



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA



SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Identificación de Secuencias del Virus del Papiloma Humano
en Cáncer de Mama Ductal Infiltrante”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

PRESENTA

LISBETH HERRERA ROMANO

DIRECTORES DE TESIS

**Dr. EDUARDO GÓMEZ CONDE
Dr. GUILLERMO CEBALLOS REYES**

México, D. F.

mayo 2010

LUGAR DE REALIZACIÓN: DEPARTAMENTO DE HISTOPATOLOGÍA DEL HOSPITAL ISSSTEP DE LA CD. DE PUEBLA, Y CENTRO MÉDICO SIGLO XXI EN EL AREA DE ONCOLOGÍA MOLECULAR.

ÍNDICE

Abstract:	8
Resumen	9
1. Introducción.....	11
1.1 Epidemiología:.....	11
1.1.1 Factores De Riesgo:.....	12
1.1.1.1genéticos	12
1.1.1.2 No Genéticos.....	13
1.1 Fisiología De La Mama.....	14
1.2 Anatomía	14
1.2 Tipos Histológicos:	15
1.2.1 Tipos Histologicos De Cancer De Mama.....	16
1.2.2 Desarrollo Del Cáncer:	16
1.2.3 Virus Del Papiloma Humano	20
1.2.4 Antecedentes Específicos:	23
2.- Justificación:.....	25
3.- Planteamiento Del Problema:.....	25
Pregunta Científica:.....	25
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo General:	26
4.2 Objetivos Específicos.	26
5. Material Y Métodos:	26
5.1- Diseño Del Estudio.....	26
5.2 Características Del Estudio	26
5.3 Población De Estudio	26
5.4. Criterios De Selección:.....	27
5.4.1 Criterios De Inclusión	27
5.4.2 Criterios De No Inclusión.....	27
5.4.3 Criterios De Eliminación:	27
5.5 Variables De Estudio:	27
5.5.1 Variable Dependiente : Vph.....	27
5.5.2 Variable Independiente.....	28
5.5.3 Tamaño De La Muestra.....	28
5.6.1.- Material Biológico:.....	31
5.6.2.- Se Estandarizaron Las Técnicas.....	31
5.6.3.- Aislamiento Y Extracción De Adn:.....	31
5.6.4.- Amplificación:	31
5.6.5.- Electroforesis Y Cuantificación De Ácidos Nucleicos:.....	32
5.6.6.-Tipificación De Hpv:	32
5.7 Análisis Estadístico	32
6.-Resultados:	33
7.-Discusión.....	37
8.-Conclusión	38
9. -Bibliografía	39
10.-Anexos:	44

**“IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO EN TEJIDOS DE CÁNCER DE
MAMA DUCTAL INFILTRANTE”**

Abreviaturas

CMN SXXI : Centro Médico Nacional SIGLO XXI

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa

CM: Cáncer De mama

ABSTRACT:

INTRODUCTION: The breast cancer is one of the diseases that prevail more at world-wide level, in our country is the first cause of death by cancer in women between 40-60 years old ^{1,2}. The suspicion that the human papilloma virus (HPV) has a relation with the breast cancer is due to the identification of HPV 16 and 18 in the immortalization of normal epithelium of the breast, and in cells of breast cancer types 16, 33, 11, and 18 in women of different latitudes have been detected. ^{3,4}

OBJECTIVE: To identify sequences of the human papilloma virus in tissues of infiltrating ductal breast cancer.

MATERIAL AND METHODS: 108 blocks of tissues included in paraffin were analyzed with diagnosis of cancer of infiltrating ductal breast cancer (IDBC) obtained from the Hospital ISSSTEP (period 2002 -2007). The DNA extraction was realized and the detection of HPV by means of the technique of PCR in the CENTRO MEDICO SIGLO XXI (May-September of 2008), oligonucleotides Gp5/6 were used (that detects more than 15 viral types) and HPV/E6. The control of internal amplification was a fragment of the mitochondrial D-loop/DNA region (fragment of 145 pairs of bases).

RESULTS: The quality of the purified DNA was proven by means of the amplification of the mitochondrial DNA. Also, the sensitivity of the method to amplify the viral DNA was of approximately 2 DNA copies viral /cell. From the 108 tissues included in paraffin and analyzed, was not evidence of the HPV presence.

DISCUSSION: The detection of the sequences of the HPV to a great extent depends on the sensitivity and type of used method, which often generates controversial results. In this study the samples were processed as it has been reported in diverse works and they have been validated and approved in our laboratory in reported previous studies. In addition the blocks were considered that contained more of 80% of tumorals cells and that had the maximum possibility of detection of the virus. Cellular line SIHA was used like positive control.

CONCLUSION: The results show that the studied Mexican racially mixed population affected by infiltrating ductal breast cancer , does not have evidence of viral infection. Although the relation of HPV and breast cancer is still controversial, would not discard the presence of these virus in other pathological entities of the breast (for example the condylomatosas injuries).

RESUMEN

INTRODUCCION: El cáncer de mama es una de las enfermedades que más prevalece a nivel mundial, en nuestro país es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres entre los 40-60 años ^(1,2). La sospecha de que el Virus del papiloma humano (VPH) tiene una relación con el cáncer de mama se debe a la identificación de los VPH 16 y 18 en la inmortalización del epitelio normal de la mama, y en células de cáncer de mama se han detectado los tipos 16, 33, 11, y 18 en mujeres de diferentes latitudes ^{3,4}

OBJETIVO: Identificar secuencias del virus del papiloma humano en tejidos de cáncer de mama ductal infiltrante.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se analizaron 108 bloques de tejido incluidos en parafina con diagnóstico de cáncer de mama ductal infiltrante (CMDI) obtenidos del Hospital ISSSTEP (período 2002 -2007). Se realizó la extracción de ADN y la detección de VPH mediante la técnica de PCR en el CMN SXXI (Mayo-Septiembre de 2008), se emplearon los oligonucleótidos Gp5/6 (que detectan más de 15 tipos virales) y VPH/E6. El control de amplificación interno fue un fragmento de la región D-loop/ADN mitocondrial (fragmento de 145 pares de bases).

