



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
DE RIESGO ALTO EN CARCINOMAS  
DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN:**

**GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA**

**PRESENTA:**

**DRA. DANIELLA GÓMEZ PUE**

**ASESOR:**

**DR. ROBERTO HERRERA GOEPFERT**



**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA DE MÉXICO**

**Expresión de Virus del Papiloma Humano de Riesgo Alto  
en Carcinomas de la Glándula Mamaria**

**TESIS DE POSTGRADO**

**Para Obtener el Grado de Especialidad en Ginecología Oncológica**

**Presenta: Dra. Daniella Gómez Pue**

**Asesor: Dr. Roberto Herrera Goepfert**

**México, D.F.**

**Agosto 2010**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA**

**Autorizaciones**

---

**Dra. Daniella Gómez Pue**

**Medico del Tercer año de la Sub-especialidad de Ginecología Oncológica**

**Instituto Nacional de Cancerología**

---

**Dr. Roberto Herrera Goepfert**

**Subdirector del Departamento de Patología Quirúrgica**

**Instituto Nacional de Cancerología**

---

**Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia**

**Subdirectora de Educación Médica**

**Instituto Nacional de Cancerológica**

**AUTORES**

**TESISTA**

**Dra. Daniella Gómez Pue**

**Medico del Tercer año de la Sub-Especialidad de Ginecología Oncológica**

**Instituto Nacional de Cancerología**

**ASESOR**

**Dr. Roberto Herrera Goepfert**

**Subdirector del Departamento de Patología Quirúrgica**

**Instituto Nacional de Cancerología**

**COLABORADORES**

**Dra. Silvia Patricia Villarreal Colin**

**Medico Adscrito al Departamento de Tumores de Mama**

**Dr. David Cantú de León**

**Medico Adscrito al Departamento de Ginecología Oncológica**

**Dr. Gonzalo Montalvo Esquivel**

**Jefe del Departamento de Ginecología Oncológica**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi hijo Narciso, gracias por acompañarme al hospital durante prácticamente todo el R1, fue un embarazo perfecto y gracias a ti, siempre me sentí motivada y llena de energía. Gracias por ser un bebe tan saludable y feliz, por no olvidar que soy tu mama y esperarme en casa con una gran sonrisa, besos y abrazos Te amo, nunca dudes que todo lo que hacemos papa y yo es pensando en ti, eres lo mas importante en nuestras vidas.

A mi esposo, gracias por ser un ejemplo de rectitud, responsabilidad, perseverancia, dedicación y profesionalismo. Gracias por el amor y apoyo, por la confianza y el respeto, por tu sentido común, tus consejos, por compartir tu vida conmigo... me haces sumamente feliz.

A mis papas Alfredo y Gladys, por los valores que me inculcaron, por enseñarme con su ejemplo lo que es la calidad y la calidez en un ser humano, por su amor y cariño incondicional, por siempre estar ahí.

A mi hermana Valentina, por ser mi mejor amiga y por mis sobrinos Donatella y Renato.

A Gaby, la mejor nana del mundo, gracias por cuidar lo más preciado para mi, como si fuera tuyo, por darle amor, besos, cariños y atención cuando yo no pude, gracias por ser otra mama para Narciso, por ser parte de nuestra familia.

A mis amigas Hope, Lore, Marce, Paola, Lupe, por estar para mi aunque pareciera que yo no estaba.

A todos mis compañeros en especial a Luis de León, eres el mejor ejemplo de un excelente medico y un ser humano de calidad insuperable, tu amistad es una de las mejores cosas que me dejo el INCAn. A Juan José Soto, gracias por tus enseñanzas en quirófano, creo que eres un excelente cirujano. Robin, Zermeño, Villegas y Moreno por su esfuerzo y alto desempeño académico que me mantuvieron siempre motivada y orgullosa de la generación.

A todos mis profesores por su tiempo y enseñanzas, Al Dr. Gonzalo Montalvo por luchar por la justicia y la equidad. Al Dr. Roberto Herrera Goepfert por el apoyo y la confianza para realizar este trabajo.

Y a Dios, Gracias por esta experiencia de vida...

**Daniella Gómez Pue**

## INDICE

1. Título	
2. Antecedentes	1
3. Planteamiento del problema	5
4. Justificación	5
5. Hipótesis	6
6. Objetivos	6
• Principal	7
• Secundarios	7
7. Material y métodos	7
• Diseño	7
• Población en estudio	7
• Lugar de realización	7
• Criterios de inclusión	7
• Criterios de eliminación	8
• Descripción del estudio	8
• Análisis de datos	13
8. Organización de la investigación	13
• Aspectos éticos	13
• Aspectos financieros	13
• Actividades a ser realizadas por el alumno	14
• Cronograma de actividades	15
9. Resultados	16
10. Discusión	21
11. Conclusiones	29
12. Anexo	30
13. Bibliografía	31

## **EXPRESIÓN DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) DE RIESGO ALTO EN CARCINOMAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

### **ANTECEDENTES**

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más común a nivel mundial en la población general y la más común en pacientes de sexo femenino,<sup>1</sup> reportándose más de medio millón de muertes anuales.<sup>2</sup> En México ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en pacientes del sexo femenino con 12 433 casos (17.29%) y 3 889 muertes (12.72%).<sup>3</sup>

En el tratado de medicina más antiguo, el Nei Jing, Huang Di (2698 AC) describe por primera vez este tumor. Los grabados egipcios en piedra, el papiro de Edwin Smith, el código de Hammurabi y los escritos de Hipócrates y Galeno son solo algunos de los registros de las hipótesis acerca del origen de esta enfermedad y de las diversas formas en que trataba en las civilizaciones antiguas. En la edad media se desarrollaron diversas teorías y se perfeccionó el conocimiento anatómico y las técnicas quirúrgicas, pero no es hasta el siglo XIX con la introducción de la anestesia por William Morton y los principios de antisepsia por Joseph Lister que el tratamiento quirúrgico fue exitoso en algunos casos. En el siglo XX se demostró el beneficio del uso de quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia y se desarrollaron técnicas quirúrgicas más conservadoras. En las últimas décadas se han enfocado gran parte de los esfuerzos en investigación biomolecular y los hallazgos son prometedores. Sin embargo a pesar del progreso que se ha logrado a más de 4500 años de haberse descrito por primera vez esta enfermedad, las diversas etiologías aun son inciertas, la enfermedad diagnosticada en etapas avanzadas es devastadora y aun pacientes tratadas en estadios tempranos tienen riesgo de presentar recurrencia y morir por la enfermedad.

La identificación de las causas del cáncer de mama es un tema crucial en la investigación para el desarrollo de estrategias efectivas de prevención y tratamiento.

