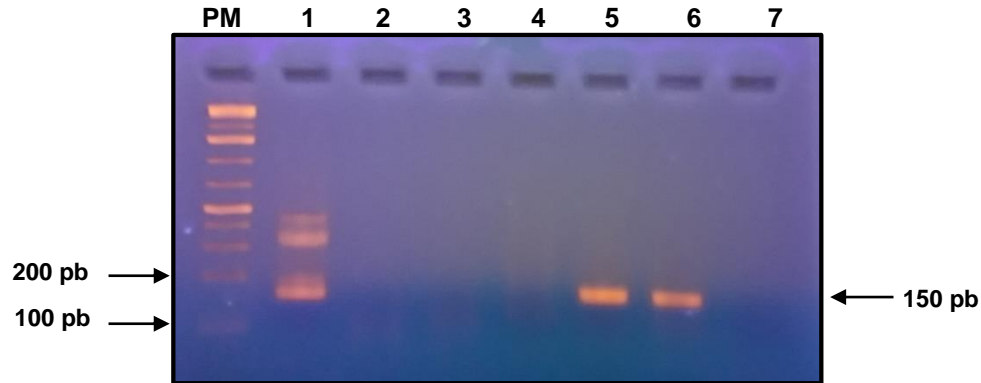


Figura 17: Amplificación del gen L1 del VPH usando el par de primers GP5+/6+ por PCR anidada. **PM:** 1Kb Plus DNA Ladder. **Carril 1:** Control positivo. Amplicón de células CasKi. **Carriles 2-6:** Amplicones de tejidos mamarios. **Carriles 5-6:** Amplicones de 150 pb específicos del VPH. **Carril 7:** Control negativo de la amplificación. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio.

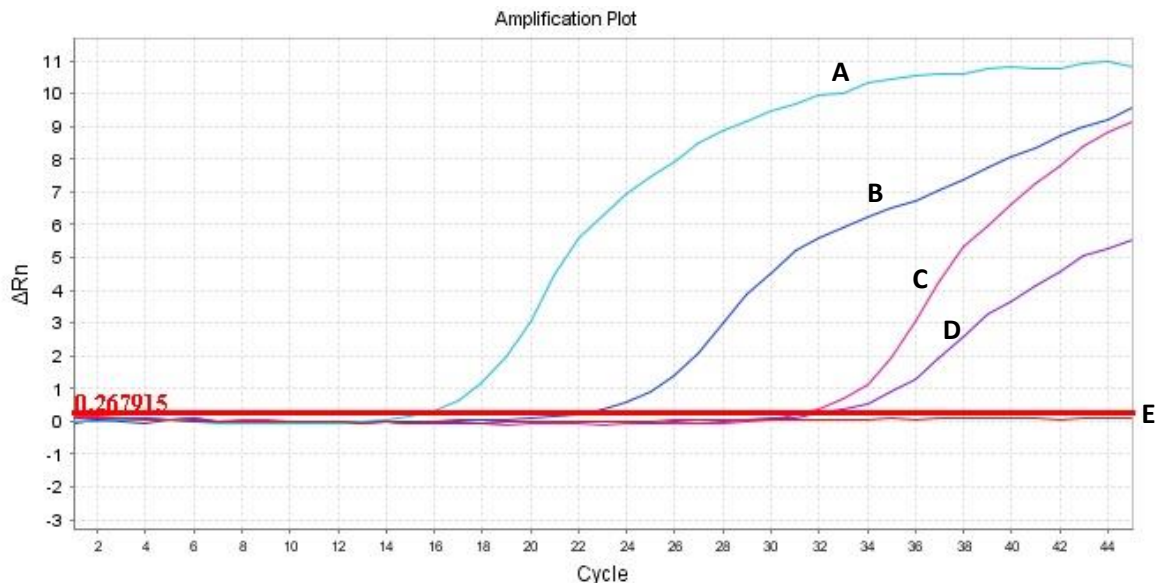


Figura 18: Detección del gen L1 de VPH por PCR en tiempo real con SYBR Green. **Eje X:** Número de ciclos. **Eje Y:** Fluorescencia. **(A)** Control positivo (Amplicón de ADN de la línea celular CaSki). **(B-D)** Amplicones de tejidos mamarios positivos a la amplificación del ADN del VPH. **(E)** Control negativo de la amplificación.

Asimismo se obtuvo el análisis de la temperatura melting o de fusión (T_m) de los productos de PCR anidada después de la amplificación del fragmento de 150 pb del gen L1 del VPH usando los primers GP5+/6+. La figura 19-A muestra la T_m de productos de PCR representativos después de la amplificación. Los resultados se desglosan de forma individual en las siguientes figuras; la 19-A muestra la T_m del control positivo (ADN de células CaSki) el cual presentó $T_m=74.17^\circ\text{C}$, además del control negativo de la amplificación; la figura 19-

B-C representa la curva de fusión de productos de PCR de tejido mamario donde se obtuvieron amplicones específicos del VPH, en la cual se aprecia un pico principal con una $T_m=68.45^\circ\text{C}$ y $T_m=66.2^\circ\text{C}$ respectivamente; por último la figura 19-D muestra la curva de fusión de un producto de PCR de tejido mamario que obtuvo amplicones específicos del VPH y en la cual se aprecian dos picos claramente diferenciados con temperaturas de 73.98°C y 65°C .

La distribución de los tipos histológicos de acuerdo con el estado del VPH se resume en la tabla VIII. El ADN del virus se identificó en el 22.2 % (12/54) de las neoplasias malignas y en el 35% de las neoplasias benignas (7/20). Asimismo se detectó en el 36% (9/25) de las alteraciones benignas no neoplásicas, la cual fue la proporción más alta y en el 27.3% (3/11) de las biopsias de tejido mamario sin alteración. No se detectó en neoplasias *in situ* ni en neoplasias limítrofes.

En relación a las neoplasias malignas el VPH se detectó en el 18.2% (8/44) de las biopsias diagnosticadas como carcinoma ductal infiltrante, en el 25% (2/8) de las biopsias con carcinoma lobular infiltrante y en el 100% (1/1) de los carcinomas mucinoso y metaplásico (Figura 20-B). Respecto a las neoplasias benignas el ADN del virus se identificó únicamente en un tipo histológico, el cual fue el fibroadenoma con una proporción del 38.9% (7/18) (Figura 20-C). Dentro de las alteraciones benignas, el VPH se detectó en el 40% (6/15) de las biopsias con mastopatía fibrosa quística, además en el 50% (3/6) de las biopsias con mastitis (Figura 20-D). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la histología.

Los resultados histopatológicos revelaron que el 50.9% (59/116) de las biopsias (tabla IX), procedieron de pacientes con cáncer (carcinoma *in situ* e invasivo), de los cuales el 20.3% (12/59) fueron positivas a la presencia del ADN del VPH. Respecto a las muestras benignas y sin alteración, el ADN del virus se detectó en el 33.3% (19/57) de las muestras (Figura 21). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos ($p=0.1431$).

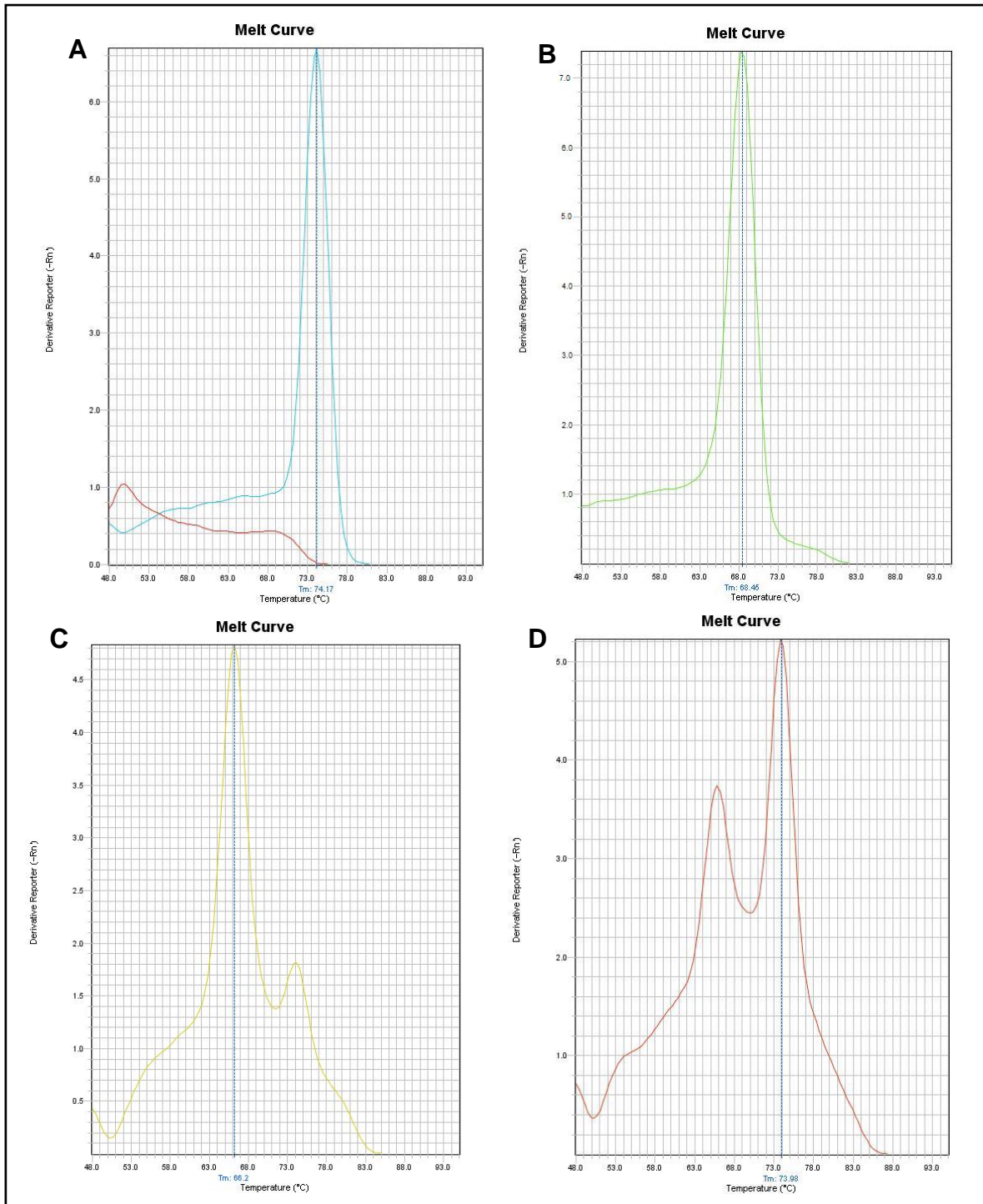


Figura 19: Análisis de la curva de fusión de los productos de PCR después de la amplificación de un fragmento de 150 pb del gel L1 del VPH usando los primers GP5+/6+. Eje Y: diferencial negativo de fluorescencia. Eje X: temperatura (°C). (A) Productos de PCR de ADN de células CaSki ($T_m = 74.17$) y control negativo de amplificación. (B y C) Productos de PCR de biopsias mamarias positivas a la amplificación del gen L1 del VPH ($T_m = 68.45$ y $T_m = 66.2$ respectivamente). (D) Producto de PCR de biopsias mamarias en la cual se apreciaron dos picos claramente diferenciados con temperaturas diferentes ($T_m = 65$ y 73.98).

Tabla VIII: Identificación del VPH de acuerdo a la clasificación histológica de los tejidos mamarios.