RESULTADOS: La calidad del ADN purificado fue probado mediante la amplificación del ADN mitocondrial. Asimismo, la sensibilidad del método para amplificar el ADN viral fue de aproximadamente. 2 copias de ADN viral/célula. De los 108 tejidos incluidos en parafina analizados, no se encontró evidencia de la presencia de VPH.

DISCUSIÓN: La detección de las secuencias del VPH depende en gran medida de la sensibilidad y tipo de método usado, lo que genera muchas veces resultados controversiales. En este estudio se procesaron las muestras por el método de PCR, asimismo, la sensibilidad del método para amplificar el ADN viral fue de aproximadamente 2 copias de ADN viral/célula, tal como se ha reportado en diversos trabajos y que han sido validados y aprobados en nuestro laboratorio en estudios previos reportados. Además se consideraron los bloques que contuvieran más del 80% de células tumorales y que tuvieran la máxima posibilidad de detección de los virus. Se usó como control positivo

línea celular SiHa, garantizando con ello la máxima sensibilidad de nuestro método que de existir copias de ADN viral de VPH-16 en nuestros tejidos fueran detectadas.

CONCLUSIÓN: Los resultados muestran que la población mestiza mexicana estudiada afectada por CMDI, no tiene evidencia de infección viral. Aunque la relación de VPH y cáncer de mama es aún controversial, no se descartaría la presencia de estos virus en otras entidades patológicas de la mama (por ejemplo las lesiones condilomatosas).

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Epidemiología: El cáncer es una enfermedad que, sin importar el pronóstico y calidad de vida actual, deteriora la autoimagen de las personas que lo sufren, alteran a la familia y la relación de trabajo.

El Cáncer de mama (CM) es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula mamaria forman un tumor que invade y origina metástasis de órganos vecinos y distantes del organismo. Como otros tumores malignos, el CM es consecuencia de las alteraciones en la estructura y función de los genes, la predisposición genética se ha observado en familias con historia de cáncer; Retinoblastoma familiar, Poliposis adenomatosa familiar (gen APC), Síndromes de neoplasia endocrina múltiple, y los Síndromes hereditarios de cáncer de mama y ovario. El gen supresor de tumor BCRA1, localizado en el cromosoma 17, se encuentra mutado en algunas familias con inicio temprano de cáncer de mama y ovario. Otro gen, el BCRA2, se asocia al riesgo aumentado de cáncer de mama en los varones.¹

Por su alta frecuencia, es uno de los principales problemas de salud en la mujer mayor de 40 años. En la actualidad, a pesar de los esfuerzos encaminados para conocer la etiología del cáncer mamario, aún no se tiene la totalidad de los factores de riesgo y, por lo tanto no se ha logrado establecer una estrategia sólida de prevención. En el año 2004 la Organización Mundial de la Salud calculó que se diagnosticarían más de 1,200 000 nuevos casos, en el mundo los cuales representan el 19% del total de los cánceres en la mujer. Su frecuencia varía ampliamente; los países de Norteamérica y Europa tienen las frecuencias más altas y los países de África y Asia las más bajas.¹ Sin embargo, en años recientes hubo un incremento paulatino en muchos países Asiáticos en particular Japón y Singapur, donde se produjo un cambio en el estilo de vida (occidentalización).^{1,3} Se ha comprobado en las poblaciones que emigraron de Asia a Estados Unidos que en las generaciones nacidas en el país del Norte el riesgo de tener CM aumento en un 60% mayor al de sus poblaciones de origen.⁴

En México la frecuencia de CM más alta se observó en los estados del Norte y Centro cuyo nivel socioeconómico y cultural es más elevado. En los estados de Chiapas y Oaxaca la frecuencia fue la más baja. Estas observaciones sugieren que los factores ambientales, estilo de vida, particularmente la alimentación, el sedentarismo y la obesidad, así como el aumento en el consumo de alcohol y tabaco aunados a dietas saturadas de grasas y azúcar son factores de riesgo comprobados que propician el aumento de casos y, tienen un papel muy importante en la evolución de la enfermedad. En nuestro País en el año 2002 el CM representó 11656 casos y se ha convertido en la primera causa de diagnóstico de carcinoma invasor seguido por el cáncer cervicouterino.⁴ Sin embargo ocupa el segundo lugar de los cánceres en la mujer el cual representa el 17% del total. De este 17% del CM en México, el 47% de las muertes ocurre en mujeres entre 45 y 64 años de edad, lo cual lo convierte en un problema de salud pública de gran relevancia en nuestro País³

1.1.1 Factores de riesgo:

Los factores de riesgo asociados al CM se han agrupado en tres conjuntos determinantes que son:

- a) La historia familiar (herencia)
- b) Factores endocrinos y reproductivos
- c) Factores ambientales donde se incluye el estilo de vida y la dieta.

Y ahora un cuarto grupo denominado.

- d) Virus del Papiloma Humano.^{4, 5, 6,7}

1.1.1.1 Genéticos

La historia familiar positiva supone un considerable aumento del riesgo de 1.5 a 3 veces con respecto al esperado en la población. La susceptibilidad genética; se ha observado en familias con historia de cáncer; Retinoblastoma familiar, Poliposis adenomatosa familiar (gen APC), Síndromes de neoplasia endocrina múltiple, y los síndromes hereditarios de cáncer de mama y ovario. El gen supresor de tumor BCRA1, localizado en el cromosoma 17, se encuentra mutado en algunas familias con inicio temprano de cáncer de mama y ovario.