Se han identificado diversos factores de riesgo y la edad media del diagnóstico es de 61 años, con un incremento vertiginoso en incidencia de los 45 a los 50 años de edad. El cáncer de mama es cien veces más frecuente en mujeres que en hombres. Es más común en la raza Blanca y Negra y menos en la Asiática, Indio - Americana y Nativos de Alaska.<sup>4</sup>

En cuanto al riesgo que confieren las enfermedades mamarias benignas se informa que las lesiones no proliferativas como los cambios fibroquísticos, apócrinos, ectasia ductal y las calcificaciones epiteliales, no representan un incremento en el riesgo para cáncer de mama. Las lesiones proliferativas sin atípia como lo son el fibroadenoma complejo, la hiperplasia moderada florida, la adenosis esclerosante, el papiloma intraductal y la cicatriz radial se presentan con un riesgo relativo (RR) de 1.6 a 1.9 y las lesiones proliferativas con atípia como la hiperplasia lobulillar o ductal atípicas representan un RR de 4 a 6 y de hasta 10 en caso de lesiones multifocales.<sup>5</sup>

Los factores reproductivos y hormonales en relación con la presencia de estrógenos han demostrado papel crítico en relación a la etiología del cáncer de mama, encontrando mayor riesgo en pacientes con menarca antes de los 12 años, con disminución del 5% del riesgo por cada año de retraso. El inicio de la menopausia antes de los 45 años de edad representa 50% menos riesgo que después de los 55 años. La salpingooforectomía bilateral antes de los 40 años de edad disminuye el riesgo en 50%. La nuliparidad representa un RR de 1.2 a 1.7 con disminución del 20% del riesgo con la edad del primer parto antes de los 20 años.<sup>6</sup>

En cuanto al uso de terapia hormonal de reemplazo se encontró una relación causal con el uso de la misma y el cáncer de mama con receptores hormonales (RH) positivos con un RR de 1.8 a 2.1, con mayor riesgo a mayor duración de la THR.<sup>7</sup> El uso de anticonceptivos orales represento un RR de 1.<sup>8</sup>

Respecto a factores dietéticos y estilo de vida se ha encontrado que la paciente postmenopáusica con índice de masa corporal (IMC) arriba de 25 tiene un RR de 1.2 a 1.4 y pacientes con talla mayor a 1.75 metros tienen un RR de 1.22.<sup>9</sup> La ingesta de alcohol ha demostrado ser un factor de riesgo y es dosis dependiente con RR de 1.31 para pacientes que consumen 4 bebidas diarias.<sup>10</sup> El consumo de grasas ha presentado asociación positiva con impacto modesto en algunos estudios, sin embargo no se ha encontrado aumento el riesgo en otros.<sup>11 12</sup>

La historia personal de cáncer de mama representa un riesgo para desarrollar enfermedad contralateral del 0.5 % anual en premenopáusicas y 1% anual en postmenopáusicas en caso de neoplasias invasoras, con un riesgo del 5% a 10 años en pacientes con enfermedad in situ.<sup>13</sup> El pacientes con antecedentes familiares el RR es de 1.8 con familiar en primer grado, 2.9 con dos familiares de primer grado, 2.9 si el familiar afectado es menor de 30 años y 1.5 si es mayor de 60 años.<sup>14</sup> Se han identificado mutaciones genéticas específicas que confieren riesgo elevado de desarrollar esta neoplasia, siendo responsables solo del 5% de los casos, estas mutaciones son: BRCA 1 con un riesgo de 57%, BRCA 2 con un riesgo de 49%<sup>15</sup>, se reportan además altos índices de cáncer de mama en pacientes con síndromes genéticos como el Li-Fraumeni , Ataxia Telangiectasia, Cowden y el síndrome de Peutz-Jeghers, representando en conjunto menos del 3% de los casos de cáncer de mama.<sup>16 17</sup>

A pesar de haberse identificado factores de riesgo bien definidos y los patrones de susceptibilidad genética previamente mencionados, la única causa conocida específica para cáncer de mama es la exposición a radiación como en el caso de las víctimas Japonesas de las explosiones de bombas atómicas.<sup>18</sup>

De esta gran cantidad de factores de riesgo que se han establecido<sup>19</sup>, estos no son identificados en el 50 a 80 % de los casos.<sup>20</sup>

Siendo que en la mayoría de las pacientes no es posible identificar un factor de riesgo, se ha planteado la hipótesis de una posible etiología viral para el cáncer de mama, que relacionada con los factores de riesgo previamente mencionados pudiera explicar la heterogeneidad histológica de esta neoplasia.<sup>21</sup>

La posibilidad de que los virus pudieran tener un rol en esta neoplasia fue postulada por primera vez por Birrner y col.<sup>22</sup> en 1937 cuando observaron que la leche de ratón contenía un factor que producía tumores mamarios en las crías al convertirse estas en adultos, identificándose posteriormente como el virus del tumor mamario del ratón (MMTV). Otros virus también relacionados al cáncer de mama son el virus de Epstein-Barr (EBV) reportado por Horiuchi y cols. en 1994, el virus de leucemia bovina (BLV) estudiado ampliamente por Buehring y cols y el virus del papiloma humano (VPH).<sup>23</sup>

Esta bien establecido que el VPH un factor de riesgo para diversos canceres humanos, en el cáncer cervicouterino hasta el 96% de las pacientes son positivas para algún tipo de VPH de alto riesgo, en otras neoplasias relacionadas a esta infección como el cáncer colorrectal o los cáncer de cabeza y cuello se puede identificar la presencia de este virus en un 80 y 28 % respectivamente.<sup>24 25</sup> El que el VPH se sea considerado probable factor causal de carcinogénesis en estos sitios, abre la posibilidad de que lo sea también en otras localizaciones en donde se corrobore su presencia.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Se puede señalar al VPH como factor de riesgo para cáncer de la glándula mamaria, disminuyendo con la prevención de su contagio la incidencia de dicha neoplasia?

## **JUSTIFICACIÓN**

En México, hay una tendencia marcada al aumento en la frecuencia del carcinoma de la glándula mamaria, tanto en mujeres posmenopáusicas como en edad reproductiva. Desafortunadamente, la mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad, lo que disminuye las posibilidades de supervivencia e impide diseñar estrategias terapéuticas con intento curativo. En el intento de buscar factores causales de cáncer de mama se ha identificado que algunos casos de carcinomas de la glándula mamaria están asociados con VPH. Sabemos que en México la incidencia de infecciones genitales por VPH es elevada. Es necesario investigar la asociación entre el VPH y el cáncer de mama, ya que de demostrarse un papel del VPH en la carcinogénesis de la glándula mamaria podrían diseñarse esquemas de prevención así como estrategias de diagnóstico y tratamiento oportunos, lo que podría disminuir la incidencia, aumentar la supervivencia de las pacientes y reduciría considerablemente el gasto por tratamientos onerosos muchas de las veces ineficaces a mediano y largo plazos.

## **HIPÓTESIS**

El carcinoma de la glándula mamaria, está asociado con la infección por virus del papiloma humano de riesgo alto.

## **OBJETIVOS**

### **Principal**

Conocer la frecuencia de VPH en carcinomas de la glándula mamaria de mujeres atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología.

### **Secundarios**

- Determinar los genotipos de VPH asociados con mayor frecuencia carcinoma de la glándula mamaria.
- Establecer las características clínico-patológicas de los carcinomas de la glándula mamaria asociados con VPH.
- Determinar la presencia de infección genital por VPH, en pacientes con carcinoma de la glándula mamaria.
- Determinar la expresión de receptores de estrógenos y progesterona, y Her<sub>2</sub> en carcinomas de la glándula mamaria asociados con VPH.
- Determinar por reacción en cadena de la polimerasa (RCP), la presencia del VPH en la piel del pezón y en el tejido mamario no neoplásico, en los casos de carcinoma de la glándula mamaria.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño (tipo de estudio)**

Prospectivo, Descriptivo, Observacional.

### **Población en estudio**

Pacientes de sexo femenino con cáncer de la glándula mamaria atendidas en el departamento de Tumores Mamarios del Instituto Nacional de Cancerológica.

### **Lugar de realización del estudio**

El presente estudio se llevo a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología. En donde participaron el Departamento de Tumores Mamarios, el de Ginecología Oncológica y el Departamento de Patología así como el Laboratorio de Virus y Cáncer de la misma institución.

### **Criterios de inclusión**

1. Mujeres adultas de cualquier edad, pacientes del Instituto Nacional de Cancerología, con diagnóstico de carcinoma de la glándula mamaria, de cualquier tipo histológico.
2. Pacientes con carcinoma de glándula mamaria en cualquier etapa clínica y en quienes se realizo mastectomía, con o sin tratamiento neoadyuvante con quimioterapia.