Tipo histológico	n	VPH	
		Positivo (n%)	Negativo (n%)
<i>Neoplasias malignas</i>	54	12 (22.2)	42 (77.8)
Carcinoma ductal infiltrante	44	8 (18.2)	36 (81.8)
Carcinoma lobular infiltrante	8	2 (25)	6 (75)
Carcinoma mucinoso	1	1 (100)	0
Carcinoma metaplásico	1	1 (100)	0
<i>Neoplasias in situ</i>	5	0	5 (100)
Carcinoma ductal <i>in situ</i>			
<i>Neoplasias limítrofe</i>	1	0	1 (100)
Tumor filoides			
<i>Neoplasias benignas</i>	20	7 (35%)	13 (65%)
Fibroadenoma	18	7 (38.9)	11 (61.1)
Adenomioepitelioma	1	0	1 (100)
Papiloma intraductal	1	0	1 (100)
<i>Alteraciones benignas o no neoplásicas</i>	25	9 (36%)	16 (64%)
Mastopatía fibrosa quística	15	6 (40)	9 (60)
Mastitis	6	3 (50)	3 (50)
Hiperplasia	4	0	4 (100)
<i>Tejido mamario y ganglio linfático axilar sin alteración</i>	11	3 (27.3)	8 (72.7)
TOTAL	116	31 (26.7)	85 (73.3)

Tabla IX: Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo a la malignidad.

	n	VPH (+)	VPH (-)
<i>Tipos cancerígenos</i>			
Carcinoma ductal infiltrante	44	8	36
Carcinoma lobular infiltrante	8	2	6
Carcinoma metaplásico	1	1	0
Carcinoma mucinoso	1	1	0
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	5	0	5
	59 (100)	12 (20.3%)	47 (79.9%)
	59 (50.9%)		
<i>Tipos benignos y sin alteración</i>			
Tumor filoides	1	0	1
Fibroadenoma	18	7	11
Adenomioepitelioma	1	0	1
Papiloma intraductal	1	0	1
Mastopatía fibrosa quística	15	6	9
Mastitis	6	3	3
Hiperplasia	4	0	4
Tejido mamario y ganglio linfático sin alteración	11	3	10
	57 (100)	19 (33.3%)	38 (66.7%)
	57 (49.1%)		

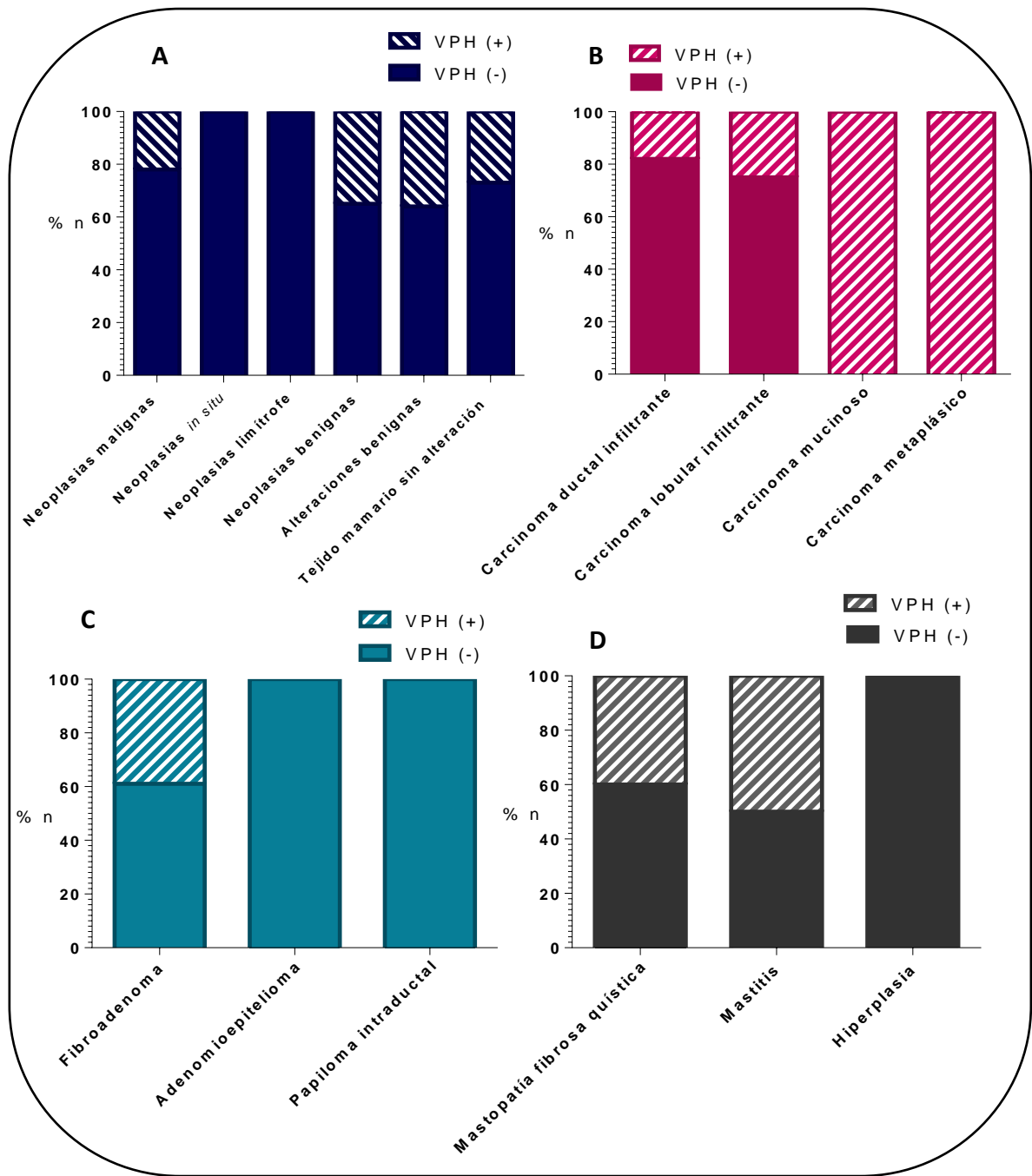


Figura 20: Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo al tipo histológico. (A) Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo a la clasificación histológica según OMS (B) Frecuencia de la identificación del VPH en neoplasias malignas. (C) Frecuencia de la identificación del VPH en neoplasias benignas. (D) Frecuencia de la identificación del VPH en alteraciones benignas no neoplásicas.

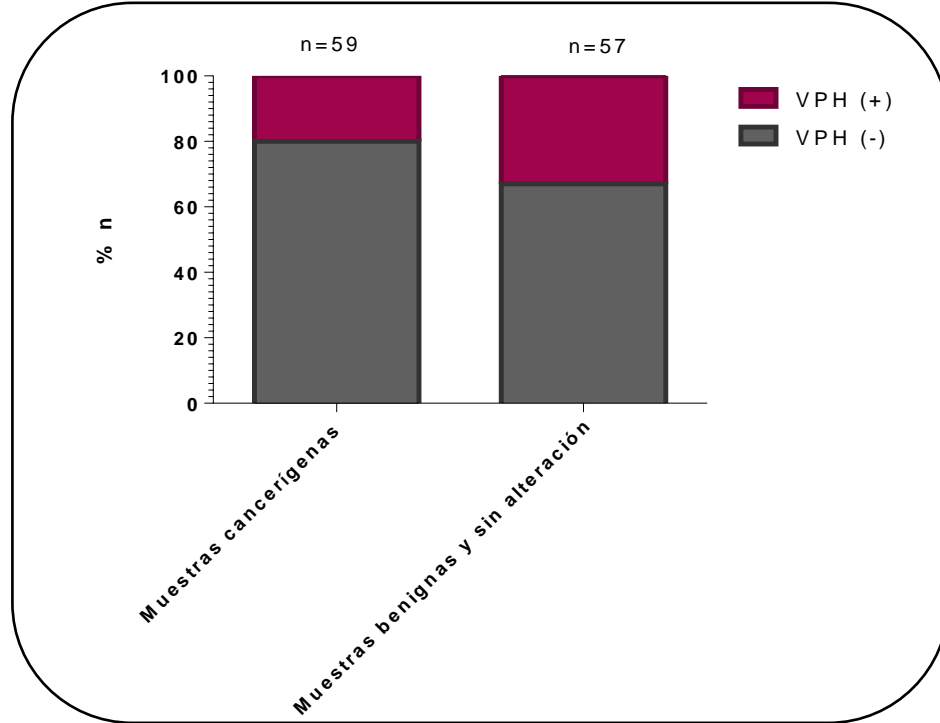


Figura 21: Frecuencia de la identificación del VPH de acuerdo a la malignidad de las muestras mamarias. El ADN del VPH se detectó en el 20.3% de las muestras malignas y en el 33.3% de las muestras benignas.

La edad promedio de los pacientes fue de 48.9 ± 13.1 años (IC 95%=45.8-52.1), en un rango de 17 a 76 años. Los pacientes positivos a la presencia del VPH mostraron una edad media de 46.9 ± 14.4 años (IC 95%=40.4-53.5) (rango de 17 a 74 años), la cual fue muy similar a la edad media de los pacientes negativos 49.8 ± 12.6 (IC 95%=46.2-53.4) (rango de 18-76 años) $p=0.4044$. Las características clínicas se describen en la tabla X.

En cuanto a las neoplasias malignas, la información clínica de 9/54 pacientes no estaba disponible, por lo que el análisis se realizó con (n=45). La mediana del tamaño del tumor fue de 3.5cm (16.0-1.0) (n= 45, IC 95%=3.0-4.0). El tamaño del tumor de las muestras positivas al VPH vario de 1.2 cm a 8.0 cm (n= 11, IC 95%=2.0-7.8). Respecto a las muestras negativas, la variación fue de 1 cm a 16 cm (n= 34, IC 95%=3.0-4.0). El análisis se realizó utilizando el lado más largo del tumor. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del tumor entre los carcinomas positivos y negativos para el VPH ($p=0.6788$).

Tabla X: Relación entre el VPH y los parámetros clinicopatológicos de las biopsias mamarias

	n (%)	VPH		Value p
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Número de muestras	116 (100)	31 (26.7)	85 (73.3)	
Sexo				
Masculino	2 (100)	1 (50)	1 (50)	0.4648 ^a
Femenino	114 (100)	30 (26.3)	84 (73.7)	
Edad (años)				
Edad (años)	48.9 ± 13.1	46.9 ± 14.4	49.8 ± 12.6	0.4044 ^c
IC 95%	(45.8-52.1)	(40.4-53.5)	(46.2-53.4)	
Rango	(17-76)	(17-74)	(18-76)	
Tipo histológico				
Neoplasias malignas	54 (100)	12 (22.2)	42 (77.8)	
Neoplasias in situ	5 (100)	0	5 (100)	
Neoplasias limitrofe	1 (100)	0	1 (100)	
Neoplasias benignas	20 (100)	7 (35)	13 (65)	
Alteraciones benignas no neoplásicas	25 (100)	9 (36)	16 (64)	
Tejido mamario sin alteración	11 (100)	3 (27.3)	8 (72.7)	
Muestras con cáncer	59 (100)	12 (20.3)	47 (79.9)	
Muestras benignas y normales	57(100)	19 (33.3)	38 (66.7)	
Neoplasias malignas	54 (100)	12 (22.2)	42 (77.8)	
Tamaño de tumor (cm)				
Tamaño de tumor (cm)	3.5 (16.0-1.0)	3.5 (8.0-1.2)	3.7 (16.0-1.0)	0.6788 ^d
IC 95%	(3.0-4.0)	(2.0-7.8)	(3.0-4.0)	
Tamaño del tumor (TNM)				
T1 (≤2cm)	11 (100)	3 (27.3)	(72.7)	0.4422 ^b
T2 (>2cm-5cm)	28 (100)	6 (21.4)	22 (78.6)	
T3 (>5cm)	6 (100)	2 (33.3)	4 (66.7)	
No disponible	9	1	8	
Etapa clínica				
EII	39 (100)	9 (23.1)	30 (76.9)	0.6242 ^a
EIII	6 (100)	2 (33.3)	4 (66.7)	
No disponible	9	1	8	
Escala SBR				
Escala SBR	8 (9-4)	8 (9-4)	8 (9-6)	0.2470 ^d
IC 95%	(8-9)	6-9	8-9	
Grado histológico según escala SBR				
3-5: Grado I (Bien diferenciado)	2 (100)	2 (100)	0	
6-7: Grado II (Moderadamente diferenciado)	11 (100)	2 (18.2)	9 (81.8)	
8-9: Grado III (Mal diferenciado)	41 (100)	8 (19.5)	33 (80.5)	

IC= 95%. p= valor de probabilidad. *p<0.05

^a Prueba exacta de Fisher.

^b Prueba χ^2 de Pearson.

^c Prueba de t de Student no pareada.

^d Prueba U de Mann-Whitney

Asimismo se analizó el tamaño del tumor según el sistema de estadificación TNM, donde la categoría T describe el tumor primario. Donde T1, T2, T3, T4 se basan en el tamaño del tumor y en qué medida se ha diseminado a tejidos circundantes. Cuanto más alto es el número T, más grande es el tumor o más tejidos circundantes pueden estar involucrados. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del tumor según el sistema TNM entre los carcinomas positivos y negativos para el VPH ($p=0.4422$).

El puntaje del sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) varió de 4-9 ($n=54$). Respecto a las muestras positivas y negativas al VPH, la variación del SBR fue de 4-9 ($n=11$) y 6-9 ($n=43$) respectivamente. El puntaje del sistema SBR no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los carcinomas positivos y negativos para el VPH ($p=0.2470$). De igual forma se analizó el grado histológico de los carcinomas positivos y negativos para el VPH según el sistema de clasificación SBR. La mayoría de las neoplasias malignas correspondieron a carcinomas mal diferenciados (grado III) (75.9%), el 20.4% eran grado II y una pequeña proporción de neoplasias correspondió al grado I (3.7%). Un total de dos neoplasias malignas mostraron grado 1, de los cuales el 100% (2/2) fueron positivas a la presencia de VPH, siendo la proporción más alta. En cuanto a los carcinomas grado 2, el 18.2% (2/11) mostraron un resultado positivo. En relación a las muestras grado 3, el 19.5% (8/41) fueron positivas.

Por otra parte, la distribución según las etapas tumorales fue del 72.2% (39/45) para la etapa II, y del 11.1% (6/45) para la etapa III. El 23.1% (9/39) de las neoplasias malignas en etapa II fueron positivas a la presencia de VPH, mientras tanto el 33.3% (2/6) de los carcinomas en etapa II fueron positivos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.6242$).