Otro gen, el BCRA2, se asocia al riesgo aumentado de cáncer de mama en los varones. El CM de tipo hereditario es el que se produce por transmisión autosómica dominante (padres-hijos-nietos) a partir de un tumor maligno en una persona. Se manifiesta en múltiples generaciones y afecta a varios miembros de la familia. Por esto se demuestra desde 1984 que del 4 al 10% de los cánceres de mama tienen alteraciones genéticas. ⁴

1.1.1.2 No genéticos

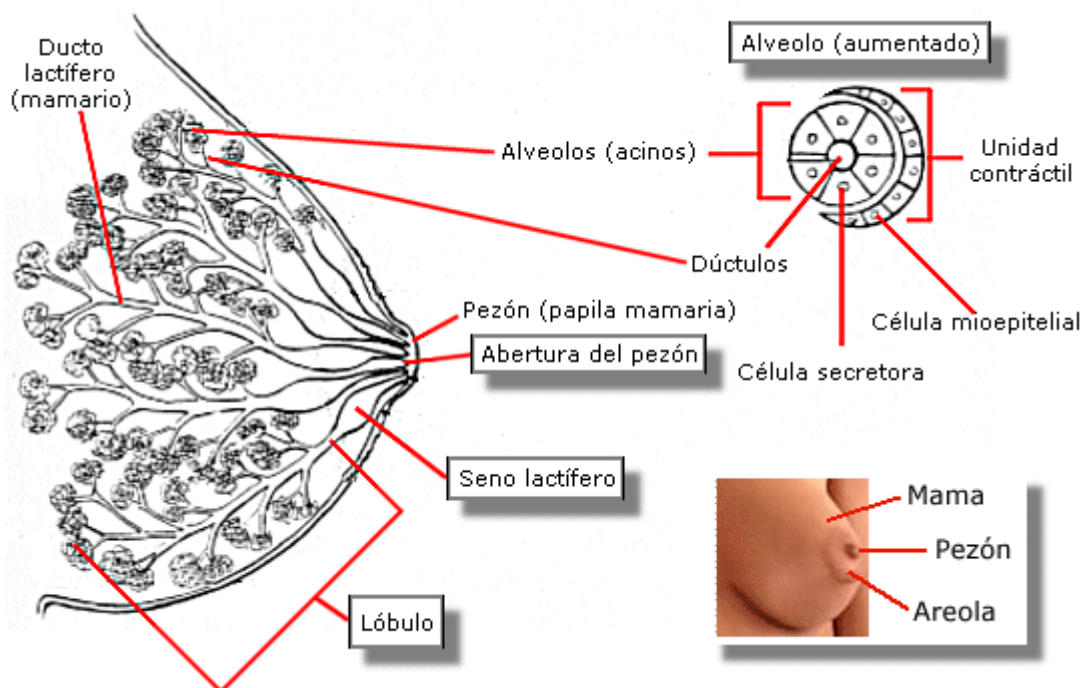
- Menarquia temprana (antes de los 12 años).
- Menopausia tardía (después de los 55 años).
- Nuliparidad (ausencia de embarazo).
- Edad tardía del primer parto (después de los 30 años).
- La obesidad en mujeres posmenopáusicas predispone una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes.
- La terapia hormonal posmenopáusica incrementa ligeramente el riesgo.
- El sedentarismo.
- La exposición precoz a altas dosis de radiaciones ionizantes.
- Los anticonceptivos orales.
- Dietéticos: El consumo de alcohol, el alto consumo de grasa, el menor consumo de folatos, el tabaquismo.
- La exposición a plaguicidas órgano clorados.
- Los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia.
- La distribución de estos factores en relación al nivel socioeconómico podría explicar la mayor incidencia observada en las mujeres de clase social más elevada.
- Determinadas profesiones, profesoras, farmacéuticas, trabajadoras sanitarias, empleadas de la industria química, trabajadoras de telefonía, radio y estilistas muestran también una incidencia mayor, aunque es difícil deslindar la influencia de factores específicamente ocupacionales.¹⁰

1.1 FISILOGIA DE LA MAMA

Glándula mamaria:

La glándula mamaria sufre muchos cambios a lo largo de la vida de la mujer; durante los ciclos menstruales, durante el embarazo y la lactancia, básicamente debidos a los diferentes niveles de hormonas femeninas. Por todo ello y por su principal función, la mama necesita un gran aporte de oxígeno, función que lleva a cabo una importante red de vasos sanguíneos que transportan la sangre necesaria a la glándula. Además de estos vasos, la mama tiene una enorme cantidad de vasos linfáticos, los responsables del transporte de la linfa hacia los ganglios linfáticos. La mama esta formada por lóbulos y lobulillos, ductos, tejido conectivo graso, vasos sanguíneos y vasos linfáticos.

1.2 ANATOMIA



Los lobulillos están formados por diez a cien acinos, cada cual con su conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción, están rodeados de células

mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche.

El sistema de conductos lactíferos que vacía la glándula mamaria es el siguiente: el acino se vacía a través de un conducto terminal, el cual converge con sus congéneres para formar el conducto lobulillar, que recoge la secreción láctea de todos los acinos de un lobulillo. Los conductos lobulillares se reúnen para formar el conducto interlobulillar, que al unirse con otros conductos de éste tipo, forma el conducto lobular o segmentario, de mayor calibre que los anteriores, que se dirige al pezón y antes de llegar a él, bajo la areola mamaria, se dilata formando el seno lactífero, el que se angosta nuevamente al desembocar en el pezón.