3. Pacientes con carcinoma de glándula mamaria en quienes se realizo frotis cérvico-vaginal, para la búsqueda de lesiones epiteliales asociadas con VPH.
4. Pacientes con carcinoma de glándula mamaria en quienes se realizo toma cérvico-vaginal, para la determinación de VPH mediante la técnica de RCP.

### **Criterios de eliminación**

1. Pacientes que no aceptaron alguno de los procedimientos diagnósticos.
2. Pacientes que no firmaron la carta de consentimiento informado.
3. Pacientes en las que después del tratamiento neoadyuvante (quimioterapia), hubo ausencia total de neoplasia residual.
4. Pacientes que recibieron radioterapia adyuvante.
5. Pacientes en las que se realizo cirugía conservadora.

### **Descripción del estudio**

Se incluyeron a 40 pacientes con cáncer de mama, en forma prospectiva y consecutiva, operadas en el Instituto Nacional de Cancerología de México, de Junio del 2009 a Marzo del 2010.

Se realizaron estudios citológicos con la técnica de Papanicolaou y molecular con la técnica de RPC, del exudado cérvico-vaginal obtenido por exploración ginecológica, para determinar la presencia o ausencia de infección genital con VPH, así como el genotipo en caso de estar presente la infección.

Una vez escindida la pieza quirúrgica y antes de su fijación en formol al 10% amortiguado, se obtuvo en fresco 5mm<sup>3</sup> de la neoplasia, de la piel del pezón y areola, así como del tejido mamario no neoplásico, ipsilaterales; posteriormente, se colocaron por separado en viales con solución salina o amortiguador de fosfatos de sodio y fueron enviados al laboratorio de biología molecular, para la determinación y genotipificación de VPH mediante la técnica de RPC.

### **Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del Tejido Fresco**

#### ***Reactivos***

Buffer de Lisis (Tris.HCl 10mM pH 8.0; EDTA .1 M pH 8.0; SDS .5%) a temperatura ambiente.

RNAsa 20 ug/ ml a -20°C

Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) vol/vol a 4°C

Mezcla de Fenol / cloroformo-isoamílico (25:24:1) vol/vol a 4°C

Etanol al 70% a -20°C

Etanol absoluto a -20°C

Acetato de Amonio 7.5M mantener a -20°C

#### ***Técnica utilizada para la Extracción***

Con la ayuda de una hoja de bisturí esteril se corto el espécimen hasta prácticamente deshacer el tejido.

1.-La muestra se digirió (en tubo eppendorf) en 400-500 ul de buffer de lisis y 10-15ul de proteinasa K (20 mg/ ml) en un thermomixer (temperatura y agitación) a 55°C toda una noche.

2.-Al día siguiente se agrego un volumen igual de una preparación de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (400-500 ul), se agito para mezclar bien, por un minuto.

3.-Se centrifugo a 13000 rpm (revoluciones por minuto) por 15 min. (formándose dos fases)

4.-Se recupero la fase de arriba (acuosa) con pipeta sin llevarse la interfase y se puso en un nuevo tubo eppendorf. El tubo donde quedan los restos de mezcla se desecho.

5.-En el nuevo tubo con la fase recuperada, se coloco un volumen igual (400-500 ul) de cloroformo-isoamilico, se agito para mezclar bien, por un minuto

6.-Se centrifugo 13000 rpm por 15 min (se formaron dos fases)

7.-Se recupero la fase de arriba (acuosa) con pipeta sin llevarse la interfase y se coloco en un nuevo tubo eppendorf. El tubo donde quedan los restos de mezclase va desecho.

8.-En el nuevo tubo con la fase recuperada, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto (1 ml) frío y 1/10 vol. (40-50 ul) acetato de amonio 7.5M frío se mezclo agitando manualmente. En este paso se busco la formación de la hebra de ADN.

9.-Se colocaron los tubos a -70°C durante 1-2 hr para precipitar, o se dejaron precipitando durante una noche a -20°C.

10.-Pasado el tiempo, se centrifugo a 13000 rpm a 4°C durante 30 min y se desecho sobrenadante.

11.-Después de desechar el sobrenadante y se agrego al pellet 300-400 ul de etanol al 70% frío lavando una o dos veces, y se agito suavemente.

12.-Se centrifugo a 13000 rpm por 15 min. a 4°C, se desecho el sobrenadante y se dejo secar el pellet o muestra de ADN que se obtuvo.

13.-Una vez seco (al ponerse de color blanquecino) se resuspendió en 40-100  $\mu$ l de agua estéril inyectable según el tamaño de la pastilla.

14.-Se realizó la cuantificación en espectrofotómetro a 260/280 nm

### **Detección Y Tipificación De VPH**

La detección de VPH se realizó mediante la técnica de RPC, utilizando tres diferentes juegos de oligonucleótidos universales que amplifican fragmentos de diferente tamaño de la región L1 de VPH (MY09/MY11/HMBO1, L1C1/L1C2.1/L1C2.2, GP5+/GP6+). Para corroborar que el ADN obtenido fuera de buena calidad y estuviera en cantidad suficiente para la amplificación por PCR, se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen  $\beta$ -globina. Los oligonucleótidos utilizados fueron GH20 y PC04 (GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') que amplifican un fragmento de 268pb (Resnick et al; 1990).

Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l conteniendo dNTPs 2mM, .5U de Amplitaq Gold ADN polimerasa, 1.5-3.0 mM de  $MgCl_2$ , Buffer 10X, 10pM de cada sonda y 200 ng de cada muestra. Los controles positivos para VPH fueron ADN extraído de las líneas celulares de cáncer cervicouterino, SiHa y CasKi. El control negativo consistió en agua estéril sin ADN de ningún tipo.

### ***Condiciones de amplificación para cada oligonucleótido***

Las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión fueron diferentes dependiendo del oligonucleótido utilizado en cada amplificación.

PC04/GH20 y MY09/MY11/HMB01

94°C por 10 minutos, 94°C 50 segundos, 55°C 50 segundos, 72°C 55 segundos, a estas condiciones se sometieron por 38 ciclos; y un último ciclo de extensión a 72°C por 7 minutos, y al final se mantuvo la reacción a 4°C.

L1C1/L1C2.1/L1C2.2

94°C por 10 minutos, 92°C 30 segundos, 53°C 30 segundos, 72°C 30 segundos, a estas condiciones se sometieron por 30 ciclos; y un último ciclo de extensión a 72°C por 4 minutos, y al final se mantuvo la reacción a 4°C.

GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup>

95°C por 10 minutos, 95°C 1 minuto, 40°C 2 minutos, 72°C 1.30 minutos, a estas condiciones se sometieron por 40 ciclos; y un último ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos, y al final se mantuvo la reacción a 4°C.

El resultado de la amplificación se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, comparando con un marcador de peso molecular para ADN. Las muestras positivas para VPH fueron secuenciadas por medio de un secuenciador automático, ABI PRISM 3100 AVANT, con el uso del equipo Big Dye terminator V3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos contenida en el programa BLAST para su análisis y determinar el tipo de VPH específico. ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> NCBI GenBank ).

## **Análisis de datos**

Se planeo de acuerdo con el caso, realizar las comparaciones entre la infección por VPH y las variables clínico-patológicas con la prueba de  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher, así como con la razón de momios, con intervalos de confianza del 95%, así como realizar comparaciones múltiples con el modelo de riesgos proporcionales de Cox, con el nivel de significación estadística igual o menor de 0.05 en ambos casos. Sin embargo, dados los resultados, solo fue necesario el análisis descriptivo.

## **ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACION**

### **Aspectos éticos**

Proceso de obtención de muestras: la obtención de las muestras no represento ningún riesgo para las pacientes.