Interesantemente, el 58% (7/12) de las biopsias positivas a la presencia del VPH con alteraciones benignas no neoplásicas y tejido sin alteración, procedieron de mastectomía de pacientes sin neoplasia residual, los cuales anteriormente habían sido diagnosticados con alguna neoplasia maligna mamaria. Además, independientemente con su relación con los carcinomas de mama, un total de dos mujeres tenían antecedentes médicos previos de frotis cervical. Los cambios típicos de la infección por VPH aparecieron en un caso diagnosticado como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (NIC I).

8.4.- Genotipificación del VPH

La genotipificación se realizó en las muestras que confirmaron la amplificación del ADN del gen L1 del VPH. De las 31 muestras analizadas, el 26% (8/31) fueron positivas para al menos un genotipo del VPH utilizando el ensayo LCD-Array HPV-Type 3.5 el cual permite la identificación de 32 tipos del VPH de bajo, intermedio y alto riesgo. Esto permitió la detección de diferentes genotipos simultáneos en una muestra (coinfeción) y genotipos individuales (monoinfección).

La figura 22 es una imagen representativa de la placa LCD, donde el cambio de color en los pozos después de la hibridación indica que la muestra contiene secuencias de alguno de los genotipos del VPH evaluados. Posteriormente se corroboró el resultado de las muestras que mostraron un resultado negativo o no concluyente, utilizando un protocolo de PCR en tiempo real y multiplex basado en primers específicos para diferentes genotipos del VPH; sin embargo, con los primers provistos por el kit no se detectó alguno de los genotipos evaluados.

Los resultados mostraron que el genotipo del VPH más frecuente fue el VPH-42, el cual se identificó en el 19% (6/31) de las muestras analizadas, seguido del VPH-31 (4/31, 13%) y del VPH-59 (3/31, 10%). En menor medida se identificaron el VPH-44 y 58 en el 6% (2/31) de las muestras, y el VPH-51 en el 3% (1/31). La tabla XI muestra la frecuencia de los genotipos del virus, así como las mono y coinfecciones por el VPH.

El 10% (3/31) de todas las muestras positivas al VPH mostraron monoinfección, mientras que el 16% (5/31) presentaron coinfecciones. Se identificaron dos muestras positivas para dos genotipos del virus, VPH58/51 (1/31) y VPH-31/42 (1/31). Se observó que 3/31 muestras fueron positivas para más de dos genotipos, las combinaciones más frecuentes fueron VPH-31/59/42 (2/31), seguido de VPH-42/31/59/44/58 (1/31). Independientemente del número de genotipos detectado por muestra, la coinfección más frecuente fue VPH-42/31 (4/31).

Tabla XI: Genotipos del VPH prevalentes en tejido mamario

Genotipos de VPH analizados	Muestras positivas a algún genotipo del VPH n=8 (26%)
VPH de alto riesgo	
VPH-16	0
VPH-18	0
VPH-31	4 (13%)
VPH-33	0
VPH-35	0
VPH-39	0
VPH-45	0
VPH-51	1 (3%)
VPH-52	0
VPH-58	2 (6%)
VPH-59	3 (10%)
VPH-68	0
VPH de bajo riesgo	
VPH-6 y 11	0
VPH-42	6 (19%)
VPH-44	2 (6%)
Genotipo no detectado n=23	

	Tipo histológico	Genotipos del VPH detectados
Genotipo único n=3 (10%)	Carcinoma mucinoso	44
	Fibroadenoma	42
	Mastitis	42
Genotipo múltiple n=5 (16%)	Fibroadenoma	58+51
	Fibroadenoma	31+42+59
	Mastopatía fibrosa quística	31+59+42
	Mastopatía fibrosa quística	31+42
	Mastitis	42+31+59+44+58

Tabla XII: Comparación de la frecuencia de genotipos del VPH entre especímenes mamarios benignos o si alteración y malignos

Tipo histológico	Muestras positivas a algún genotipo	VPH de alto riesgo												VPH de bajo riesgo			
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	58	59	68	6,11	42	44	
Maligno n=12 (%)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (8%)
Benigno y sin alteración n=19 (%)	7	-	-	4 (21%)	-	-	-	-	1 (5%)	-	2 (11%)	3 (16%)	-	-	6 (32%)	1 (5%)	
Total=31	8																
Genotipo no detectado n=23																	

Tabla XIII: Frecuencia de genotipos del VPH en diferentes tipos histológicos de mama malignos

Tipo histológico	Muestras positivas a algún genotipo	VPH de alto riesgo												VPH de bajo riesgo			
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	58	59	68	6,11	42	44	
Carcinoma ductal infiltrante n=9 (%)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcinoma lobular infiltrante n=1 (%)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcinoma mucinoso n=1 (%)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (100%)	
Carcinoma metaplásico n=1 (%)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL=12	1																
Genotipo no detectado n=8																	

Tabla XIV: Frecuencia de genotipos del VPH en diferentes tipos histológicos de mama benignos y sin alteración

Tipo histológico	Muestras positivas a algún genotipo	VPH de alto riesgo												VPH de bajo riesgo		
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	58	59	68	6,11	42	44
Fibroadenoma n=7 (%)	2	-	-	1 (14%)	-	-	-	-	1 (14%)	-	1 (14%)	1 (14%)	-	-	2 (29%)	-
Mastopatía fibrosa quística n=6 (%)	2	-	-	2 (33%)	-	-	-	-	-	-	-	1 (17%)	-	-	2 (33%)	-
Mastitis n=3 (%)	2	-	-	1 (33%)	-	-	-	-	-	-	1 (33%)	1 (33%)	-	-	2 (67%)	1 (33%)
Tejido sin alteración n=3 (%)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL=19	6															
Genotipo no detectado n=13																

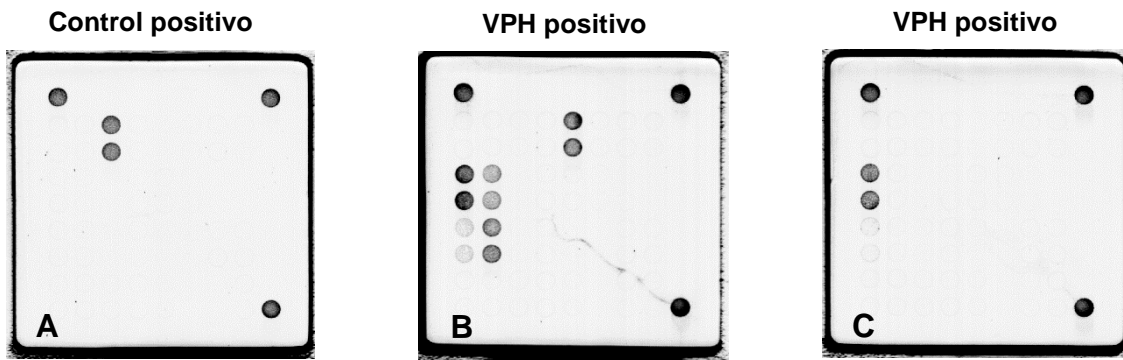


Figura 22: Genotipificación de secuencias del VPH presentes en muestras de tejido mamario por hibridación utilizando el ensayo LCD-Array HPV-Type 3.5. La imagen muestra la placa LCD para la detección de diferentes genotipos del VPH. El cambio de color en los pozos después de la hibridación indica que la muestra de tejido mamario contiene secuencias de alguno de los genotipos del VPH evaluados. (A) Control positivo. ADN de línea celular SiHa el cual es positivo para el genotipo 16. (B) Muestra representativa positiva para cinco genotipos diferentes del VPH. (C) Muestra representativa positiva para un genotipo del VPH.

En cuanto a las características histopatológicas de las biopsias mamarias y su asociación con la presencia de genotipos de alto y bajo riesgo del VPH, los resultados se muestran en las tablas XII-XIV, los cuales indicaron que en neoplasias malignas el único genotipo detectado fue el VPH-44 de bajo riesgo (1/12, 8%) en una biopsia de carcinoma mucinoso. No se identificaron genotipos del VPH de alto riesgo en muestras malignas. En neoplasias benignas y muestras sin alteración, se identificaron genotipos de alto y bajo riesgo, el de bajo riesgo más prevalente fue el VPH-42 (6/19, 32%), seguido del VPH-44 (1/19, 5%). Respecto a los genotipos de alto riesgo el tipo más frecuente fue el VPH-31 (4/19, 21%), seguido del VPH-59 (3/19, 16%), VPH-58 (2/19, 11%) y en menor medida se detectó al VPH-51 (1/19, 5%).

En biopsias con fibroadenoma se identificaron 5 genotipos diferentes de alto y bajo riesgo, el genotipo más prevalente fue el VPH-42 en el 29% de las biopsias, seguido de los genotipos de alto riesgo VPH-31, 51, 58 y 59 con una prevalencia del 14%. Respecto a las muestras con mastitis se identificaron 5 genotipos de alto y bajo riesgo, el genotipo más frecuente fue el VPH-42 (67%), seguido de los genotipos de alto y bajo riesgo VPH-31, 58, 59 y 44 con una prevalencia del 33%. En muestras con mastopatía fibrosa quística los genotipos de alto y bajo riesgo VPH-31 y 42 (33%) fueron los más frecuentes y en menor proporción se identificó al VPH-59 (17%).

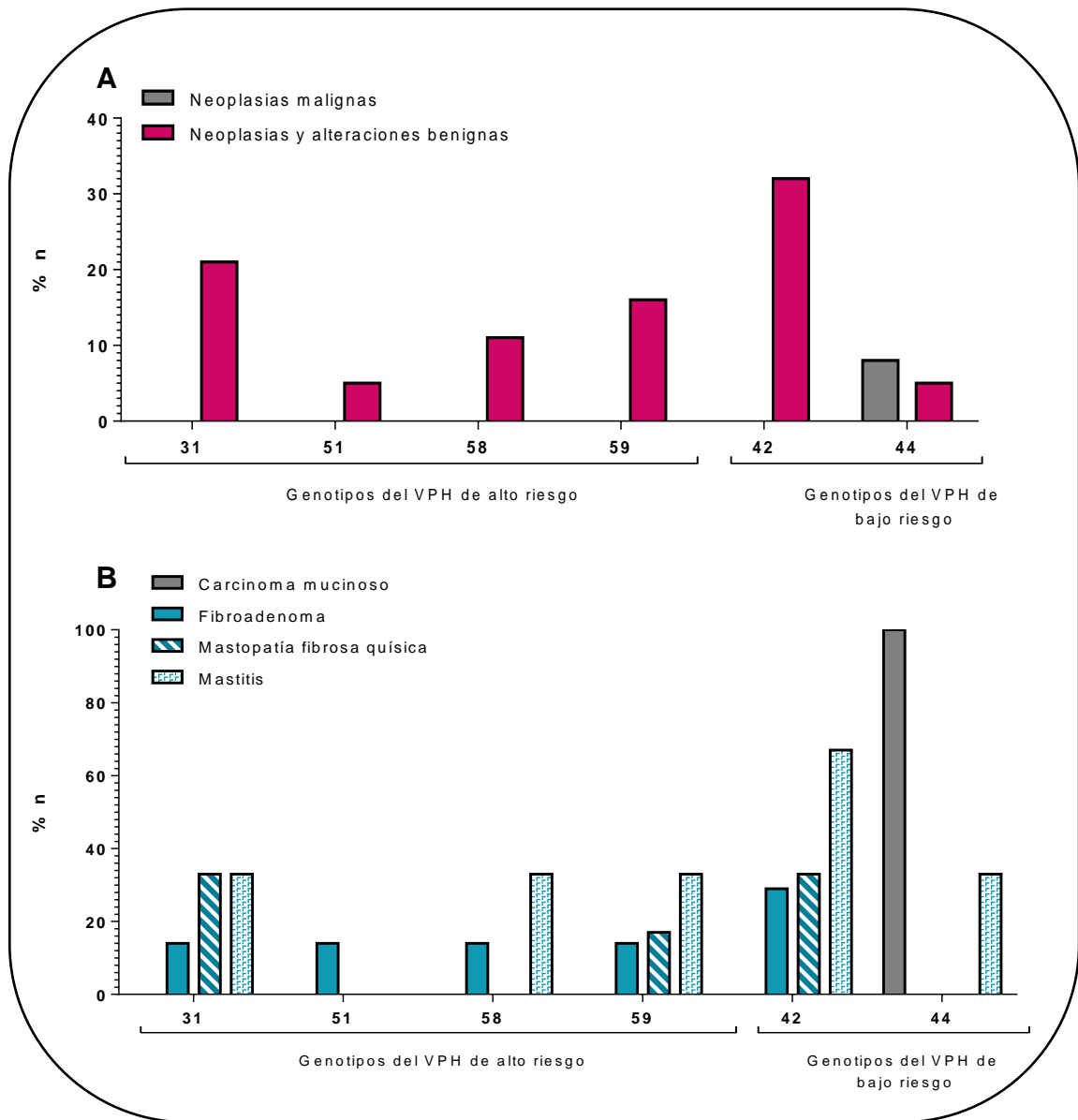


Figura 23: Distribución y prevalencia de genotipos de alto y bajo riesgo del VPH en neoplasias malignas, benignas y alteraciones benignas mamarias. El gráfico ilustra la prevalencia de cada uno de los genotipos del VPH detectados en tejido mamario maligno y benigno. **(A)** Únicamente el VPH-44 de bajo riesgo se detectó en neoplasias malignas con una prevalencia del 8%. En neoplasias y alteraciones benignas el genotipo más frecuente fue el VPH-42 con una prevalencia del 32%, seguido del VPH-31 (21%), VPH-59 (16%), VPH-58 (11%) y en menor proporción se detectaron los genotipos VPH-51 y 44 con una prevalencia del 5% cada uno. **(B)** En biopsias con fibroadenoma se identificaron 5 genotipos diferentes de alto y bajo riesgo, el más prevalente fue el VPH-42 (29%), seguido de los genotipos de alto riesgo VPH-31, 51, 58 y 59 con una prevalencia del 14%. Respecto a las muestras con mastitis se identificaron 5 genotipos de alto y bajo riesgo, el más frecuente fue el VPH-42 (67%) seguido de los genotipos VPH-31, 58, 59 y 44 con una prevalencia del 33%. En muestras con mastopatía fibrosa quística los genotipos de alto y bajo riesgo VPH-31 y 42 fueron más frecuentes y en menor proporción se identificó al VPH-59 (17%).