1.2 TIPOS HISTOLÓGICOS:

Los conductos están revestidos por epitelio cuboideo o cilíndrico. Por fuera de este epitelio, entre él y la membrana basal, existe una capa de células mioepiteliales muy ramificadas, que envuelven a los conductos y acinos. En los conductos de mayor tamaño el epitelio consta de dos o más capas de células que cerca del orificio externo del pezón se transforman en epitelio plano estratificado. Las capas de las paredes de los conductos galactóforos se dividen en dos: La capa interna está formada por células que varían entre cuboideas y columnares, mientras que la capa externa está constituida por células mioepiteliales. Cada uno de los lóbulos consiste en un sistema de conductos, cada uno con su correspondiente orificio de salida en el pezón. Los lóbulos individuales están unidos a la piel mediante unas bandas colagenosas o ligamentos suspensores de Cooper. Por su parte inferior, los lóbulos se fijan a los fascículos del músculo pectoral. Cada uno de los lóbulos está formado por múltiples ácinos o dúctulos. Cada ácino está tapizado por dos capas de células: una capa interna continua de células epiteliales luminales envuelta por una capa discontinua de células mioepiteliales.⁸

1.2.1 TIPOS HISTOLOGICOS DE CANCER DE MAMA

Aproximadamente el 90% de todos los CM se originan en los conductos o los lóbulos. El 75% comienza en las células cuboides y columnares que recubren internamente los conductos galactoforos, denominado Carcinoma Ductal Infiltrante. El que comienza en los lobulillos se denomina lobular o lobulillar. El carcinoma ductal infiltrante es el más importante por su tipo histológico y distribución, ocurre en el 79-80% de los casos.^{4,5}

El resto de tipos histológicos se describen en la figura 1.

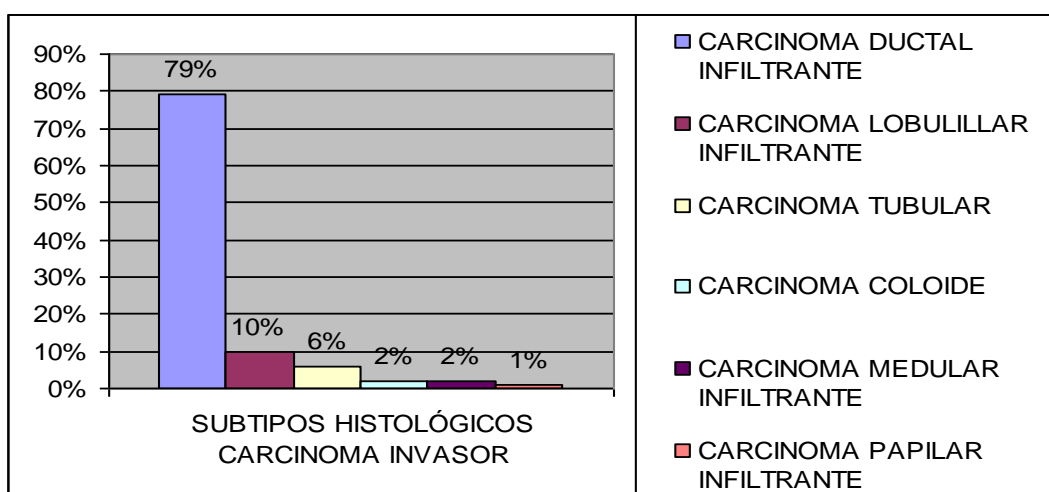


Fig. 1 Frecuencia de los Tipos histológicos de cáncer de mama en México.

**Fuente: SSA 2007
2007**

1.2.2 Desarrollo del cáncer:

El desarrollo del cáncer es una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. El proceso de la división celular depende de una secuencia de eventos muy bien controlados. Estos eventos dependen de los niveles apropiados de la transcripción y traducción de ciertos genes. Cuando este proceso no ocurre como debería de ser, el resultado puede ser el crecimiento descontrolado de la célula. De los más o menos 30,000 genes que se piensan que existen en el genoma humano, hay un grupo pequeño que parece importante para la prevención, desarrollo, y

progresión del cáncer. Se ha encontrado que estos genes están funcionando mal o no funcionan en varios tipos de cánceres.⁸

Los genes que se han identificado hasta hoy han sido ordenados en dos categorías amplias, dependiendo de sus funciones *normales* en las células.

- Genes cuyas proteínas *estimulan* o aumentan la división y la viabilidad de las células. Esta es la primera categoría que incluye los genes que contribuyen al crecimiento de los tumores por medio de la inhibición de la muerte celular.
- Genes cuyos productos (proteínas) pueden *prevenir* directa o indirectamente la división celular o conllevar a la muerte celular.

Los genes en el primer grupo se llaman protooncogenes. Las versiones mutadas o dañadas de estos genes se llaman oncogenes.

Los genes de la segunda categoría son conocidos como los supresores de tumor.^{8,9,10}

Todos los cánceres demuestran alteraciones en uno o más de sus supresores de tumor y oncogenes. En las células normales, estos dos grupos de proteínas trabajan juntas para regular la división celular pero en las células cancerosas los controles ya no funcionan apropiadamente

Los protooncogenes que han sido identificados hasta hoy tienen funciones muy diferentes en la célula. A pesar de las diferencias en sus funciones normales, estos genes contribuyen a la división celular descontrolada si se encuentran presentes en la forma mutante (oncogénica). Las proteínas mutantes pueden retener algunas de sus habilidades anteriores pero ya no tienen la misma sensibilidad hacia los controles que las regulan. Algunos oncogenes que están asociados con varios tipos de cáncer se mencionan a continuación:

- *Ras*: Es una molécula para la transducción de señales.
- *Myc*: Factor de transcripción.
- *Src*: Una tirosina quinasa .
- *hTERT*: Una enzima que funciona en la replicación celular.

- *Bcl-2* : Una proteína para prevenir apoptosis.