Proceso de obtención del consentimiento informado: El consentimiento informado se solicito mediante la entrevista directa con las pacientes elegibles para el estudio.

Acuerdos para indemnización a los pacientes participantes por daños potenciales derivados del estudio: No aplican para el estudio.

### **Aspectos financieros**

El trabajo fue apoyado por el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología de México, con el sustento del departamento de Patología y del Laboratorio de Virus y Cáncer del Departamento de Investigación del mismo Instituto.

## Actividades realizadas por el alumno

- Reclutamiento de las pacientes: se invito a participar a todas las pacientes que reunieran los criterios de inclusión que estuvieran programadas para mastectomía en el Instituto Nacional de Cancerológica.
- Se recabaron los consentimientos informados de todas las pacientes que participaron en el estudio. Se anexa el formato del mismo (Anexo I).
- Toma de citología cervical y exudado cérvico-vaginal para citología y determinación de infección por VPH.
- Se recolectaron las piezas quirúrgicas inmediatamente posterior a la escisión de las mismas, y fueron llevadas al laboratorio de Patología, para obtención del tejido neoplásico, tejido sano y piel del pezón.
- Recolección de datos clínico-patológicos del expediente.
- Asistencia en el laboratorio de biología molecular para la extracción del ADN y genotipificación del VPH.
- Análisis de los resultados clínicos, patológicos y moleculares.
- Escritura del trabajo.

## Cronograma de actividades

<b>Periodo</b>	<b>Actividad</b>
<b>Febrero – Marzo 2009</b>	<b>Elaboración del protocolo</b>
<b>Abril 2009 – Mayo 2009</b>	<b>Aprobación por comité científico</b>
<b>Junio 2009 -Marzo 2010</b>	<b>Reclutamiento de pacientes</b> <b>Recolección de consentimiento informado</b> <b>Toma de citologías y muestras cérvico-vaginales</b> <b>Recolección de especimenes quirúrgicos y entrega en el Departamento de Patología</b> <b>Obtención de tejido neoplásico, tejido sano y tejido de pezón del espécimen quirúrgico y entrega en el Departamento de Biología Molecular</b>
<b>Abril 2010- Junio 2010</b>	<b>Procesamiento de las muestras y realización de la base de datos</b>
<b>Julio 2010</b>	<b>Análisis de resultados</b>
<b>Agosto 2010</b>	<b>Elaboración del informe final y entrega de la tesis</b>

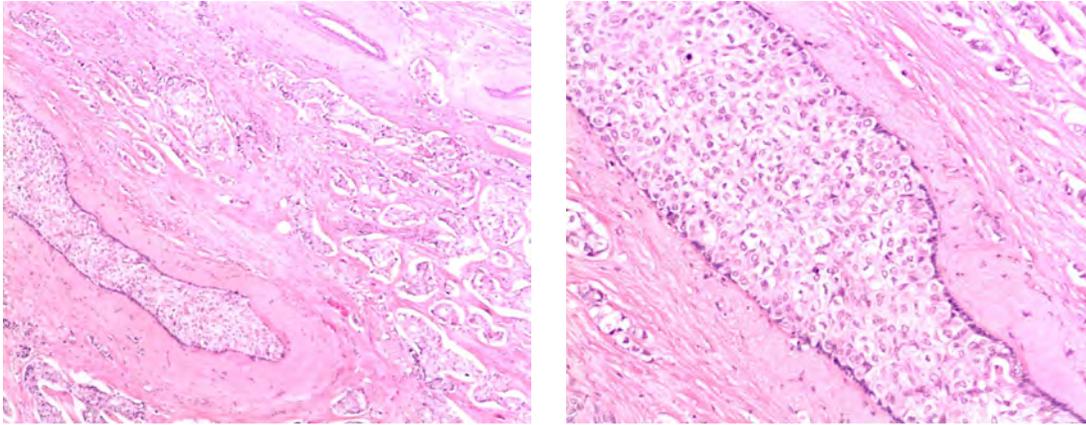
## RESULTADOS

Se estudiaron 40 pacientes y se identificaron dos pacientes (5%) positivas para VPH en el tumor, la primera con infección de VPH 53 y la segunda con VPH 45. No se encontró evidencia por RPC de infección por VPH en ninguno de los 40 casos en las muestras de tejido mamario sano, ni en el pezón.

La paciente infectada con VPH-53 en el tejido neoplásico tenía 69 años de edad, era posmenopausica, sin antecedentes familiares y sin factores de riesgo, con EC I (T1N0M0). Esta paciente fue tratada con mastectomía y ganglio centinela. El informe histopatológico fue de carcinoma canalicular Infiltrante (CCI) con SBR de 8 en el 80% mas carcinoma ductal *in situ* de grado alto con necrosis en el 20% (**Figura 1**), con tumor de 1.5 cm y sin afección ganglionar, receptores de estrógenos (RE) positivos receptores de progesterona (RP) positivos y Her2 neu negativo. (**Figura 2**)

La paciente infectada con VPH 43 en el tejido neoplásico, fue una paciente de 48 años de edad, perimenopausica, sin antecedentes familiares y sin factores de riesgo, con EC IIA. (T1N1M0). Fue tratada con mastectomía y ganglio centinela. El informe histopatológico fue de carcinoma mixto con CCI con SBR de 6 en el 40% y carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) en el 60% en un tumor de 1.2 cm y sin afección ganglionar, con RE y RP positivos y Her2 negativos.

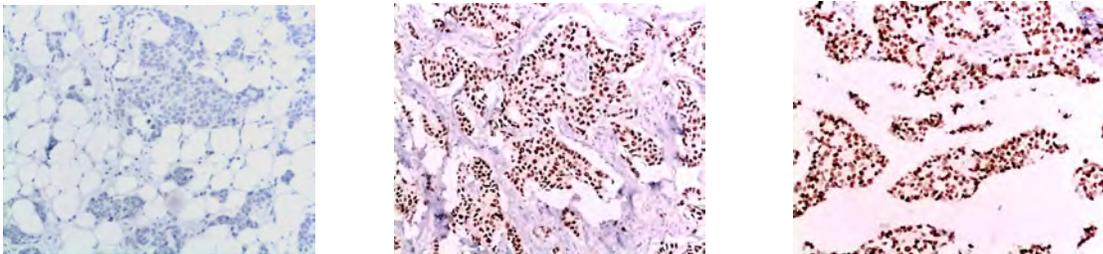
La infección por VPH se demostró también en las muestras de cérvix, con coinfección en el caso de la primera paciente con VPH 58 (**Figura 3**). Las citologías con técnica de Papanicolau fueron informadas como lesión Intraepitelial de bajo grado (Infección por VPH) en la primera paciente (**Figura 4**) y cambios celulares reactivos asociados a inflamación en la segunda.