8.5.- Detección de proteínas del VPH en tejido mamario

Para mayor corroboración, se realizó una colección de muestras aleatorias equivalente al 32% del número total de muestras positivas a la presencia del ADN del VPH, para la detección de la proteína L1 del VPH usando un protocolo de inmunohistoquímica. Sin embargo, en el análisis no se observó la expresión de la proteína L1 en ninguna de las muestras analizadas de tejido mamario positivas al VPH, se identificaron secuencias del VPH pero no se expresó la proteína L1 del VPH.

La figura 22-A representa la expresión de la proteína L1 del VPH visualizada por inmunohistoquímica en una neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC I), la cual se analizó como control positivo. La inmunotinción positiva se mostró en gran medida en el núcleo de las células infectadas y ocasionalmente se observó en el citoplasma de células coilocíticas. En la imagen se aprecia el epitelio plano estratificado con atipia coilocítica, la cual es una manifestación característica de la infección por el VPH. La figura 22-B representa una inmunohistoquímica de una lesión intraepitelial cervical escamosa de bajo grado (NIC I) sin anticuerpo primario, representando al control negativo. La figura 22-C es una imagen representativa de la tinción de inmunohistoquímica en neoplasias mamarias malignas (carcinoma ductal infiltrante) positivas al ADN del VPH, en la cual no se observó la expresión de la proteína L1 del virus. La figura 22-D es una imagen representativa de la tinción de inmunohistoquímica en neoplasias mamarias benignas (fibroadenoma) positivas al ADN del VPH, donde de igual manera no se observó expresión de la proteína L1 del VPH. Tampoco se observó la presencia de células coilocíticas en ninguna de las muestras de tejido mamario.

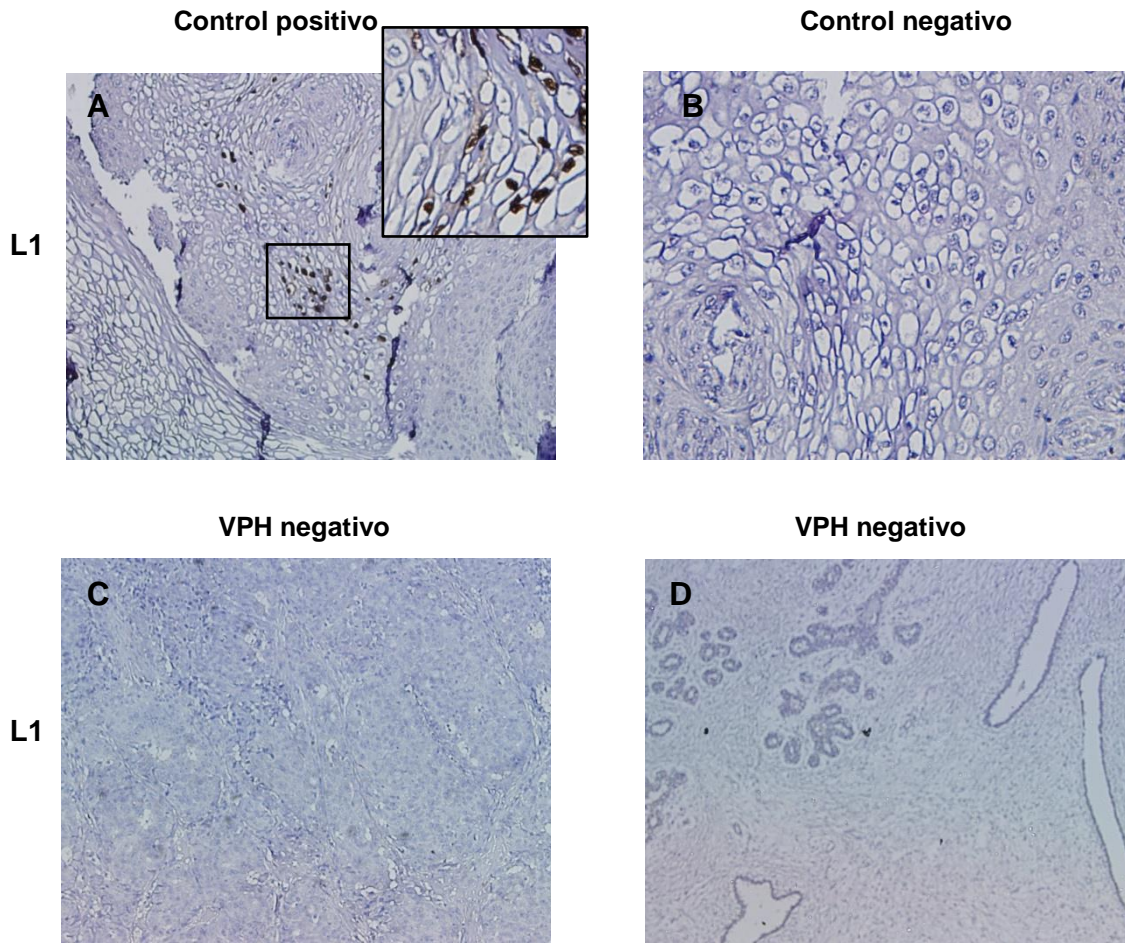


Figura 24: Expresión nuclear de la proteína L1 del VPH demostrado por inmunohistoquímica. La tinción café de la proteína L1 es positiva, la tinción azul es negativa. **(A)** Lesión intraepitelial cervical escamosa de bajo grado (NIC I) positiva al VPH por inmunohistoquímica representando al control positivo, donde se observa epitelio plano estratificado con atipia coilocítica e irregularidad nuclear (Objetivo 20X). **(B)** Tinción de inmunohistoquímica de una lesión intraepitelial cervical escamosa de bajo grado (NIC I) sin anticuerpo primario representando al control negativo (Objetivo 40X) **(C)** Tinción de inmunohistoquímica de un carcinoma ductal infiltrante negativo a la expresión de la proteína L1 del VPH (Objetivo 10X). **(D)** Tinción de inmunohistoquímica de un fibroadenoma negativo a la expresión de la proteína L1 del VPH (Objetivo 20X).

9.-Discusión

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres en todo el mundo y la carga mundial está aumentando notablemente. Esto enfatiza la importancia de identificar nuevos factores de riesgo etiológicos que estén asociados con el desarrollo del cáncer de mama (Salman et al. 2017). Los carcinógenos biológicos como las infecciones virales desempeñan un papel importante en la iniciación del cáncer, ya que contribuyen a aproximadamente del 18-20% de los carcinomas. El ciclo de vida, las características oncogénicas y la evidencia molecular del VPH de alto riesgo, sugieren un papel causal del cáncer de mama (zur Hausen 2009). La asociación del VPH de alto riesgo con cáncer cervical y varios tipos de cáncer está bien establecida; sin embargo, la implicación de que la infección por VPH es un factor de riesgo para la carcinogénesis del cáncer de mama sigue siendo un tema controvertido (Heng et al. 2009).

En este estudio se evaluó la presencia del ADN del VPH en tejidos mamarios con patologías malignas y benignas, así como en tejidos sanos. El 46.6% de las biopsias mamarias analizadas correspondió a neoplasias malignas, de las cuales los resultados histopatológicos mostraron que el 81.5% de las muestras correspondieron a carcinoma ductal infiltrante. Este resultado es consistente con otros estudios donde reportan una frecuencia aproximada del 60-80% para este tipo de neoplasia, convirtiéndola en la neoplasia maligna mayormente diagnosticada (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003). Por otra parte el carcinoma lobular invasivo comprende aproximadamente del 5-15% de los carcinomas mamarios (Rakha et al. 2008) y en este estudio fue la segunda neoplasia maligna más frecuente (14.8%). El carcinoma mucinoso representa del 1-4% de todos los carcinomas mamarios (Naqos et al. 2016) y en este trabajo mostró una frecuencia del 1.9%. Respecto al carcinoma metaplásico, representa menos del 1% de las neoplasias malignas (Eble, Tavassoli, and Devilee 2003) y de acuerdo con este trabajo, representó el 1.9%.

Los resultados del análisis de la presencia del VPH mostraron que el ADN del virus se identificó en el 26.7% (31/116) de las muestras de tejido mamario. El porcentaje de detección obtenido se encuentra dentro de la frecuencia de positividad publicada en el mundo, la cual oscila del 1.2-86% (Tabla III) (Malhone, Longatto-Filho, and Filassi 2018).

Los resultados de este estudio muestran la presencia del ADN del VPH en el 20.3% (12/59) de los tipos histológicos cancerígenos, los cuales validan los hallazgos de otros autores en diferentes regiones geográficas del mundo (Tabla III). Respecto a las neoplasias malignas los resultados obtenidos indican que la prevalencia del VPH fue mayor entre mujeres con carcinoma lobular infiltrante 25% (2/8) y en menor medida en carcinoma ductal infiltrante 18.2% (8/44). Esta observación es consistente con otros informes que destacaron una proporción más alta de positividad del VPH en pacientes con carcinoma lobular invasivo, pero tasas más bajas de prevalencia del VPH en otros tipos histológicos (Kouloura et al. 2018). En contraste, Salman *et al*, informaron que la prevalencia del VPH fue mayor entre mujeres con carcinoma ductal invasivo y menor en carcinoma lobular (Salman et al. 2017). Otro hallazgo importante en este estudio fue la detección del ADN del VPH en 1/1 muestra de carcinoma metaplásico. Este resultado apoya la investigación previa de Herrera *et al*, quienes concluyen que en pacientes mexicanos la prevalencia de infección del VPH es mayor en carcinomas de mama metaplásico, al igual que la carga viral (Herrera-Goepfert et al. 2013).

En cuanto a los genotipos identificados en las muestras malignas y benignas, en este trabajo el genotipo más frecuente fue el VPH-42. Este genotipo se clasifica como de bajo riesgo por tener un bajo potencial oncogénico (zur Hausen 2002). Un estudio realizado en Brasil identificó los genotipos de bajo riesgo VPH-6 y 11 como los más recurrentes en muestras de tipo maligno y benigno (Cavalcante et al. 2018). De manera similar un estudio realizado en U.S.A identificó al VPH-6 y 11 como los genotipos más frecuentes, el cual involucraba lesiones mamarias malignas y su correspondiente complejo areola-pezon (de Villiers et al. 2005).

En neoplasias malignas el único genotipo detectado fue el VPH-44 de bajo riesgo (1/12, 8%). Otros estudios también indicaron una mayor frecuencia de genotipos de bajo riesgo en carcinomas mamarios, siendo los genotipos más prevalentes el 6 y 11 (Tabla III) (Balci, Uras, and Feldman 2019; Manzouri et al. 2014; Ahangar-Oskouee et al. 2014; Sigaroodi et al. 2012; Kroupis et al. 2006; Pereira Suarez et al. 2013).

Es importante tener en cuenta que este estudio detectó la presencia de ADN del VPH en el 33.3% (19/57) de las muestras de tejido mamario benigno y sin alteración. Esta observación

es consistente con los hallazgos de otros estudios de diferentes áreas geográficas que informaron que el 32%, el 31% y el 17.6% de los tejidos benignos fueron positivos en las poblaciones turca, británica y australiana, respectivamente (Gumus et al. 2006; Heng et al. 2009; Salman et al. 2017). Sin embargo, a diferencia de los resultados del presente estudio, los análisis realizados en Francia, China e Irán no detectaron al VPH en muestras de tejido mamario benigno (de Cremoux et al. 2008; Li, Ding, and Zhai 2015; Ahangar-Oskouee et al. 2014).