HER-2/*neu* (*erbB-2*): un receptor de factores de crecimiento.¹⁰

Los supresores de tumor son genes cuyos productos sirven para controlar la división celular. Ellos difieren de los oncogenes en que los productos que producen los supresores de tumor inhiben la división de las células si las condiciones para su crecimiento no son completados. Las condiciones que activarían los "frenos" de la célula incluyen daños al ADN, falta de factores de crecimiento o defectos en el aparato de la división.

p53 (*TP53*) : Es un factor de transcripción que regula la división celular.

Rb : Controla la disponibilidad de un factor de transcripción.

BRCA : Involucrado en el reparo del ADN.

El gen *p53* (o *TP53*) fue descubierto en 1979 y ha emergido como uno de los genes relacionados al cáncer más importantes hasta la fecha. Este gen, encontrado en la cromosoma 17, produce una proteína que funciona como un factor de transcripción. los genes controlados por *p53* se encuentran involucrados en la división y la viabilidad celular. Como otros supresores de tumor, la proteína *p53* funciona para prevenir el crecimiento celular descontrolado.

La proteína *p53* interactúa directamente con el ADN. Ésta también interactúa con otras proteínas que dirigen las acciones celulares. Cuando el daño al ADN u otros riesgos celulares son detectados, *p53* tiene el poder de causar muerte celular o apoptosis. Las mutaciones que inactivan *p53* pueden ser adquiridas durante la vida del individuo (mutaciones esporádicas) o pueden ser heredadas.^{10, 12}

La proteína *p53* juega un rol íntegro en la célula y esta presente normalmente en todos los tipos de células. La proteína se encuentra en el núcleo donde funciona como un factor de transcripción. La proteína *p53* está al centro de una

gran red de proteínas que controlan la división celular y el ADN celular la proteína p53 ayuda en la decisión entre reparo y la inducción de la muerte celular. La mutación de p53 es uno de los cambios genéticos más frecuentes que se presencia en las células cancerosas. En adición a las mutaciones que surgen durante el crecimiento y el desarrollo de los individuos (las mutaciones esporádicas), existen formas de cánceres asociadas con la herencia de la versión dañada del p53, el síndrome familiar de cáncer Li-Fraumeni, es asociado con una gran variedad de cánceres, además los virus han evolucionado formas de inactivar la proteína p53.

El gen *Rb* en forma heredada, los individuos afectados ya tienen una copia mutada en todas sus células y requieren de una sola mutación en la otra copia para que esa célula en particular ya no posea la proteína Rb funcional. Las mutaciones son eventos raros y la probabilidad de una mutación en cualquier gen en particular es muy pequeña pero la gran cantidad de células en nuestros cuerpos hacen que el daño a la segunda copia del gen sea más probable. Si estas células son capaces de crecer de una manera descontrolada, el cáncer puede desarrollarse. En los casos de la retinoblastoma familiar, es común para los individuos afectados el desarrollar tumores múltiples porque la probabilidad de una segunda mutación es más alta. En la forma esporádica del cáncer, los individuos normalmente tienen dos copias funcionales de gen *Rb* en cada una de sus células y requieren de dos mutaciones separadas en la misma célula para perder la función de Rb. Como resultado, estos individuos normalmente desarrollan sólo un tumor. Los individuos que son afectados por la forma familiar tienen más probabilidad de sufrir recurrencia de tumores.

La función de Rb también influye en la probabilidad del desarrollo de cáncer de mama, Rb normalmente regula el punto de chequeo G1 del ciclo celular, pero los estudios han demostrado que algunos cánceres de mama tienen una irregularidad en este punto de chequeo, implicando que Rb puede ser un factor contribuyente en este tipo de cáncer. Rb ha sido implicado como un contribuidor de varios otros tipos de cánceres, tales como los cánceres pulmonares.

Aunque los genes *BRCA* fueron nombrados tras su asociación con el cáncer de mama, las mutaciones en estos genes también son asociadas con cánceres de los ovarios. Las formas de cáncer de los ovarios hereditaria y espontánea son similares pero un poco diferentes. El cáncer de los ovarios hereditario tiende a tener una histología más seria, desde moderada a mal diferenciada, invasiva, y es usualmente descubierta en una etapa muy avanzada. Así mismo, los individuos con mutaciones *BRCA* tienen una frecuencia más alta de lesiones en las trompas de Falopio. Sea la paciente una cargadora de la mutación o no, tumores de los ovarios benignos o de bajo potencial maligno no son considerados precursores de carcinoma de ovario invasivo.

El cáncer de los senos que se desarrolla por una mutación heredada del gen *BRCA* tiene características diferentes a la forma espontánea, y las diferencias incluyen: Un aumento en la proliferación celular

- Grado histológico más alto
- Mayor número de linfocitos en o alrededor del tumor
- La presencia de una orilla de aspecto suave y no infiltrativo.
- Expresión de los receptores de hormonas reducida
- Mayor frecuencia de mutaciones de p53.