A

B

**Figura 1. A). Carcinoma canalicular (ductal) *in situ* (izquierda) e infiltrante (derecha) de la glándula mamaria. (Hematoxilina y eosina, 4X). B). Las células neoplásicas obliteran la luz de un conducto. (Hematoxilina y eosina, 10X)**

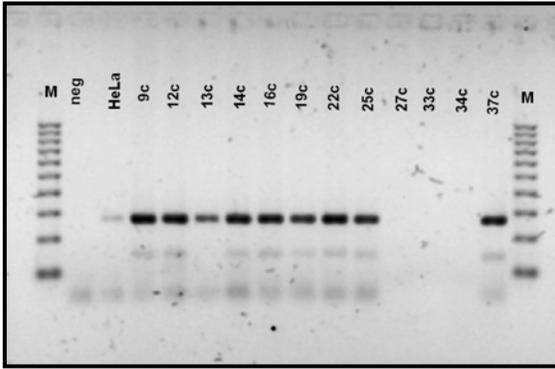


A

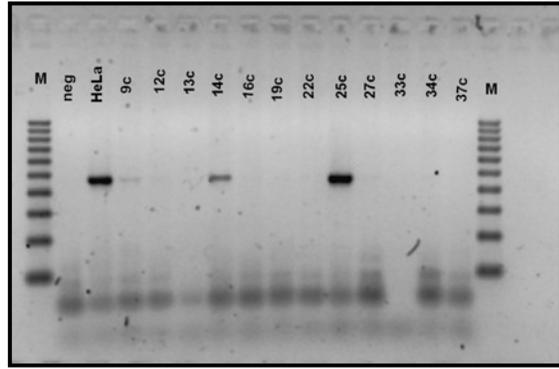
B

C

**Figura 2. A). Las células neoplásicas son negativas con la inmunoreacción para HER-2 (Herceptest, 10X). B). La inmunoreacción para receptores de estrógenos es positiva en los núcleos de las células neoplásicas (color café tabaco, 10X). C). La inmunoreacción para receptores de progesterona es positiva en los núcleos de las células neoplásicas (color café tabaco, 10X)**

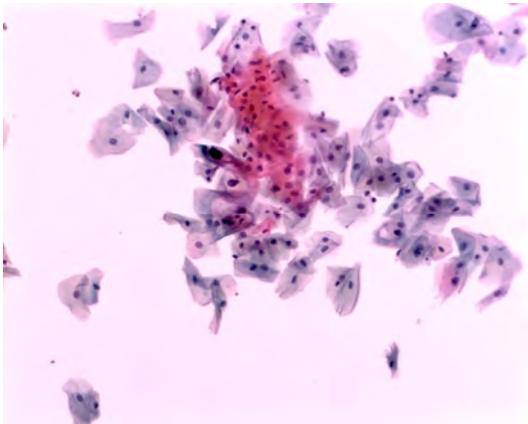


A

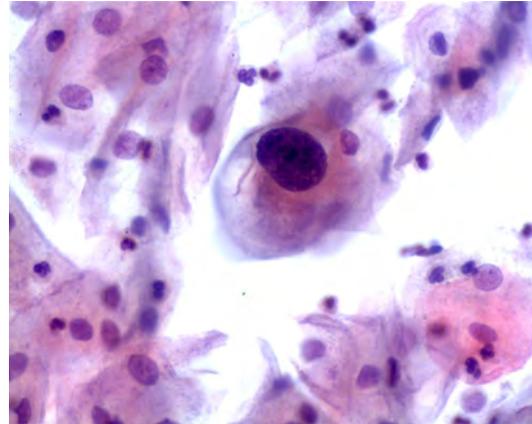


B

**Figura 3. A). Amplificación por PCR del gen B-globina, con oligos GH20/PC04. M: marcador de peso molecular 100pb. Neg: control negativo. HeLa: control positivo. A partir del tercer carril: Muestras de cérvix. B). Amplificación por PCR del gen L1 de VPH, con Oligos MY09/MY11/HMB01. M: marcador de peso molecular 100pb. Neg: control negativo. HeLa: control positivo. A partir del tercer carril: Muestras de cérvix**



A



B

**Figura 4. A). Área de exudado cervico-vaginal, con una célula con daño citopático por virus del papiloma humano. (Papanicolaou, 10X). B). Acercamiento del exudado cérvix donde se visualiza una célula infectada por el virus del papiloma humano presenta crecimiento e hiper cromatismo nucleares. (Papanicolaou, 40X).**

La edad promedio en el grupo de pacientes sin evidencia de VPH en el tumor fue de 52.3 años (34 a 81 años). El promedio de edad entre las pacientes infectadas fue de 58.5. La mitad de las pacientes se encontró en la posmenopausia en ambos grupos. Entre las 40 pacientes se encontraron 5 casos en etapa clínica (EC) I, 17 casos en EC IIA, 10 casos en EC IIB, 4 casos en EC IIIA y 4 casos EC IIIB. El promedio del tamaño tumoral fue de 3.55cm (0.4 cm a 20 cm). Los RE fueron negativos en 16 casos, y los RP en 17 casos, con el Her2 neu positivo en 7 casos.

En la **Tabla 1** se listan las variables clínico-patológicas en forma comparativa entre las pacientes en las que se encontró evidencia de infección por VPH en el tejido neoplásico y en las que no.

Se administro tratamiento con quimioterapia neoadyuvante en 11 casos, incluidos los 8 casos en EC IIIA y IIIB, y 3 casos en EC IIB, hubo respuesta parcial en todos ellos. Ninguno de los casos en los que se identifico ADN de VPH recibió tratamiento adyuvante.

Se identifico evidencia de infección por VPH en 3/40 (7.5%) por citología y en 7/40 casos (17.5%) por PCR. Los genotipos identificados fueron VPH 43, -45, -51 como mono-infección y VPH 53 y-58, VPH 53 y-52, y VPH 56 y 61 en pacientes poli-infectadas, en una paciente se encontró positiva la  $\beta$ -globina y MY's, mas no fue posible realizar la genotipificación del virus en este caso.

**Tabla 1. Características Clínico-patológicas  
del Carcinoma de la Glándula Mamaria**

	VPH (+) n=2	VPH (-) n=38
	n(%)	N(%)
<b>Edad</b>	<b>58.5</b>	<b>52.3</b>
<b>Histología</b>		
<b>-Ductal</b>	<b>2 (100%)</b>	<b>27 (71%)</b>
<b>-Lobulillar</b>	<b>0</b>	<b>3 (7.8%)</b>
<b>-Mixto</b>	<b>0</b>	<b>12 (31.5%)</b>
<b>EC Temprana</b>	<b>2 (100%)</b>	<b>31 (81.5%)</b>
<b>EC Avanzada</b>	<b>0</b>	<b>7 (18.4%)</b>
<b>RH Positivos</b>	<b>2 (100%)</b>	<b>22 (58%)</b>
<b>RH Negativos</b>	<b>0</b>	<b>16 (42%)</b>
<b>Her 2 Positivos</b>	<b>0</b>	<b>7 (18.4%)</b>
<b>Her 2 Negativos</b>	<b>2 (100%)</b>	<b>31 (81.6%)</b>
<b>Tamaño Tumoral &lt; 2 cm</b>	<b>2 (100%)</b>	<b>13 (34.2%)</b>
<b>Tamaño Tumoral 2-4 cm</b>	<b>0</b>	<b>18 (47.3%)</b>
<b>Tamaño Tumoral &gt; 4 cm</b>	<b>0</b>	<b>7 (18.4%)</b>
<b>Citología Cervical con VPH</b>	<b>1 (50%)</b>	<b>2(5.2%)</b>
<b>RPC Cervical con VPH</b>	<b>2 (100%)</b>	<b>5 (13.2%)</b>
<b>Tipos de VPH en Cérvix</b>	<b>45, 53 y 58</b>	<b>43, 51, 53 y 52, y 56 y 61, *</b>

EC: Etapa Clínica, RH: Receptores Hormonales, PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. VPH: Virus del Papiloma Humano. \* Una paciente positiva la  $\beta$ -globina y MY's, no fue posible realizar la genotipificación

## DISCUSIÓN

El origen de la hipótesis de que el VPH pudiera estar involucrado en el cáncer de la glándula mamaria surge a principios de la década de los 90's cuando Ban y col. describieron la inmortalización de células normales de epitelio mamario humano por plasmidos de VPH 16 o 18. En 1992 Di Lonardo y col.<sup>26</sup> informan la asociación del VPH con el cáncer de la glándula mamaria, en su análisis utilizaron RPC y encontraron evidencia de VPH 16 en el 29.4 % de los casos. Para 1995 Wazer y col.<sup>27</sup> demostraron la capacidad de las proteínas E6 y E7 de VPH 16 de inmortalizar células de epitelio mamario abriendo la posibilidad de que el VPH este implicado en la patogénesis de algunos tipos de cáncer de mama. A finales de esa década Hennig y col.<sup>28</sup> encuentran ADN de VPH 16 por RPC en el 46% de los casos de un grupo de pacientes con antecedente de neoplasia Intraepitelial cervical grado III (NIC III), y sugirieron que la vía de diseminación del VPH pudiera ser hematógica o linfática y ser un posible factor para el desarrollo de cáncer de mama.