En este estudio el 38.9% (7/18) de las muestras de fibroadenomas fueron positivas a la presencia del ADN del virus. Resultados similares fueron obtenidos por Liang *et al.*, quienes detectaron 13 genotipos del VPH de alto riesgo en el 16.2% (6/37) de las muestras con este tipo histológico. (Liang et al. 2013). Otro hallazgo interesante fue detectar la presencia del ADN del VPH en biopsias sin tumor residual con patologías benignas, procedentes de pacientes anteriormente diagnosticados con cáncer. Previamente, Herrera *et al.*, detectaron al VPH en muestras de lecho tumoral sin neoplasia residual de pacientes sometidos a quimioterapia y radioterapia (Herrera-Goepfert et al. 2011).

Respecto a las neoplasias benignas y muestras con alteraciones benignas el genotipo de bajo riesgo más prevalente fue el VPH-42 (6/19, 32%), seguido del genotipo de alto riesgo VPH-31 (4/19, 21%). Estos resultados concuerdan con otros estudios los cuales detectaron genotipos de alto y bajo riesgo en muestras benignas (Manzouri et al. 2014; Salman et al. 2017). Sin embargo, ningún otro estudio ha identificado al genotipo de bajo riesgo VPH-42 en especímenes mamarios.

La detección del VPH en muestras de mama benignas requiere estudios adicionales para comprender la presencia del virus en este tipo de muestras. Algunos autores han especulado la posibilidad de infecciones con genotipos de bajo riesgo con potencial oncogénico bajo, o bien, los casos benignos podrían desarrollarse posteriormente a cáncer de mama con la presencia adicional de genotipos de alto riesgo aunado a otros factores. Por lo que concluyen que si el VPH está involucrado como factor de riesgo y agente etiológico del cáncer de mama, se espera que existan algunos tejidos mamarios benignos o sin alteración patológica positivos al VPH y por lo tanto hace necesario el seguimiento de los pacientes individuales (Salman et al. 2017; Liang et al. 2013).

Existe un amplio rango de distribución de genotipos en tejido mamario, dependiendo de la región geográfica. Estudios previos en México identificaron al VPH-16, 18 y 33 (Herrera-Goepfert et al. 2013; de Leon et al. 2009; Mendizabal-Ruiz et al. 2009). En un metanálisis realizado por Zhou *et al.*, el cual incluyó 38 estudios, determinaron que los cinco genotipos más comunes en cáncer de mama en orden decreciente de prevalencia son el VPH-16, 33, 11, 18 y 6. Clasificados según sus características oncogénicas, la prevalencia de los tipos de VPH de alto riesgo fue mayor respecto a los de bajo riesgo (Zhou et al. 2015). Sin embargo, en este estudio no se identificaron ninguno de estos genotipos, y la prevalencia de los genotipos de bajo riesgo fue mayor.

Los resultados mostraron que las coinfecciones con múltiples genotipos del VPH fueron más frecuentes que las monoinfecciones en la población analizada. Independientemente del número de genotipos detectados por muestra, la coinfección más frecuente fue VPH-42/31 y ésta se presentó en muestras benignas. En algunos países, la tasa de coinfección por VPH es menos frecuente que la monoinfección (Akil et al. 2008; Sher et al. 2020; Bonlokke et al. 2018). Sin embargo, no se ha evaluado la hipótesis de que el genotipo del VPH prefiera coinfectar con genotipos específicos. La coinfección por VPH en lesiones genitales es frecuente tanto en hombre como mujeres, pero su importancia clínica es aún incierta. Algunos autores consideran que la coinfección aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de cérvix (Campos et al. 2019; Gallegos-Bolaños et al. 2017).

De acuerdo con este trabajo el 73.3% (85/116) de las muestras analizadas no mostraron la presencia de ADN del VH. La ausencia del ADN del virus podría indicar que la infección por VPH ha sido eliminada por el sistema inmunológico o que la infección viral está en el inicio de la replicación, la cual puede persistir después de un largo periodo de tiempo y progresar a cáncer bajo la presencia de otros factores (Salman et al. 2017).

Se considera que las discrepancias en los resultados publicados sobre la prevalencia del VPH en el tejido mamario pueden ser atribuidas al muestreo, a los protocolos del procesamiento de las muestras, método del ensayo, primers utilizados, tamaño de la muestra, diferentes niveles de expresión del VPH y a la variación de la prevalencia de infecciones por VPH en las diferentes poblaciones (Malhone, Longatto-Filho, and Filassi 2018; Wang et al. 2012).

La diferencia en la positividad del VPH entre los estudios puede explicarse en parte por la diversidad metodológica. Además de que algunos estudios han sugerido que la carga viral del VPH en el cáncer de mama es baja (Glenn et al. 2012; Khan et al. 2008). Una vez que ocurre la transformación de las células, la replicación viral se detiene y se produce la integración del genoma viral en el huésped (zur Hausen 2009). Bajo estas circunstancias, la cantidad de copias del VPH disminuye bruscamente y se ha demostrado que después de la integración, la replicación del VPH disminuye (Wang et al. 2012). Por lo que la elección del método de detección y la sensibilidad son factores importantes a considerar, ya que influyen en la tasa de detección del VPH (Wang et al. 2012).

Esto sugiere que la baja prevalencia en algunos estudios es el resultado de una baja sensibilidad (Bonlokke et al. 2018). Por lo que en este estudio se utilizaron dos variantes de la técnica de PCR con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método y disminuir el riesgo de falsos negativos. Se obtuvieron amplicones específicos del VPH en el 13.8% (16/116) de las muestras cuando se analizaron por PCR en un solo paso, mientras que con el enfoque de PCR en tiempo real la tasa de positividad incrementó al 26.7% (31/116).

La diferencia en la prevalencia del VPH entre los estudios también puede explicarse por resultados falsos positivos, donde la contaminación es un punto crucial. Por lo que los estudios deben tener un enfoque en el control de la contaminación (Bonlokke et al. 2018). Los usos de la PCR plantean preocupaciones con respecto a los resultados falsos positivos derivados de una posible contaminación (Malhone, Longatto-Filho, and Filassi 2018). Sin embargo, como ya se describió en los métodos, el presente estudio tuvo un procedimiento estricto en términos de control de calidad y según los resultados no había señales de contaminación.

En el presente estudio se obtuvo el análisis de la temperatura de fusión de los productos amplificados por PCR anidada usando los primers GP5+/6+. Cada producto tiene una temperatura específica, que depende principalmente de la longitud del fragmento y de su composición en nucleótidos. Debido a que las longitudes del VPH-16 y 18 son muy similares, no es imposible diferenciar los tipos en un gel de electroforesis después de la amplificación por PCR. Por el contrario el análisis de la curva de fusión puede distinguir entre los productos de la misma longitud pero diferente GC:AT, por lo que los diferentes genotipos del VPH

pueden ser diferenciados incluso cuando hay una diferencia considerable en el número de copias (Cubie et al. 2001).

El uso de primers de amplio espectro frente a primers específicos ha creado controversia, debido a que los primers de amplio rango se dirigen a la secuencia del gen L1 del VPH que puede perderse durante la integración del virus en el genoma del huésped (Damin et al. 2004). En cambio los genes E6 y E7, además de que pueden mantenerse, estas secuencias exhiben menos nucleótidos de variación (Morris 2005). Por otro lado, si la muestra no contiene el genotipo específico del primer, el resultado será falso negativo (Damin et al. 2004). Por tal motivo en el presente trabajo se utilizaron primers de amplio espectro y primers específicos para 11 genotipos diferentes del VPH.

Se ha sugerido que los viriones del VPH en los tejidos embebidos en parafina pueden ser destruidos durante la fijación y el procesamiento de la muestra, por lo que el VPH puede ser difícil de detectar en estos tejidos, los cuales se han conservado durante largos periodos de tiempo (Malhone, Longatto-Filho, and Filassi 2018). Por lo que algunos autores sugieren que los tejidos frescos pueden tener una mayor tasa de detección del VPH en comparación con muestras embebidas en parafina (Bonlokke et al. 2018); sin embargo, algunos trabajos sugieren que la baja carga viral no es resultado de la fijación e inclusión de las muestras, ya que se han detectado cargas virales superiores en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina que en tejidos frescos congelados de cáncer cervical (Khan et al. 2008).

Aunque hemos demostrado la presencia del ADN del VPH de bajo y alto riesgo en muestras benignas y malignas, no se confirmó la expresión de la proteína L1 del VPH por el método de inmunohistoquímica. En lesiones cervicales, la proteína L1 de la cápside se encuentra en displasias leves a moderadas, pero se pierde en neoplasias intraepiteliales de alto grado (Zertuche-Zuani et al. 2013). Esto debido a que la prevalencia de las formas integradas del VPH crece con el aumento de la gravedad de la enfermedad y a la integración le sigue una disminución de la carga viral y por lo tanto disminuye la expresión de genes tardíos (Gupta and Mania-Pramanik 2019). Estudios recientes han demostrado que la mayoría (86-100) del genoma del VPH está presente en el tejido mamario de forma integrada (Islam, Chakraborty, and Panda 2020). Esto explicaría la razón del porqué no se detectó en neoplasias malignas mamarias.

Algunos autores concluyen que si el VPH está involucrado como factor de riesgo y agente etiológico del cáncer de mama, se espera que existan algunos tejidos mamarios benignos o sin alteración patológica positivos al VPH que podrían progresar a una enfermedad maligna (Liang et al. 2013); sin embargo, no se identificó la proteína L1 en lesiones benignas positivas al ADN del VPH. Esto pudo deberse al bajo número de muestras analizadas, al bajo nivel de expresión del VPH o podría indicar que la infección ha sido eliminada por el sistema inmunológico.

Hasta la fecha, el mecanismo de infección por VPH en la mama es incierto, por lo que se consideran las siguientes dos hipótesis: (1) La infección hematológica se muestra por la presencia de células mononucleares portadoras del VPH aisladas de mujeres con cáncer cervical (Pao et al. 1997), de niños infectados por el VIH (Bodaghi et al. 2005) y donantes sanos (Chen et al. 2009). Además, se informó la presencia de HPV-16 en neoplasias mamarias de pacientes con antecedentes de lesiones cervicales causadas por este tipo viral (Widschwendter et al. 2004; Hennig et al. 1999), estos hallazgos sugieren que la transformación maligna es el resultado de una transfección de células de un tumor primario por el flujo del plasma (Fernandes et al. 2015), o que los viriones de VPH pueden ser transportados desde el sitio de la infección inicial a otros órganos (Salman et al. 2017); sin embargo, se necesitan más investigaciones para concluir que el VPH de la glándula mamaria se origina en el cuello uterino o en otro órgano infectado por el VPH (Hennig et al. 1999; Lawson, Glenn, and Whitaker 2016). Otros autores concluyen que debido a que el ciclo de vida del VPH se produce en las capas epiteliales, la viremia en el torrente sanguíneo no es un evento posible (Herrera-Goepfert et al. 2013; Fernandes et al. 2015). Otros autores consideran al ADN del VPH como un marcador tumoral que se puede detectar en la sangre de los pacientes infectados para su seguimiento clínico, al analizar y detectar ADN circulante del VPH en un grupo de pacientes con carcinomas asociados al VPH con las técnicas de PCR digital y biopsia líquida (Carolis et al. 2018; Jeannot et al. 2016).

(2) La infección a través de la piel del pezón, como se demuestra en el trabajo de Villiers *et al.*, (2005) donde proponen un patrón ductal retrógrado de la propagación viral (de Villiers et al. 2005). La exposición de los conductos mamarios al entorno externo aumenta el riesgo de infección por VPH, ya que los conductos mamarios son conductos abiertos y podría

representar un punto de entrada para la infección por el virus, además la mayoría de las neoplasias mamarias se originan a partir de epitelio de estas estructuras (Wang et al. 2012). La transmisión sexual es la ruta de transmisión generalmente aceptada, aunque parece no ser la única, ya que algunos estudios sugieren que la transmisión puede ocurrir a través del contacto con las manos desde el perineo femenino hasta la glándula mamaria lo que podría ocurrir durante la actividad sexual, o a través del contacto de fluidos corporales con las fisuras del pezón, que sirven como punto de entrada para el VPH y en combinación con otros factores, puede favorecer la inmortalización celular (Delgado-Garcia et al. 2017). Sobre la base de esta idea, algunos investigadores postularon a la leche materna como una de las principales vías de transmisión del virus, con las células epiteliales de la mama como el sitio de infección latente (Glenn et al. 2012).