1.2.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano pertenece a la familia "Papillomaviridae". Es un virus de DNA de doble cadena, circular que contiene aproximadamente 8000 pb. Existen más de 100 tipos diferentes, los cuales presentan una estructura básica similar organizada en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), la transcripción (E2), y la transformación celular (E6, E7); los segundos codifican la proteína de la cápside (L1 y L2). Los productos de los oncogenes E6 y E7 son necesarios para la expresión continuada de estos genes participando en la inducción y el mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen secuencias de VPH, a través de la unión e inactivación de genes supresores de tumores que se expresan selectivamente en líneas celulares

derivadas de tumores humanos, y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular. De todos los genes del VPH, el E6 y E7 se han relacionado más con la carcinogénesis, a través de la modificación de la actividad de dos proteínas que regulan la división celular normal, el pRb y la p53.^{5,6,7,8,9}

El gen Rb supresor de tumores que produce los factores de transcripción necesarios para el ciclo celular permite se acumulen proteínas en especial la E2F que es codificada por el Rb y que cuando el VPH infecta una célula, el gen E7 se fija a Rb liberando proteína E2F lo que causa un ciclo de reproducción celular incontrolado, característica que define a una célula maligna, mientras la p53 actúa en respuesta al ADN dañado, y si esta respuesta no es posible se origina apoptosis para que la célula no se reproduzca. El p53 es otro gen que es atacado por el VPH. La proteína E6 viral puede fijarse a p53 e inactivarla, evitando la apoptosis e iniciando la replicación repetida de células con información alterada formando un tumor maligno.^{7,10,11,12}

La proteína E6 viral puede fijarse a p53 e inactivarlo. Lo anterior permite que el virus se apropie de la célula y se reproduzca a si mismo, dado que el gen p53 inhibido por el virus no puede detenerlo o comenzar el proceso de la muerte celular. La replicación repetida de células con información DNA incorrecta es el inicio de la formación de un tumor maligno. A más de bloquear el gen p53 celular, la proteína E6 viral activa a la telomerasa, la activación de esta enzima conserva un ciclo celular repetido que continúa produciendo células virales. Esto deriva en cáncer a medida que las células mutantes siguen reproduciéndose sin control.^{8,9}

Entre otros factores de riesgo del CM se ha relacionado la infección por virus como el Herpes virus, EBV, VPH entre otros. La relación con el Virus del Papiloma humano, ha sido ampliamente cuestionada. Según la probabilidad de transformación celular y de provocar cáncer, los VPH puede clasificarse en tipos virales de alto riesgo 16, 18, 33 o de bajo riesgo 6,11. La sospecha de que el virus puede tener una relación con el cáncer de mama está basada en la identificación de VPH en tumores de mama y en células inmortalizadas de tejido normal de mama para los tipos 16 y 18.^{5, 6, 7, 11}

Los virus pueden inducir cáncer por dos tipos de mecanismos, directos e indirectos. El mecanismo directo básico es la integración total y parcial de un genoma viral en el ADN de una célula, que actuaría como verdaderos “oncogenes” en alguna etapa del proceso oncogénico. El indirecto propone la participación viral en la promoción o estabilización del crecimiento celular en una población previamente transformada o alterada genéticamente.¹¹

Estas asociaciones virales con ciertos tipos de cánceres derivan de diversos estudios en los que han podido demostrar las siguientes relaciones:

- a) El virus de Epstein Barr y el Linfoma de burkitt con el carcinoma nasofaríngeo.
- b) El virus de hepatitis B con el desarrollo de hepatomas.
- c) Infecciones por retrovirus con leucemias de células T etc.
- d) El VPH con el cáncer cervicouterino.

Así las infecciones por estos virus preceden a las neoplasias; si existe una mayor prevalencia de la infección, hay mayor incidencia del cáncer. En las células de tejidos tumorales suele detectarse DNA y/o proteínas o antígenos propios del virus. Estos virus o alguno de sus genes son capaces de transformar células normales en tumorales e inducir el desarrollo de tumores.

^{13, 14, 15}

1.2.4 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS:

Los estudios que relacionan la infección del VPH y el cáncer de mama han sido controversiales, hay autores que apoyan esta teoría y otros que la rechazan. Los diferentes estudios reportados muestran una gran heterogeneidad en los primers utilizados, el material biológico utilizado, los grupos estudiados, etc. Lo cual sigue dando resultados diferentes y controversiales.^{5, 12, 13,14,19,20,21}

a). Los primeros reportes que se tiene son los de Di Lonardo (1992) fue el primero en encontrar una relación entre el VPH y el cáncer de mama. La población de estudio que analizó tenían antecedente de cáncer cervicouterino como tumor primario y, en ellas, demostró que existía DNA del VPH 16 en el 29.4% de los carcinomas de mama usando primers de VPH/E6 en la PCR.⁵

b). Así el siguiente estudio reportado fue el de Hennin (1999) en Noruega usó primers Gp5+ y Gp6+ para VPH-11, 16, 18, 33, y detectó en el 46% de los carcinomas de mama positividad solo para el HPV 16.¹⁶

c). El HPV 16 se reportó por Liu (2001) en USA utilizando primers de E6, E7, y L1 en tejidos fresco y se reportó el 35% de positividad en tejidos de cáncer de mama.²⁰

Todos los estudios reportados utilizaron la técnica de PCR, con primers consenso y específicos para VPH 16, 18.

d). En el año 2002 se realizó un estudio en China en el cual Li demostró en 68.7% de las muestras de cáncer de mama positividad para los genotipos 16 y 18.²¹

e). Los estudios que precedieron a Li fueron realizados en Brasil por Damin (2004), el también reportó en esta población un 24.75% de positividad para los genotipos 16 y 18.¹³

f). Sin embargo, también se encontraron estudios como el de Villiers (2005), en USA ella obtuvo el 86.21% de positividad en tejidos de cáncer de mama con datos histológicos de infección de VPH en diferentes genotipos 6, 11, 27, 57, 66. de este virus.⁵

g). En Australia, Kan (2005) solo identificó en el 48% de los cánceres de mama ductal infiltrante el VPH/18, pero encontró negativas las muestras para los tipos 16, 33.⁶

h). En Taiwán, Tsai (2005) encontró el 12.9% de positividad de VPH 6,16 en tejido fresco de cáncer de mama ductal infiltrante.²²

i). Gumus en Turkia (2006) identificó el 74% de positividad en los tipos 11, 16, 18, 33 y en tejido fresco de cáncer de mama ductal infiltrante.²⁴

j). En Grecia, Kroupis (2006) reportó en tejido congelado de cáncer de mama el 15.89% de positividad en los tipos HPV 16, 58, 59, 73, 82.²²

k). En México, Montoya (2008) demostró la presencia de 4% de HPV 16,18, 31 en tejido de cáncer de mama ductal infiltrante, utilizando primers Cpl/CpII, y consenso en la PCR.²⁸