Durante los últimos 20 años, con la disponibilidad y estandarización de técnicas de biología molecular la presencia del VPH en tejido neoplásico de pacientes con cáncer de mama ha sido estudiada en población de países como Australia, Austria, Brasil, China, Corea, Estados Unidos, Grecia, India, Inglaterra, Italia, Hungría, México, Noruega, Siria, Taiwán y Turquía, y se han encontrado prevalencias del 0% hasta 86.2%. En la **Tabla 2** y **Tabla 3** se listan los más importantes.

**Tabla 2. Estudios que muestran presencia de VPH en Carcinoma de la Glándula Mamaria**

<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Análisis</b>	<b>Prevalencia de VPH</b>	<b>Asociación</b>
Hennig y col	Noruega	1999	Parafina	46%	Positiva
Yu y col	China/Japón	1999	Parafina	44.1%/16.6%	Positiva
Andrea y col	Brasil	2004	Parafina	24.75% en carcinoma 0% en tejido sano	Positiva
Kan y col	Australia	2005	Congelado	48%	Positiva
Tsai y col	Taiwan	2005	Congelado	12.9%	Positiva
Akil y col	Siria	2008	Parafina	61.06%	Positiva
Heng y col	Inglaterra	2009	Parafina	39% CDIS 23% CDI	Positiva
Cantu de León y col	México	2009	Parafina	29.4%	Positiva

**Tabla 3. Estudios sin evidencia, poca frecuencia o carga viral baja**

<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Análisis</b>	<b>Prevalencia de VPH</b>	<b>Asociación</b>
Brattahauer y col	EU	1992	-	0%	Sin relación
Wrede y col	Inglaterra	1992	-	0%	Sin relación
Golpalkrishna	India	1996	Congelado	0%	Sin relación
de Cremoux y col	Francia	2008	Parafina	0%	Sin relación
Khan y col	Japón	2008	Congelado	21%	Dudosa por carga viral baja
Mendizábal-Ruiz y col	México	2009	Parafina	4.4%	No importante

Andrea y col. de Brasil,<sup>29</sup> publican en el 2004 la prevalencia de VPH en tumores de mama en pacientes Brasileñas realizando una correlación con factores pronósticos. Su análisis se realizó en tejido incluido en parafina por RPC y secuenciación de el gen E6 del VPH, se incluyeron también 20 especímenes de mamoplastía y 21 fibroadenomas como control no maligno. Se detecto ADN de VPH en el 24.75% de los especímenes de carcinomas y no se detecto en ninguna muestra de lesiones benignas con una  $p < 0.001$ . De los casos positivos, el 56% fue VPH 16 y el 40% VPH 18, y en el 4% se identifico ADN de VPH de ambos tipos. No se encontró correlación entre la presencia de VPH y factores predictores específicos. Concluyendo que la presencia de VPH pudiera relacionarse con el desarrollo de fenotipo maligno

En el 2005 Kan y col. Publican el análisis por RPC de 50 especímenes congelados de mujeres australianas con cáncer de mama, encontrando positivas para VPH a 48 (24%). No hubo correlación con el grado, supervivencia, estado de los RH, ERB-2, expresión de p53 y mutaciones. Con sus resultados sugieren que el VPH pudiera tener un rol en la etiología del cáncer de mama y especulan que la transmisión del mismo pudiera ser vía mano desde el perineo de la paciente.<sup>30</sup>

En el 2008 Akil y col.,<sup>31</sup> Estudiaron el efecto de las oncoproteínas E6/E7 de VPH de alto riesgo 16 en dos líneas celulares no invasoras, BT20 y MCF7, encontrando que E6/E7 convierten estas líneas celulares en invasoras, esto acompañado de sobre expresión de Id-1, que se sabe es un importante regulador de metástasis en cáncer de mama, se dan a la tarea de investigar la presencia de VPH de alto riesgo, la expresión de la oncoproteína E6 y si correlación con la expresión del gen Id-1. Encontraron positividad para VPH en el 61.06% de las pacientes, con 34.78% co-infectadas con mas de un tipo de VPH. Además encontraron que la expresión de E6 correlaciono con la sobre expresión de Id-1 el la mayoría de los canceres invasores. En su conclusión sugirieron que la infección por VPH pudiera estar asociada con la progresión del cáncer de mama.

Heng y col.<sup>32</sup> de la Universidad de Nee South Wales en el 2009, Criticaron la RPC por su propensidad a la contaminación y utilizaron , RPC in situ y estándar e histología basada en microscopia de luz. Ellos demostraron la presencia de VPH de alto riesgo en especímenes de cáncer de mama y encontraron que características oncogénicas del VPH asociado a cáncer de mama son muy similares a las del VPH asociado a cáncer de cérvix, especialmente la presencia de koilocitos encontrados en algunos especímenes asociados a VPH. Concluyeron un posible rol causal del VPH en el cáncer de mama y la posibilidad de prevención primaria de algunos canceres de mama con la vacunación en contra del VPH

Los estudios que generan polémica respecto a la hipótesis de que el VPH pudiera ser factor causal del cáncer de mama ya que no encontraron presencia de ADN de VPH en las muestras analizadas, lo encontraron en un porcentaje mínimo, o encontraron cargas virales muy bajas. **Tabla 3.**

Bratthauer y col.<sup>33</sup> en Estados Unidos y Wrede y col.<sup>34</sup> en Inglaterra publicaron en 1992 una frecuencia del 0% en los estudios que realizaron en búsqueda de VPH en carcinoma de la glándula mamaria. Posteriormente en 1996, Gopalkrishna y col.<sup>35</sup> de la India tampoco encontraron evidencia de VPH en relación con carcinoma de la glándula mamaria.

De Cremoux y col.<sup>36</sup> del Instituto Curie reportaron en el 2008 su experiencia, analizaron por RPC 50 muestras de pacientes con cáncer de mama. No detectaron ADN de VPH en ninguna paciente por lo que sus resultados se oponen a la teoría del rol del VPH en la patogénesis del cáncer de mama. Khan y col.<sup>37</sup> reportaron en el 2008 el análisis realizado en 124 pacientes Japonesas con cáncer de mama donde estudiaron la presencia, el genotipo, la carga viral y el estado físico del VPH. Se detecto ADN de VPH en el 21%, VPH-16 en el 92% de los casos, seguido de HPV-6 (46%), HPV-18 (12%) y HPV-33 (4%). El análisis por RPC sugirió la presencia de la forma integrada del DNA viral, pero con carga viral

muy baja, por lo que concluyeron que es poco probable que el VPH este etiológicamente involucrado en el desarrollo de carcinoma de la glándula mamaria. En el 2008 Cazzaniga y col.<sup>38</sup> Reportaron un estudio en el que se analizó por una técnica de RPC altamente sensible la prevalencia de VPH alfa en mucosas y VPH beta en piel. Utilizaron el ADN obtenido de 90 lavados ductales, calostro o leche. Se encontraron múltiples tipos de VPH beta en el 14% de los lavados, mientras que solo se encontró VPH alfa de alto riesgo en 1/70 muestras. Concluyeron que dada la baja prevalencia de VPH en los fluidos de la mama el rol del VPH en la carcinogénesis de la glándula mamaria es poco probable.