Los tipos de VPH oncogénicos del género alfa, utilizan una red compleja de proteínas para su endocitosis y transporte celular que está organizado por un subconjunto específico de tetraspaninas, anexinas y sus proteínas asociadas tales como integrinas y los EGFRs (Mikulicic and Florin 2019). Las integrinas son los principales receptores de la matriz extracelular y también participan en algunas interacciones célula-célula (Taddei et al. 2003). Se ha propuesto que la integrina $\alpha 6$ es uno de los principales receptores del VPH-16 (Yoon et al. 2001; Herrera-Goepfert et al. 2011). En el tejido mamario las integrinas $\alpha 6$ son moléculas importantes reguladoras del crecimiento y diferenciación de las células epiteliales. Su capacidad para promover el anclaje celular, la proliferación, la supervivencia, la migración y la inducción de la activación de enzimas degradadoras de la matriz extracelular, sugieren que juegan un papel esencial en la morfogénesis mamaria normal, pero por otro lado, revela su potencial para promover la progresión tumoral (Taddei et al. 2003; Herrera-Goepfert et al. 2011).

Recientemente varios estudios se han centrado en la enzima citidina desaminasa APOBEC3B (A3B), como una fuente de mutaciones asociadas con múltiples tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, cabeza y cuello, cuello uterino, vejiga, pulmón, ovario y otros tejidos (Burns et al. 2013; Gwak et al. 2014). Esta enzima pertenece a una familia de proteínas que tienen amplias funciones en la inmunidad innata mediante la restricción de virus, transposones y otros elementos de ADN extraños. Por lo que algunos autores han sugerido un posible papel

de A3B en las infecciones virales inducidas por VPH y VEB (Fernandes et al. 2015). Los niveles de expresión de A3B son bajos en la mayoría de los tejidos sanos; sin embargo, Vieira *et al* (2014) demostraron que la regulación positiva del ARN de A3B es directamente inducida por la proteína E6 del VPH de alto riesgo. Luego se probó en muestras de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, donde se informó sobre la sobreexpresión de A3B en tumores positivos al VPH (Vieira et al. 2014).

Ohba *et al.*, (2014), realizaron un estudio similar, pero en la línea celular MCF10A (glándula mamaria), transfectadas con VPH-18, para determinar si el VPH puede ser el punto de partida de la carcinogénesis en el cáncer de mama mediante la sobreexpresión de A3B, permitiendo mutaciones, desregulación del ciclo celular y posteriores transformaciones. Sus resultados mostraron que la infección por VPH induce una regulación positiva del ARNm de A3B y las células infectadas presentaron un fenotipo más maligno que las células parentales, ya que la sobreexpresión de A3B causó la formación de focos de γ H2AX y ruptura del ADN. Estos fenotipos malignos fueron interrumpidos por ARNsh a E6, E7 de VPH y A3B. Estos resultados sugieren una participación activa del VPH en la etapa temprana de la carcinogénesis del cáncer de mama, a través de la inducción de A3B (Ohba et al. 2014).

10.-Conclusión

Se evaluó la presencia del ADN del VPH en tejidos mamarios con patología maligna como benigna. El 46.6% de las biopsias mamarias analizadas correspondió a neoplasias malignas; siendo el carcinoma ductal infiltrante el más frecuente con un 81.5%. El fibroadenoma fue la neoplasia benigna más común (90%); mientras la mastopatía fibrosa quística representó a las alteraciones benignas no neoplásicas.

Los resultados sugieren la presencia del ADN del VPH en el 26.7% de las muestras analizadas y que su presencia fue más frecuente en alteraciones histopatológicamente no malignas; sin embargo, no se detectó una asociación significativa en el grado de malignidad, el diagnóstico clínico-patológico y el grado de diferenciación celular entre las muestras positivas y negativas para el VPH.

Se identificó una prevalencia inusual del genotipo de bajo riesgo VPH-42 en tejido mamario con patologías benignas, seguido del genotipo de alto riesgo VPH-31. La coinfección entre genotipos del VPH fue más frecuente que la mono infección en la población analizada. No se identificaron genotipos de alto riesgo en tejidos mamarios diagnosticados con neoplasias malignas. Con base en los resultados obtenidos la hipótesis de este trabajo se rechaza.

La presencia del VPH en tejido mamario no es suficiente condición para establecer un papel etiológico viral en el desarrollo de cáncer de mama o alguna patología mamaria; sin embargo, los resultados suscitan un gran interés en la intervención del VPH en patologías mamarias como posible copartícipe mediante una patogénesis molecular distinta a la de otras neoplasias asociadas al VPH.

11.-Perspectivas

La presencia de secuencias virales del VPH de alto y bajo riesgo resalta la importancia de estudios adicionales. Se requiere analizar un mayor número de muestras, especialmente de pacientes con antecedentes de neoplasia cervical, utilizando técnicas moleculares sensibles para la identificación de ADN del VPH. Además de la detección de la expresión de las proteínas oncogénicas E6/E7. Adicionalmente es necesario utilizar metodologías de secuenciación para conocer el genotipo de las muestras positivas al ADN del VPH que no mostraron alguno de los genotipos evaluados.

El seguimiento de los pacientes individuales positivos a la presencia del VPH también es trascendente, especialmente de pacientes con alteraciones benignas de la mama las cuales podrían progresar a una enfermedad maligna. Por otra parte la evaluación del VPH en el plasma sanguíneo de pacientes con alteraciones mamarias, podría ser un indicador de la diseminación de células infectadas con el VPH desde un sitio primario de infección.

La correlación de la presencia del VPH con diferentes tipos de cáncer de mama según su clasificación molecular, son de gran repercusión para conocer si el VPH está asociado a un perfil molecular específico. Así como la evaluación del posible mecanismo por el cual el VPH induce o promueve la carcinogénesis mamaria.

La participación del VPH en la carcinogénesis del cáncer de mama, o en alguna patología mamaria, tendría importantes repercusiones clínicas. Un desarrollo importante sería que las vacunas contra el VPH serían protectoras no solo para el cáncer cervical, sino también contra el cáncer de mama.

12.-Referencias

- Ahangar-Oskouee, M., S. Shahmahmoodi, S. Jalilvand, M. Mahmoodi, A. A. Ziaee, H. A. Esmaeili, M. Keshtvarz, L. Pishraft-Sabet, M. Yousefi, Y. Mollaei-Kandelous, T. Mokhtari-Azad, and R. Nategh. 2014. "No detection of 'high-risk' human papillomaviruses in a group of Iranian women with breast cancer." *Asian Pac J Cancer Prev* 15 (9):4061-5. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.9.4061.
- Akil, N., A. Yasmeen, A. Kassab, L. Ghabreau, A. D. Darnel, and A. E. Al Moustafa. 2008. "High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study." *Br J Cancer* 99 (3):404-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6604503.
- Angulo, M. Martín, M. Arroyo Yustos, M. L. Villalobos León, and M. Álvarez de Mon Soto. 2013. "Cáncer de mama." *Medicine-programa de formación médica continuada acreditado* 11 (27):1629-1640.
- Antinore, M. J., M. J. Birrer, D. Patel, L. Nader, and D. J. McCance. 1996. "The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors." *Embo j* 15 (8):1950-60.
- Axel, R., J. Schlom, and S. Spiegelman. 1972. "Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumour virus RNA." *Nature* 235 (5332):32-6.
- Balci, F. L., C. Uras, and S. M. Feldman. 2019. "Is human papillomavirus associated with breast cancer or papilloma presenting with pathologic nipple discharge?" *Cancer Treat Res Commun* 19:100122. doi: 10.1016/j.ctarc.2019.100122.
- Baltzell, K., G. C. Buehring, S. Krishnamurthy, H. Kuerer, H. M. Shen, and J. D. Sison. 2012. "Limited evidence of human papillomavirus in [corrected] breast tissue using molecular in situ methods." *Cancer* 118 (5):1212-20. doi: 10.1002/cncr.26389.
- Band, V., J. A. De Caprio, L. Delmolino, V. Kulesa, and R. Sager. 1991. "Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells." *J Virol* 65 (12):6671-6.
- Baretta, Z., S. Mocellin, E. Goldin, O. I. Olopade, and D. Huo. 2016. "Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis." *Medicine (Baltimore)* 95 (40):e4975. doi: 10.1097/md.0000000000004975.
- Bittner, John J. 1942. "Possible relationship of the estrogenic hormones, genetic susceptibility, and milk influence in the production of mammary cancer in mice." *Cancer research* 2 (10):710-721.
- Bloom, H. J., and W. W. Richardson. 1957. "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." *Br J Cancer* 11 (3):359-77. doi: 10.1038/bjc.1957.43.
- Bodaghi, S., L. V. Wood, G. Roby, C. Ryder, S. M. Steinberg, and Z. M. Zheng. 2005. "Could human papillomaviruses be spread through blood?" *J Clin Microbiol* 43 (11):5428-34. doi: 10.1128/jcm.43.11.5428-5434.2005.
- Bonlokke, S., J. Blaakaer, T. Steiniche, E. Hogdall, S. G. Jensen, A. Hammer, E. Balslev, M. L. Strube, H. Knakkegaard, and S. Lenz. 2018. "Evidence of No Association Between Human Papillomavirus and Breast Cancer." *Front Oncol* 8:209. doi: 10.3389/fonc.2018.00209.

- Bratthauer, G. L., F. A. Tavassoli, and T. J. O'Leary. 1992. "Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18." *Pathol Res Pract* 188 (3):384-6. doi: 10.1016/s0344-0338(11)81229-x.
- Brewer, Hannah R., Michael E. Jones, Minouk J. Schoemaker, Alan Ashworth, and Anthony J. Swerdlow. 2017. "Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure." *Breast cancer research and treatment* 165 (1):193-200.
- Brower, V. 2004. "Accidental passengers or perpetrators? Current virus-cancer research." *J Natl Cancer Inst* 96 (4):257-8. doi: 10.1093/jnci/96.4.257.
- Burns, M. B., L. Lackey, M. A. Carpenter, A. Rathore, A. M. Land, B. Leonard, E. W. Refsland, D. Kotandeniya, N. Tretyakova, J. B. Nikas, D. Yee, N. A. Temiz, D. E. Donohue, R. M. McDougale, W. L. Brown, E. K. Law, and R. S. Harris. 2013. "APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer." *Nature* 494 (7437):366-70. doi: 10.1038/nature11881.
- Campos, Rafael Gutiérrez, Angélica Malacara Rosas, Elvia Gutiérrez Santillán, Mireya Delgado Gutiérrez, Rusland Enrique Torres Orozco, Elí Daniel García Martínez, Luis Fernando Torres Bernal, and Alejandro Rosas Cabral. 2019. "Unusual prevalence of high-risk genotypes of human papillomavirus in a group of women with neoplastic lesions and cervical cancer from Central Mexico." *PloS one* 14 (4):e0215222.
- Carolis, Sabrina De, Alice Pellegrini, Donatella Santini, Claudio Ceccarelli, Antonio De Leo, Federica Alessandrini, Chiara Arienti, Sara Pignatta, Anna Tesei, and Vilma Mantovani. 2018. "Liquid biopsy in the diagnosis of HPV DNA in breast lesions." *Future microbiology* 13 (2):187-194.
- Cavalcante, José Roosevelt, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro, Paulo Roberto Carvalho de Almeida, Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, Gizele Almada Cruz, Thales Alves Campelo, Caroliny Soares Silva, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima, Bruno Masato Kitagawa de Oliveira, and Lara Mulato Lima. 2018. "Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence." *Clinics* 73.
- Chang, P., T. Wang, Q. Yao, Y. Lv, J. Zhang, W. Guo, L. Wang, and J. Chen. 2012. "Absence of human papillomavirus in patients with breast cancer in north-west China." *Med Oncol* 29 (2):521-5. doi: 10.1007/s12032-011-9945-5.
- Chen, A. C., A. Keleher, M. A. Kedda, A. B. Spurdle, N. A. McMillan, and A. Antonsson. 2009. "Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors." *J Med Virol* 81 (10):1792-6. doi: 10.1002/jmv.21592.
- Chen, M. J., W. Y. Wu, A. M. Yen, J. C. Fann, S. L. Chen, S. Y. Chiu, H. H. Chen, and S. T. Chiou. 2016. "Body mass index and breast cancer: analysis of a nation-wide population-based prospective cohort study on 1 393 985 Taiwanese women." *Int J Obes (Lond)* 40 (3):524-30. doi: 10.1038/ijo.2015.205.
- Choi, J., C. Kim, H. S. Lee, Y. J. Choi, H. Y. Kim, J. Lee, H. Chang, and A. Kim. 2016. "Detection of Human Papillomavirus in Korean Breast Cancer Patients by Real-Time Polymerase Chain Reaction and Meta-Analysis of Human Papillomavirus and Breast Cancer." *J Pathol Transl Med* 50 (6):442-450. doi: 10.4132/jptm.2016.07.08.
- Cubie, H. A., A. L. Seagar, E. McGoogan, J. Whitehead, A. Brass, M. J. Arends, and M. W. Whitley. 2001. "Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18." *Molecular Pathology* 54 (1):24.