Sin embargo también existen los estudios que reportan negatividad en sus resultados al no encontrar ninguna relación con el VPH.

l) Así a su vez en los reportes alternativos de Bratthauer (1992) en USA y el de Wrede (1992) en Londres reportan el 0% de positividad utilizando primers consenso en tumores malignos y benignos de mama.¹⁶

Wrede y Golspaskrishha en Inglaterra e India (1992-1996); estudios de Lindel en Suecia (2007) y De cremoux en Francia (2007) en tejidos frescos de cáncer de mama.¹⁷

Nuestro estudio fue realizado utilizando una metodología similar a las reportadas en estos estudios, la cual han sido estandarizada en los diversos proyectos de nuestro laboratorio.

El presente estudio surge en virtud de las controversias encontradas en la literatura analizada y por ello es importante estudiar cual es el comportamiento de esta infección en las mujeres de nuestro país.

2.- JUSTIFICACIÓN:

El cáncer de mama sigue siendo en nuestra población un problema de salud pública, ya que es una enfermedad que involucra un sin número de factores de riesgo. En diferentes países han reportado que la infección por VPH es un factor más en la etiología de esta patología. Sin embargo, en nuestra población se tienen escasos antecedentes de estudios que busquen esta asociación, sin haber demostrado a la fecha que exista esta relación. En el presente estudio se pretendió identificar este virus en tejidos de mama con cáncer ductal infiltrante, debido a que es el tipo histológico más frecuente. Se aseguró que las muestras fueran completamente satisfactorias para su procesado y así poder evidenciar la presencia o ausencia del virus.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

No es concluyente el antecedente de la asociación de la infección del VPH y el cáncer de mama, los estudios reportados han sido estudiados en diferentes tumores de mama, en poblaciones con antecedente de cáncer cervicouterino encontrando que las características de la población analizada son heterogéneas. En México es escaso el antecedente de esta asociación y es por ello que surge el interés del presente trabajo

PREGUNTA CIENTÍFICA:

¿Hay secuencias virales del VPH en una población mexicana con cáncer de mama ductal infiltrante?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

1. Identificar las secuencias del Virus del papiloma humano en tejidos de cáncer de mama ductal infiltrante.

4.2 Objetivos específicos.

1.- Realizar las PCR para la identificación de secuencias virales.

2.-Determinar los genotipos de las muestras que se han positivas a la identificación de secuencias virales.

3. Analizar los antecedentes patológicos de los casos clínicos de la población estudiada.

4.- Realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS:

5.1- Diseño del estudio

Es un estudio descriptivo.

5.2 Características del estudio

Retrospectivo, Observacional, Ambipectivo, Transversal y Homodémico.
ENCUESTA DESCRIPTIVA.

5.3 Población de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el servicio de Patología del Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado de Puebla (ISSSTEP) que abarcó del periodo 2002 -2007 y en el Centro Médico Nacional Siglo XXI en el área de Oncología Genómica. Se procesaron las muestras por el método de PCR en los meses de Mayo a Septiembre de 2008.

5.4. Criterios de selección:

5.4.1 Criterios de inclusión

1.- Bloque de parafina con tejido de cáncer de mama ductal infiltrante que contenga el 80% de células tumorales en su laminilla.

5.4.2 Criterios de no inclusión

1. Bloque de parafina con tejido de cáncer de mama que no se extraiga el ADN.
2. Bloque de parafina con tejido de cáncer de mama de otro tipo histológico

5.4.3 Criterios de eliminación:

Bloque de parafina con DNA cuantificado pero que no amplifique en el control interno.

5.5 Variables de estudio:

5.5.1 Variable dependiente : VPH

Definición conceptual: El virus del papiloma humano es un virus de DNA doble cadena, circular que contiene aprox. 8000 pb, existen más de 100 tipos diferentes, los cuales presentan una estructura básica similar organizada en regiones de expresión temprana (E) y tardía(L). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), la transcripción (E2), y la transformación celular (E6, E7); los segundos codifican la proteína de la cápside (L1 y L2).

Definición operacional: Identificación de las secuencias virales del VPH por PCR.

Categoría: Cualitativa.

Escala: Nominal.

Unidad de medición: Presencia o ausencia

5.5.2 Variable Independiente : Cáncer de mama

Definición conceptual: El Cáncer de mama (CM) es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula mamaria forman un tumor que invade y origina metástasis de órganos vecinos y distantes del organismo. El 75% del CM comienza en las células que recubren internamente los conductos de la leche, denominado Carcinoma Ductal Infiltrante. Y el que comienza en los lobulillos denominado lobular o lobulillar. El carcinoma ductal infiltrante es el más importante por su tipo histológico y distribución apareciendo en el 79-80% de los casos.

Definición operacional: Tejido de cáncer de mama ductal infiltrante se realizará extracción de ADN para identificar si hay secuencias virales del VPH.

Categoría: cualitativa.

Escala de medición: Nominal

Unidad de medición: Presencia o ausencia

5.5.3 Tamaño de la muestra:

Se calculó con el programa estadístico NCSS, en el apartado de PASS para tamaño de muestra. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% para una proporción 0.08 de probabilidad de encontrar positividad en nuestra población, se obtuvo un tamaño de 108 tejidos de cáncer de mama ductal infiltrante. Se presenta hoja del programa donde se obtiene el tamaño de la muestra.