Los autores que han publicado estudios realizados en pacientes Mexicanas son Cantú de León y col y Mendizábal-Ruiz y col.

En el 2009 Cantú de León y col.<sup>39</sup> publicaron su experiencia en pacientes mexicanas, ellos investigaron la prevalencia de ADN de VPH en especímenes de 43 pacientes con lesiones no malignas como fibroadenoma, enfermedad fibroquística y tumor phyllodes , y 51 casos de pacientes con cáncer de mama. El tejido embebido en parafina fue analizado por RPC y en caso de ser positivo se buscó el tipo de VPH asociado. En las pacientes con carcinoma se encontró evidencia de infección por VPH en el tejido neoplásico en el 29.4%, siendo el más común el VPH 16 (66.6%), seguido del 18 (20%), y en el 13.4% de los casos se encontró la coinfección de estos de tipos. No se encontró ADN de VPH asociado a los especímenes de enfermedades no malignas. Ellos sugirieron análisis en un mayor número de casos para determinar el rol exacto de este virus en la patogénesis del cáncer de mama.

En el 2009 Mendizábal-Ruiz y col.<sup>40</sup> Publicaron su experiencia reportando una baja frecuencia de ADN de VPH en pacientes con cáncer de mama mexicanas. Ellos analizaron 67 especímenes de pacientes con cáncer de mama y 40 de pacientes con enfermedad no maligna con RPC. Encontraron una incidencia de 4.4% con 3

de las 67 muestras positivas con genotipos VPH-16, -18 y -33 Concluyeron que el VPH no tiene un papel importante en la carcinogénesis de la glándula mamaria.

La publicación de un estudio realizado por el Instituto Nacional de Cancerológica de México en conjunto con la Universidad de Kagoshima, Japón esta pendiente, Herrera-Goepfert y col. Analizaron especímenes de pacientes con carcinoma de la glándula mamaria, pezón y tejido adyacente no neoplásico. Se identifico ADN de HPV en 6 de 60 carcinomas (10%), en dos de ellos se identifico también en el tejido no neoplásico adyacente. En 7 casos de identifico ADN de VPH solo en tejido no neoplásico, 4 en pezón y 3 en tejido adyacente no neoplásico. Se analizaron también 10 casos con terapia neoadyuvante en los cuales se encontró respuesta patológica completa identificando ADN de HPV en el área de fibrosis residual en 4 casos, y en dos de ellos también en tejido no neoplásico adyacente y/o en el pezón. Se identifico que el ADN del VPH-16 estaba integrado, sin embargo la carga viral detectada fue muy baja por lo que los autores concluyen que no puede excluirse la posibilidad de que la infección haya sido adquirida en etapas tardías de la carcinogénesis.

La integridad del ADN en especímenes fijados en parafina es baja lo que puede explicar la falta de detección en algunos estudios. Por otro lado la técnica de PCR puede presentar falsos positivos en forma importante principalmente por problemas de contaminación, pudiendo ser la causa de reportes con incidencias muy altas.

En este estudio se realizo por primera vez la búsqueda de VPH en tejido neoplásico de pacientes Mexicanas con cáncer de mama en especímenes frescos, extrayéndose el tejido previo a su fijación en formol. Se analizo tejido neoplásico, tejido sano y piel del pezón Se realizo también citología cervical con técnica de Papanicolaou y detección y tipificación de VPH en muestra cervical. Encontramos una incidencia de ADN de VPH en tejido neoplásico de pacientes con cáncer de mama del 5%, similar a la encontrada por Mendizabal-Ruiz y col.<sup>40</sup>(4.4%)

Los tipos de VPH identificados en tejido neoplásico de la mama fueron el 53 y el 43 a diferencia de Cantú de León y col.<sup>39</sup> quienes encontraron VPH 16 y -18, Mendizabal-Ruiz y col.<sup>40</sup> encontraron VPH 16, -18 y -33.

Lazcano-Ponce y col.<sup>41</sup> reportaron que los tipos más comúnmente identificados en población Mexicana son HPV 16, HPV 53, HPV 31 y HPV 18, Si bien en nuestro estudio identificamos dos casos con infección cérvico-vaginal por VPH 53 el resto de los genotipos identificados ( 43, 45, 41, 52, 56, 58 y 61,) no son los mas frecuentes.

La incidencia de infección por VPH en muestras cervicales identificada por RPC fue del 17.5%, similar a la reportada por Lazcano-Ponce y col. en el 2001 del 14.4%.

Existe la interrogante respecto a los mecanismos de transmisión del VPH al tejido de la glándula mamaria, postulándose como una de las probables vías contagio el contacto durante la relación sexual o por la mano de la paciente desde su perineo infectado, se ha sugerido también diseminación hematológica y linfática como probables opciones.<sup>42 43</sup>

Lawson y col<sup>44</sup> sugirieron que si la hipótesis de transmisión vía sexual es correcta entonces los canceres asociados a VPH se encontrarían mas frecuentemente entre mujeres jóvenes ya que la infección genital por VPH es mucho mas común en este grupo de pacientes. Cantú de León y col<sup>39</sup> reportaron una edad media de 48.13 en el grupo de pacientes con VPH asociado a carcinoma de la glándula mamaria contra 55.36 años de edad en el grupo sin evidencia de VPH. La frecuencia de VPH en carcinoma de la glándula mamaria en este estudio fue muy baja como para emitir un juicio, sin embargo el no tener evidencia de infección por VPH en el pezón y en el tejido sano de las pacientes positivas para VPH en la neoplasia nos orienta más a apoyar la hipótesis de diseminación hematológica.

El estudio de Cantú y col<sup>39</sup>, el tamaño tumoral fue el único valor con significado estadístico ( $p < 0.008$ ), encontrando que a mayor el tumor, mayor la posibilidad de encontrar VPH, siempre y que el tumor no exceda los 4 cm. En nuestro estudio encontramos que las tumoraciones de las dos pacientes con VPH son menores de 4 cm.

## CONCLUSIONES

En este estudio encontramos que a presencia de VPH en carcinomas de la glándula mamaria en mujeres Mexicanas es baja y la menor encontrada en pacientes atendidas en el Instituto Nacional de Cancerológica (5%).

Las pacientes con VPH en el tejido neoplásico de la mama tuvieron infección cérvico-vaginal simultanea con el mismo genotipo de VPH lo que sugiere que vía de diseminación mas probable es la sanguínea, en apoyo de esta hipótesis; las muestras del pezón y el tejido normal resultaron negativas para cualquier tipo de VPH.

Nuestros hallazgos concuerdan con las series Mexicanas de pacientes con VPH y cáncer de mama previas, en las que se informa menor tamaño en las neoplasias asociadas a VPH.

Es necesario aumentar el número de casos y analizar las cargas virales para estudiar una relación causal.

El estudio de la asociación del cáncer de la glándula mamaria y el VPH, requiere la utilización de otras técnicas moleculares como cargas virales y anticuerpos anti-VPH en sangre periférica para poder obtener colusiones validas.

Es necesario estudiar la relación del VPH con la constitución genética de las pacientes para demostrar que la presencia del VPH en tejido mamario puede favorecer la transformación del tejido sano a tejido neoplásico.

## ANEXO 1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Queremos invitarla a participar en el estudio de investigación titulado "Expresión de virus del papiloma humano (VPH) de riesgo alto en carcinomas de glándula mamaria". Para que usted pueda decidir si desea o no colaborar, es necesario que conozca el tipo de proyecto al que se le invita. Su decisión será con base en la información aquí contenida. Una vez que haya comprendido el propósito del estudio y acepte participar, podrá firmar esta carta de consentimiento informado. Si hay algo que no comprenda o si tiene alguna pregunta, pídale a su médico que se lo explique.