- Cóppola, Francisco, José Nader, and Rafael Aguirre. 2005. "Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama." *Revista Médica del Uruguay* 21 (1):15-22.
- Damin, A. P., R. Karam, C. G. Zettler, M. Caleffi, and C. O. Alexandre. 2004. "Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas." *Breast Cancer Res Treat* 84 (2):131-7. doi: 10.1023/B:BREA.0000018411.89667.0d.
- De Carolis, S., G. Storci, C. Ceccarelli, C. Savini, L. Gallucci, P. Sansone, D. Santini, R. Seracchioli, M. Taffurelli, F. Fabbri, F. Romani, G. Compagnone, C. Giuliani, P. Garagnani, M. Bonafè, and M. Cricca. 2019. "HPV DNA Associates With Breast Cancer Malignancy and It Is Transferred to Breast Cancer Stromal Cells by Extracellular Vesicles." *Front Oncol* 9:860. doi: 10.3389/fonc.2019.00860.
- de Cremoux, P., M. Thioux, I. Lebigot, B. Sigal-Zafrani, R. Salmon, and X. Sastre-Garau. 2008. "No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma." *Breast Cancer Res Treat* 109 (1):55-8. doi: 10.1007/s10549-007-9626-4.
- De La Madrid, Miguel. 2014. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigacion para la salud. Consultado.
- de Leon, D. C., D. P. Montiel, J. Nemcova, I. Mykyskova, E. Turcios, V. Villavicencio, L. Cetina, A. Coronel, and O. Hes. 2009. "Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients." *BMC Cancer* 9:26. doi: 10.1186/1471-2407-9-26.
- de Roda Husman, A. M., J. M. Walboomers, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, and P. J. Snijders. 1995. "The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR." *J Gen Virol* 76 (Pt 4):1057-62. doi: 10.1099/0022-1317-76-4-1057.
- de Villiers, E. M., R. E. Sandstrom, H. zur Hausen, and C. E. Buck. 2005. "Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast." *Breast Cancer Res* 7 (1):R1-11. doi: 10.1186/bcr940.
- Delgado-Garcia, S., J. C. Martinez-Escoriza, A. Alba, T. A. Martin-Bayon, H. Ballester-Galiana, G. Peiro, P. Caballero, and J. Ponce-Lorenzo. 2017. "Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study." *BMC Cancer* 17 (1):320. doi: 10.1186/s12885-017-3308-3.
- Di Lonardo, A., A. Venuti, and M. L. Marcante. 1992. "Human papillomavirus in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 21 (2):95-100.
- DiMaio, D., and D. Mattoon. 2001. "Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins." *Oncogene* 20 (54):7866-73. doi: 10.1038/sj.onc.1204915.
- Dimri, G., H. Band, and V. Band. 2005. "Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models." *Breast Cancer Res* 7 (4):171-9. doi: 10.1186/bcr1275.
- Eble, John N., Fattaneh A. Tavassoli, and Peter Devilee. 2003. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*: Iarc.
- Elston, C. W., and I. O. Ellis. 1991. "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 19 (5):403-10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
- Evans, M. F., C. S. Adamson, L. Simmons-Arnold, and K. Cooper. 2005. "Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration

- support the sensitive detection of human papillomavirus." *BMC Clin Pathol* 5:10. doi: 10.1186/1472-6890-5-10.
- Fernandes, A., G. Bianchi, A. P. Feltri, M. Perez, and M. Correnti. 2015. "Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors." *Ecancermedicalscience* 9:548. doi: 10.3332/ecancer.2015.548.
- Fernandes, A., A. Pesci-Feltri, I. Garcia-Fleury, M. Lopez, V. Guida, M. De Macedo, and M. Correnti. 2018. "Lymphocyte subsets predictive value and possible involvement of human papilloma virus infection on breast cancer molecular subtypes." *World J Clin Oncol* 9 (7):123-132. doi: 10.5306/wjco.v9.i7.123.
- Frazer, Ian H. 2004. "Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination." *Nature Reviews Immunology* 4 (1):46.
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 1997. "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." *Genes Dev* 11 (16):2090-100. doi: 10.1101/gad.11.16.2090.
- Furmanski, P., C. Longley, D. Fouchey, R. Rich, and M. A. Rich. 1974. "Normal human mammary cells in culture: evidence for oncornavirus-like particles." *J Natl Cancer Inst* 52 (3):975-7. doi: 10.1093/jnci/52.3.975.
- Gallegos-Bolaños, Jazbet, Jessica Alejandra Rivera-Domínguez, José Miguel Presno-Bernal, and Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana. 2017. "High prevalence of co-infection between human papillomavirus (HPV) 51 and 52 in Mexican population." *BMC cancer* 17 (1):1-8.
- Gannon, O. M., A. Antonsson, I. C. Bennett, and N. A. Saunders. 2018. "Viral infections and breast cancer—A current perspective." *Cancer letters* 420:182-189.
- Giordano, Sharon H., Aman U. Buzdar, and Gabriel N. Hortobagyi. 2002. "Breast cancer in men." *Annals of internal medicine* 137 (8):678-687.
- Glenn, W. K., B. Heng, W. Delprado, B. Iacopetta, N. J. Whitaker, and J. S. Lawson. 2012. "Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer." *PLoS One* 7 (11):e48788. doi: 10.1371/journal.pone.0048788.
- Glenn, W. K., N. J. Whitaker, and J. S. Lawson. 2012. "High risk human papillomavirus and Epstein Barr virus in human breast milk." *BMC Res Notes* 5:477. doi: 10.1186/1756-0500-5-477.
- Gopalkrishna, V., U. R. Singh, P. Sodhani, J. K. Sharma, S. T. Hedau, A. K. Mandal, and B. C. Das. 1996. "Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction." *Breast Cancer Res Treat* 39 (2):197-202.
- Gumus, M., P. F. Yumuk, T. Salepci, M. Aliustaoglu, F. Dane, M. Ekenel, G. Basaran, H. Kaya, N. Barisik, and N. S. Turhal. 2006. "HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples." *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 25 (4):515-521.
- Gupta, S. M., and J. Mania-Pramanik. 2019. "Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis." *J Biomed Sci* 26 (1):28. doi: 10.1186/s12929-019-0520-2.
- Gwak, M., Y. J. Choi, N. J. Yoo, and S. Lee. 2014. "Expression of DNA cytosine deaminase APOBEC3 proteins, a potential source for producing mutations, in gastric, colorectal and prostate cancers." *Tumori* 100 (4):112e-7e. doi: 10.1700/1636.17922.

- Hartmann, Lynn C., Thomas A. Sellers, Marlene H. Frost, Wilma L. Lingle, Amy C. Degnim, Karthik Ghosh, Robert A. Vierkant, Shaun D. Maloney, V. Shane Pankratz, and David W. Hillman. 2005. "Benign breast disease and the risk of breast cancer." *New England Journal of Medicine* 353 (3):229-237.
- Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2006. "Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity." *Rev Med Virol* 16 (2):83-97. doi: 10.1002/rmv.488.
- Heng, B., W. K. Glenn, Y. Ye, B. Tran, W. Delprado, L. Lutze-Mann, N. J. Whitaker, and J. S. Lawson. 2009. "Human papilloma virus is associated with breast cancer." *Br J Cancer* 101 (8):1345-50. doi: 10.1038/sj.bjc.6605282.
- Henle, G., and W. Henle. 1966. "Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma." *J Bacteriol* 91 (3):1248-56.
- Hennig, E. M., Z. Suo, S. Thoresen, R. Holm, S. Kvinnsland, and J. M. Nesland. 1999. "Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III)." *Breast Cancer Res Treat* 53 (2):121-35.
- Herrera-Goepfert, R., N. A. Khan, C. Koriyama, S. Akiba, and V. M. Perez-Sanchez. 2011. "High-risk human papillomavirus in mammary gland carcinomas and non-neoplastic tissues of Mexican women: no evidence supporting a cause and effect relationship." *Breast* 20 (2):184-9. doi: 10.1016/j.breast.2010.11.006.
- Herrera-Goepfert, R., T. Vela-Chavez, A. Carrillo-Garcia, M. Lizano-Soberon, A. Amador-Molina, L. F. Onate-Ocana, and R. S. Hallmann. 2013. "High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women." *BMC Cancer* 13:445. doi: 10.1186/1471-2407-13-445.
- Higgins, C. D., A. J. Swerdlow, K. F. Macsween, N. Harrison, H. Williams, K. McAulay, R. Thomas, S. Reid, M. Conacher, K. Britton, and D. H. Crawford. 2007. "A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes." *J Infect Dis* 195 (4):474-82. doi: 10.1086/510854.
- Hoon Tan, Puay, Ian Ellis, Kimberly Allison, Edi Brogi, Stephen B. Fox, Sunil Lakhani, Alexander J. Lazar, Elizabeth A. Morris, Aysegul Sahin, and Roberto Salgado. 2020. "The 2019 WHO classification of tumours of the breast." *Histopathology*.
- Hortobagyi, G. N., J. de la Garza Salazar, K. Pritchard, D. Amadori, R. Haidinger, C. A. Hudis, H. Khaled, M. C. Liu, M. Martin, M. Namer, J. A. O'Shaughnessy, Z. Z. Shen, and K. S. Albain. 2005. "The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival." *Clin Breast Cancer* 6 (5):391-401.
- Islam, Md Saimul, Balarko Chakraborty, and Chinmay Kumar Panda. 2020. "Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management." *Annals of translational medicine* 8 (10).
- Islam, S., H. Dasgupta, A. Roychowdhury, R. Bhattacharya, N. Mukherjee, A. Roy, G. K. Mandal, N. Alam, J. Biswas, S. Mandal, S. Roychoudhury, and C. K. Panda. 2017. "Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication." *PLoS One* 12 (2):e0172760. doi: 10.1371/journal.pone.0172760.
- Jeannot, E., V. Becette, M. Campitelli, M. A. Calm ejane, E. Lappartient, E. Ruff, S. Saada, A. Holmes, D. Bellet, and X. Sastre-Garau. 2016. "Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma." *J Pathol Clin Res* 2 (4):201-209. doi: 10.1002/cjp2.47.

- Keydar, I., T. Ohno, R. Nayak, R. Sweet, F. Simoni, F. Weiss, S. Karby, R. Mesa-Tejada, and S. Spiegelman. 1984. "Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (13):4188-92. doi: 10.1073/pnas.81.13.4188.
- Khan, N. A., A. Castillo, C. Koriyama, Y. Kijima, Y. Umekita, Y. Ohi, M. Higashi, Y. Sagara, H. Yoshinaka, T. Tsuji, S. Natsugoe, T. Douchi, Y. Eizuru, and S. Akiba. 2008. "Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan." *Br J Cancer* 99 (3):408-14. doi: 10.1038/sj.bjc.6604502.
- Kim, Yeonju, Keun-Young Yoo, and Marc T. Goodman. 2015. "Differences in incidence, mortality and survival of breast cancer by regions and countries in Asia and contributing factors." *Asian Pac J Cancer Prev* 16 (7):2857-70.
- Kouloura, Andriana, Electra Nicolaidou, Ioannis Mitsizis, Euaggelia Panotopoulou, Theodoraki Kassiani, Vasilios Smyrniotis, Giovanni Corso, Paolo Veronesi, and Nikolaos Arkadopoulos. 2018. "HPV infection and breast cancer. Results of a microarray approach." *The Breast* 40:165-169.
- Kroupis, C., A. Markou, N. Vourlidis, A. Dionyssiou-Asteriou, and E. S. Lianidou. 2006. "Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics." *Clin Biochem* 39 (7):727-31. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.03.005.
- Labrecque, L. G., D. M. Barnes, I. S. Fentiman, and B. E. Griffin. 1995. "Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study." *Cancer Res* 55 (1):39-45.
- Lakhani, Sunil R. 2012. *WHO Classification of Tumours of the Breast*: International Agency for Research on Cancer.
- Lawson, J. S., W. K. Glenn, B. Heng, Y. Ye, B. Tran, L. Lutze-Mann, and N. J. Whitaker. 2009. "Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer." *Br J Cancer* 101 (8):1351-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6605328.
- Lawson, J. S., W. K. Glenn, and N. J. Whitaker. 2016. "Human Papilloma Viruses and Breast Cancer - Assessment of Causality." *Front Oncol* 6:207. doi: 10.3389/fonc.2016.00207.
- Lawson, J. S., D. D. Tran, E. Carpenter, C. E. Ford, W. D. Rawlinson, N. J. Whitaker, and W. Delprado. 2006. "Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer." *J Clin Pathol* 59 (12):1287-92. doi: 10.1136/jcp.2005.035907.
- Li, J., J. Ding, and K. Zhai. 2015. "Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China." *PLoS One* 10 (8):e0136050. doi: 10.1371/journal.pone.0136050.
- Liang, W., and H. Tian. 2008. "Hypothetic association between human papillomavirus infection and breast carcinoma." *Med Hypotheses* 70 (2):305-7. doi: 10.1016/j.mehy.2007.05.032.
- Liang, W., J. Wang, C. Wang, Y. Lv, H. Gao, K. Zhang, H. Liu, J. Feng, L. Wang, and R. Ma. 2013. "Detection of high-risk human papillomaviruses in fresh breast cancer samples using the hybrid capture 2 assay." *J Med Virol* 85 (12):2087-92. doi: 10.1002/jmv.23703.
- Longworth, M. S., and L. A. Laimins. 2004. "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (2):362-72. doi: 10.1128/mmbr.68.2.362-372.2004.

- Mahouri, K., M. Dehghani Zahedani, and S. Zare. 2007. "Breast cancer risk factors in south of Islamic Republic of Iran: a case-control study." *East Mediterr Health J* 13 (6):1265-73.
- Malhone, C., A. Longatto-Filho, and J. R. Filassi. 2018. "Is Human Papilloma Virus Associated with Breast Cancer? A Review of the Molecular Evidence." *Acta Cytol* 62 (3):166-177. doi: 10.1159/000487700.
- Manzouri, L., R. Salehi, S. Shariatpanahi, and P. Rezaie. 2014. "Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005-2009 in Isfahan." *Adv Biomed Res* 3:75. doi: 10.4103/2277-9175.125873.
- McBride, A. A. 2017. "Mechanisms and strategies of papillomavirus replication." *Biol Chem* 398 (8):919-927. doi: 10.1515/hsz-2017-0113.
- Mendizabal-Ruiz, A. P., J. A. Morales, L. J. Ramirez-Jirano, M. Padilla-Rosas, M. C. Moran-Moguel, and H. Montoya-Fuentes. 2009. "Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue." *Breast Cancer Res Treat* 114 (1):189-94. doi: 10.1007/s10549-008-9989-1.
- Mikulicic, S., and L. Florin. 2019. "The endocytic trafficking pathway of oncogenic papillomaviruses." *Papillomavirus Res* 7:135-137. doi: 10.1016/j.pvr.2019.03.004.
- Miller, E. R., C. Wilson, J. Chapman, I. Flight, A. M. Nguyen, C. Fletcher, and I. Ramsey. 2018. "Connecting the dots between breast cancer, obesity and alcohol consumption in middle-aged women: ecological and case control studies." *BMC Public Health* 18 (1):460. doi: 10.1186/s12889-018-5357-1.
- Momenimovahed, Z., and H. Salehiniya. 2019. "Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world." *Breast Cancer (Dove Med Press)* 11:151-164. doi: 10.2147/bctt.s176070.
- Morris, B. J. 2005. "Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region." *Clin Chem Lab Med* 43 (11):1171-7. doi: 10.1515/cclm.2005.203.
- Morshed, Kamal, Dorota Polz-Gruszka, Marcin Szymański, and Małgorzata Polz-Dacewicz. 2014. "Human papillomavirus (HPV)–structure, epidemiology and pathogenesis." *Otolaryngologia Polska* 68 (5):213-219.
- Mourouti, N., M. D. Kontogianni, C. Papavagelis, and D. B. Panagiotakos. 2015. "Diet and breast cancer: a systematic review." *Int J Food Sci Nutr* 66 (1):1-42. doi: 10.3109/09637486.2014.950207.
- Naqos, N., A. Naim, H. Jouhadi, A. Taleb, Z. Bouchbika, N. Benchakroune, N. Tawfiq, S. Sahraoui, and A. Benider. 2016. "Mucinous carcinoma of the breast: clinical, biological and evolutive profile." *Cancer radiotherapie: journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* 20 (8):801-804.
- Ohba, K., K. Ichiyama, M. Yajima, N. Gemma, M. Nikaido, Q. Wu, P. Chong, S. Mori, R. Yamamoto, J. E. Wong, and N. Yamamoto. 2014. "In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction." *PLoS One* 9 (5):e97787. doi: 10.1371/journal.pone.0097787.
- Pao, C. C., J. J. Hor, F. P. Yang, C. Y. Lin, and C. J. Tseng. 1997. "Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis." *J Clin Oncol* 15 (3):1008-12. doi: 10.1200/jco.1997.15.3.1008.

- Pereira Suarez, A. L., M. A. Lorenzetti, R. Gonzalez Lucano, M. Cohen, H. Gass, P. Martinez Vazquez, P. Gonzalez, M. V. Preciado, and P. Chabay. 2013. "Presence of human papilloma virus in a series of breast carcinoma from Argentina." *PLoS One* 8 (4):e61613. doi: 10.1371/journal.pone.0061613.
- Prophet, E. B., B. Mills, J. B. Arrington, and L. H. Sobin. 1995. "Manual de métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América." *Traducción de la 5ª Edición inglesa. Washington.*
- Provenzano, E., G. A. Ulaner, and S. F. Chin. 2018. "Molecular Classification of Breast Cancer." *PET Clin* 13 (3):325-338. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.004.
- Rakha, E. A., M. E. El-Sayed, S. Menon, A. R. Green, A. H. Lee, and I. O. Ellis. 2008. "Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast." *Breast Cancer Res Treat* 111 (1):121-7. doi: 10.1007/s10549-007-9768-4.
- Rakha, E. A., and A. R. Green. 2017. "Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know." *Pathology* 49 (2):111-119. doi: 10.1016/j.pathol.2016.10.012.
- Remmerbach, Torsten W., Ute G. Brinckmann, Alexander Hemprich, M. Chekol, K. Kühndel, and Uwe Gerd Liebert. 2004. "PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets." *Journal of clinical virology* 30 (4):302-308.
- Ross, Michael H., and Wojciech Pawlina. 2007. *Histología*: Ed. Médica Panamericana.
- Salman, N. A., G. Davies, F. Majidy, F. Shakir, H. Akinrinade, D. Perumal, and G. H. Ashrafi. 2017. "Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: A UK based Study." *Sci Rep* 7:43591. doi: 10.1038/srep43591.
- Salud, S. d. 2012. "Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012." *Diario Oficial* 4.
- Sapp, M. J. 2013. "HPV virions hitchhike a ride on retromer complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (18):7116-7. doi: 10.1073/pnas.1305245110.
- Sher, Gulab, Nadia Aziz Salman, Michal Kulinski, Rayyan Abdulaziz Fadel, Vinod Kumar Gupta, Ambika Anand, Salahddin Gehani, Sheraz Abayazeed, Omer Al-Yahri, and Fakhar Shahid. 2020. "Prevalence and type distribution of high-risk Human Papillomavirus (HPV) in breast cancer: a Qatar based study." *Cancers* 12 (6):1528.
- Sigaroodi, A., S. A. Nadji, F. Naghshvar, R. Nategh, H. Emami, and A. A. Velayati. 2012. "Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran." *ScientificWorldJournal* 2012:837191. doi: 10.1100/2012/837191.
- Sinn, H. P., and H. Kreipe. 2013. "A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition." *Breast Care (Basel)* 8 (2):149-54. doi: 10.1159/000350774.
- Smalley, M., and A. Ashworth. 2003. "Stem cells and breast cancer: A field in transit." *Nat Rev Cancer* 3 (11):832-44. doi: 10.1038/nrc1212.
- Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao, and H. P. Zhu. 2017. "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." *Int J Biol Sci* 13 (11):1387-1397. doi: 10.7150/ijbs.21635.
- Taddei, Ilaria, Marisa M. Faraldo, Jérôme Teulière, Marie-Ange Deugnier, Jean Paul Thiery, and Marina A. Glukhova. 2003. "Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium." *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8 (4):383-394.

- Thakur, P., R. K. Seam, M. K. Gupta, M. Gupta, M. Sharma, and V. Fotedar. 2017. "Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case-control study and comparison with the Western World." *South Asian J Cancer* 6 (3):106-109. doi: 10.4103/sajc.sajc_157_16.
- Untch, M., B. Gerber, N. Harbeck, C. Jackisch, N. Marschner, V. Mobus, G. von Minckwitz, S. Loibl, M. W. Beckmann, J. U. Blohmer, S. D. Costa, T. Decker, I. Diel, T. Dimpfl, W. Eiermann, T. Fehm, K. Friese, F. Janicke, W. Janni, W. Jonat, M. Kiechle, U. Kohler, H. J. Luck, N. Maass, K. Possinger, A. Rody, A. Scharl, A. Schneeweiss, C. Thomssen, D. Wallwiener, and A. Welt. 2013. "13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013)." *Breast Care (Basel)* 8 (3):221-9. doi: 10.1159/000351692.
- Vaidya, A. B., M. M. Black, A. S. Dion, and D. H. Moore. 1974. "Homology between human breast tumour RNA and mouse mammary tumour virus genome." *Nature* 249 (457):565-7.
- Vieira, V. C., B. Leonard, E. A. White, G. J. Starrett, N. A. Temiz, L. D. Lorenz, D. Lee, M. A. Soares, P. F. Lambert, P. M. Howley, and R. S. Harris. 2014. "Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B." *mBio* 5 (6). doi: 10.1128/mBio.02234-14.
- Visscher, D. W., R. D. Frank, J. M. Carter, R. A. Vierkant, S. J. Winham, E. P. Heinzen, B. T. Broderick, L. A. Denison, T. M. Allers, J. L. Johnson, M. H. Frost, L. C. Hartmann, A. C. Degnim, and D. C. Radisky. 2017. "Breast Cancer Risk and Progressive Histology in Serial Benign Biopsies." *J Natl Cancer Inst* 109 (10). doi: 10.1093/jnci/djx035.
- vor der Holte, A. Paehler, I. Fangk, S. Glombitza, L. Wilkens, and H. J. Welkoborsky. 2020. "Identification of rare and common HPV genotypes in sinonasal papillomas." *Head and neck pathology* 14 (4):936-943.
- Wang, Ting, Peng Chang, Ling Wang, Qing Yao, Wen Guo, Jianghao Chen, Tristan Yan, and Christopher Cao. 2012. "The role of human papillomavirus infection in breast cancer." *Medical Oncology* 29 (1):48-55.
- Wang, Y., J. F. Holland, I. J. Bleiweiss, S. Melana, X. Liu, I. Pelisson, A. Cantarella, K. Stellrecht, S. Mani, and B. G. Pogo. 1995. "Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer." *Cancer Res* 55 (22):5173-9.
- Widschwendter, A., T. Brunhuber, A. Wiedemair, E. Mueller-Holzner, and C. Marth. 2004. "Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history." *J Clin Virol* 31 (4):292-7. doi: 10.1016/j.jcv.2004.06.009.
- Woodman, C. B., S. I. Collins, and L. S. Young. 2007. "The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues." *Nat Rev Cancer* 7 (1):11-22. doi: 10.1038/nrc2050.
- Wrede, D., Y. A. Luqmani, R. C. Coombes, and K. H. Vousden. 1992. "Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer." *Br J Cancer* 65 (6):891-4.
- Xiong, W. M., Q. P. Xu, X. Li, R. D. Xiao, L. Cai, and F. He. 2017. "The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis." *Oncotarget* 8 (56):96419-96432. doi: 10.18632/oncotarget.21682.
- Yersal, Ozlem, and Sabri Barutca. 2014. "Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications." *World journal of clinical oncology* 5 (3):412.

- Yoon, Chun-Sik, Kwang-Dong Kim, Sue-Nie Park, and Seon-Woo Cheong. 2001. "α6 integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP." *Biochemical and biophysical research communications* 283 (3):668-673.
- Zendehdel, M., B. Niakan, A. Keshtkar, E. Rafiei, and F. Salamat. 2018. "Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol." *Iran J Med Sci* 43 (1):1-8.
- Zertuche-Zuani, José Gerardo, Michelle Salazar-Gallegos, Álvaro Eduardo Peña-Jiménez, and Drusso Vera-Gaspar. 2013. "Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. Revisión sistemática." *Revista de Sanidad Militar* 67 (5):205-213.
- Zhang, Y., and C. G. Kleer. 2016. "Phyllodes Tumor of the Breast: Histopathologic Features, Differential Diagnosis, and Molecular/Genetic Updates." *Arch Pathol Lab Med* 140 (7):665-71. doi: 10.5858/arpa.2016-0042-RA.
- Zhou, Y., J. Li, Y. Ji, M. Ren, B. Pang, M. Chu, and L. Wei. 2015. "Inconclusive role of human papillomavirus infection in breast cancer." *Infect Agent Cancer* 10:36. doi: 10.1186/s13027-015-0029-6.
- zur Hausen, H. 2002. "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." *Nat Rev Cancer* 2 (5):342-50. doi: 10.1038/nrc798.
- zur Hausen, H. 2009. "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." *Virology* 384 (2):260-5. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.046.
- zur Hausen, H., W. Meinhof, W. Scheiber, and G. W. Bornkamm. 1974. "Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus." *Int J Cancer* 13 (5):650-6.
- zur Hausen, Harald, Ethel-Michele de Villiers, and Lutz Gissmann. 1981. "Papillomavirus infections and human genital cancer." *Gynecologic oncology* 12 (2):S124-S128.
- American joint committee on cancer. [Consultada Mayo 2019]. Disponible en: <https://cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx>
- IARC. 2020. World cancer report. Lyon, International Agency for Research on Cancer. Geografía [En línea] [Consultada Junio 2021]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- INEGI. 2013. Mortalidad. En: INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía [En línea] [Consultada Junio 2021]. Disponible: en:<https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- Breastcancer.org. [En línea] [Consultada Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.breastcancer.org>