El propósito de este estudio es determinar la presencia y el tipo de virus del papiloma humano en cáncer de mama. El virus del papiloma humano es el principal agente causal del cáncer cérvico-uterino pero en los últimos años, también se ha encontrado en otros tipos de cáncer, entre ellos, en algunos casos de cáncer de la mama.

Si acepta participar en este estudio, le será tomada una muestra cérvico-vaginal (estudio de Papanicolaou), lo que permite buscar intencionadamente en el cuello uterino (cérvix) lesiones epiteliales premalignas asociadas con la infección por el virus del papiloma humano. El estudio se complementará con el análisis del tipo viral que se encuentre. El resultado de su Papanicolaou se le dará a conocer posteriormente.

Su participación en este estudio no implica la administración gratuita de medicamentos ni la prestación gratuita de otros servicios por parte del Instituto Nacional de Cancerología.

Los resultados del estudio no repercutirán en el tratamiento que usted recibirá. Toda información que se obtenga permanecerá confidencial y será consignada al expediente correspondiente. Usted no será identificada en ninguna publicación o presentación que parta del mismo.

Su participación es voluntaria. Puede negarse a participar si así lo decide. En caso de que así lo desee, la atención que como paciente reciba de la Institución no se verá afectada.

He leído la información anterior y comprendo el propósito del protocolo. He tenido la oportunidad para preguntar mis dudas y todas mis preguntas han sido aclaradas. Por tanto, DOY MI LIBRE CONSENTIMIENTO, para ser participante.

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ No. Expediente provisional o definitivo \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DEL MEDICO \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

## Referencias Bibliograficas

---

- 1 WHO. World Cancer Report 2008.
- 2 OMS. Nota descriptiva No. 297.
- 3 Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas 2003.
- 4 SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute.
- 5 Degnim, AC, Visscher, DW Berman, HK et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. J Clin Oncol 2007; Vol 25, pp. 2671.
- 6 Colditz GA et al. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from de Nurse's Health Study. Am J Epidemiol 2000; 152: 950.
- 7 Beral V; Million Women Study Group, Breast Cancer and Hormone Replacement Therapy, Lancet 362; 419-27, 2003
- 8 N Engl J Med 2002;346:2025-32
- 9 Van Den, Brandt PA, Spiegelman, D, Yaun, SS, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight and breast cancer risk. Am J Epidemiol 2000; Vol 152, pp 514.
- 10 Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. Br J Cancer 87: 1234-45, 2002.
- 11 Thiebalt AC, Kipnis v, Chang SC et al. Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in de National Institutes of Health Study Cohort. J National Cancer Inst 2007, 99: 451.
- 12 Cho e, Spiegelman D, et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst 2003;, 95: 1079.
- 13 Harris, Diseases of The Breast, 3rd Edition, 2004; pp. 77-79.
- 14 Bland and Copleland, The Breast, 4th Edition, 2010.
- 15 Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2009;62:181-189.
- 16 The Lancet Oncology. 2005;6:980-987.
- 17 Giardiello FM, Trimbath JD. Peutz-Jeghers Syndrome and Management Recommendations. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2006;4:408-415

- 
- <sup>18</sup> Land, C.E.; McGregor, D.H. Breast cancer incidence among atomic bomb survivors: implications for radiobiologic risk at low doses. *J. Natl. Cancer Inst.* 1979, 62, 17–21
- <sup>19</sup> Factores de riesgo estan bien establecidos, sin embargo estos no son identificados hasta en el 50 a 80 % de los casos.
- <sup>20</sup> David Cantu de León, Delia Pérez Montiel, Jana Nemcova, Iva Mykyskova, Elmer Turcios, Verónica Villavicencio, Lucely Cetina<sup>1</sup>, Alberto Coronel and Ondraj Hes. Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer* 2009, 9:26
- <sup>21</sup> Lawson JS, Tran DD, Carpenter E, Ford CE, Rawlinson WD, Whitaker NJ, Delprado Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer. *W J Clin Pathol.* 2006 Dec;59(12):1287-92.
- <sup>22</sup> James S. Lawson and Benjamin Heng. Viruses and Breast Cancer. *Cancers* 2010, 2, 752-772
- <sup>23</sup> Buehring, G.C.; Shen, H.M.; Jensen, H.M.; Block, G. Bovine leukemia virus infection is significantly associated with risk of breast cancer. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 2007,48, 1747.
- <sup>24</sup> Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD, Alexandre CO (2007) Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 33: 569–574
- <sup>25</sup> de Sanjose´ S, Diaz M, Castellsague´ X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical. human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a metaanalysis. *Lancet Infect Dis* 7: 453– 459
- <sup>26</sup> Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML: Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 21: 95–100, 1992
- <sup>27</sup> DAVID E. WAZER, XIAO-LONG LIU, QIUMING CHU, QINGSHEN GAO, AND VIMLA BAND. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 92, pp. 3687-3691, April 1995. *Cell Biology*
- <sup>28</sup> Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM: Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat* 53: 121–135, 1999
- <sup>29</sup> Andrea P.S. Damin, Rachid Karam, Claudio G. Zettler, Maira Caleffi, and Claudio O.P. Alexandre. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment* 84: 131–137, 2004.

- 
- <sup>30</sup> C-Y Kan<sup>1</sup>, BJ Iacopetta<sup>2</sup>, JS Lawson,<sup>1</sup> and NJ Whitaker<sup>1</sup>. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer *British Journal of Cancer* (2005) 93, 946 – 948
- <sup>31</sup> N Akil<sup>1</sup>, A Yasmeen, A Kassab, L Ghabreau, AD Darnel and A-E Al Moustafa. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *British Journal of Cancer* (2008) 99, 404 – 407
- <sup>32</sup> B Heng, WK Glenn, Y Ye<sup>1</sup>, B Tran, W Delprado, L Lutze-Mann, NJ Whitaker<sup>1</sup> and JS Lawson, Human papilloma virus is associated with breast cancer. *British Journal of Cancer* (2009) 101, 1345 – 1350
- <sup>33</sup> Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ. Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathol Res Pract.* 1992 Apr;188(3):384-6.
- <sup>34</sup> Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, Vousden KH. Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br J Cancer.* 1992 Jun;65(6):891-4.
- <sup>35</sup> Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39(2):197-202.
- <sup>36</sup> de Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X; Institut Curie Breast Group No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(1):55-8.
- <sup>37</sup> NA Khan, 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. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *British Journal of Cancer* (2008), 1 –7
- <sup>38</sup> Massimiliano Cazzaniga, Tarik Gheit, Chiara Casadio, . Noreen Khan, Debora Macis, Francesco Valenti, Mara Jo Millar, Bakary S. Sylla, Suminori Akiba, Bernardo Bonanni, . Andrea Decensi, Umberto Veronesi, Massimo Tommasino. Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2008.
- <sup>39</sup> David Cantu de León, Delia Pérez Montiel, Jana Nemcova, Iva Mykyskova, Elmer Turcios, Verónica Villavicencio, Lucely Cetina, Alberto Coronel and Ondraj Hes. Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer* 2009, 9:26
- <sup>40</sup> Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramírez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Morán-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Mar;114(1):189-94.

- 
- <sup>41</sup> Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):412-20.
- <sup>42</sup> Bryan, J.T.; Brown, D.R. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 2001, 281, 35–42.
- <sup>43</sup> Pao, C.C.; Lin, S.S.; Lin, C.Y.; Maa, J.S.; Lai, C.H.; Hsieh, T.T. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991, 95, 540–546.
- <sup>44</sup> JS Lawson, CY Kan, BJ Iacopetta. Are some breast cancers sexually transmitted? *British Journal of Cancer* (2006) 95, 1708