INTERVALO DE CONFIANZA DE UNA PROPORCIÓN NCSS / PASS

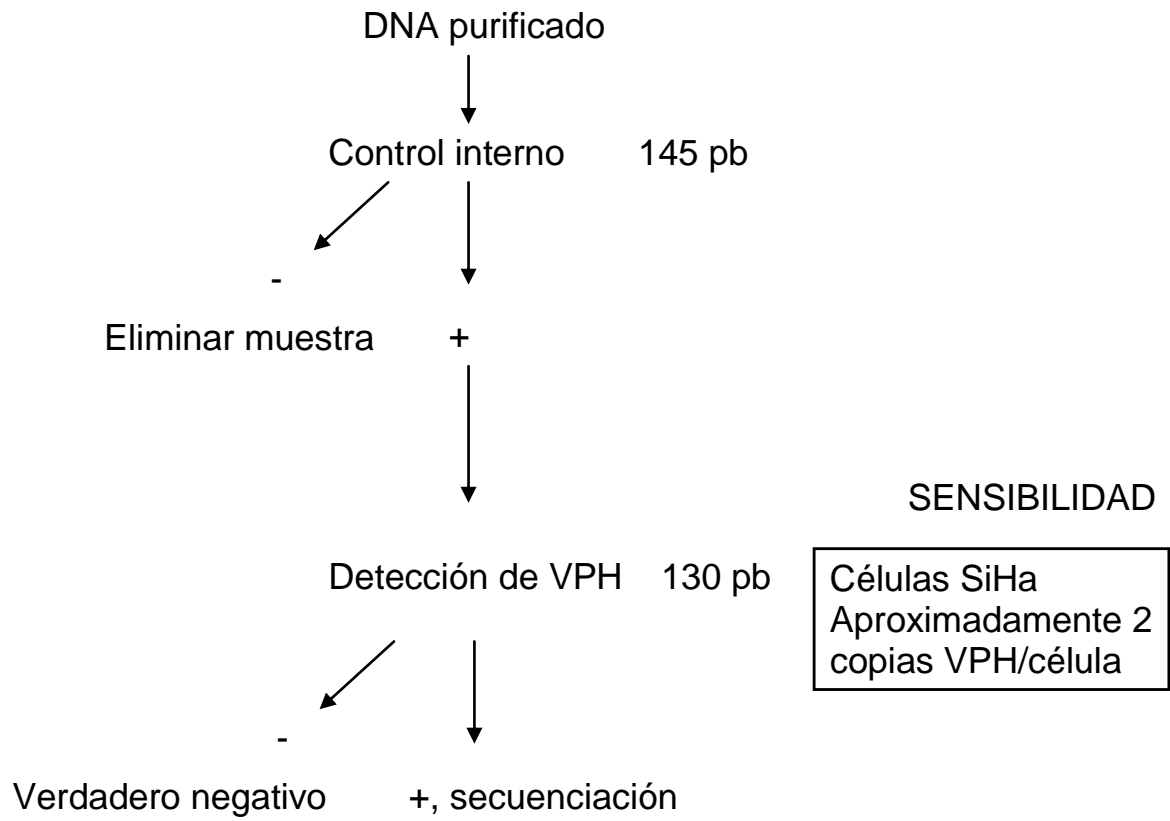
Numeric Results

	C.C.	N	P0
Precision	Confidence Coefficient	Sample Size	Baseline Proportion
0.05000	0.95156	108	0.08000

El tamaño de la muestra es de 108 tejidos en un intervalo de confianza del 95% para una proporción de 0.080.

5.6 Descripción operativa del estudio:

LOGISTICA PARA DETECCION DE SECUENCIAS DE VPH



5.6.1.- Material biológico:

.- Se obtuvieron los bloques de tejidos incluidos en parafina con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama ductal infiltrante en el Departamento de Patología del Hospital ISSSTEP (periodo 2002 -2007). Se realizó la selección del bloque bajo los criterios de inclusión del estudio y con la supervisión del patólogo.

5.6.2.- Se estandarizaron las técnicas: de extracción, purificación y amplificación de ADN en el Centro Médico Nacional SXXI de la siguiente manera:

La cuantificación se realizó en un Nanodrop el cual tiene la capacidad de lectura desde 1 µL de muestra, asegurándonos que nuestras muestras tuvieran una concentración mayor o alrededor de 100 ng/µL para seguir el paso de la PCR.

5.6.3.- Aislamiento y extracción de ADN:

Extracción de ADN a partir de biopsias en parafina: 3 a 6 cortes de una muestra, se desparafinó con 3 series de lavados en Xilol y alcohol, se resuspendió en 0.25 mL de Buffer de Digestión (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 25 mM EDTA [pH 8.0], 0.5% SDS, 20 µg de Proteinasa K) incubando a 60°C durante la noche.), agitando por 3 minutos y en vortex por 30 seg., se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante agregando isopropanol, repitiendo el procedimiento y centrifugación, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se precipitó mediante 2.5 vol, de Etanol absoluto a -20°C, se agitó un minuto. Se incubó -20°C; se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, descartar sobrenadante, secar a 55°C por 15 minutos; se resuspendió en 20 a 40 µL de agua PCR o TE.^{17, 19}

5.6.4.- Amplificación:

En casos positivos se amplificará regiones codificadas en los segmentos L1, de cada muestra de DNA de los tejidos de CMDI, utilizando los primers Gp5/6+ aprox. 144 pb, 50pmol/ul (Gp5 5'TTTGTTACTGTGGTAGATAC'3) y (GP6

5´GAAAAATAACTGTAAATCA´3), 10X PCR (1X), dNTP (10 mM), MgCl₂ (25mM), ADN Taq polymerasa (5U/ul). En termociclador presentó un ciclo inicial de 5 min. a 94°C, 1 ciclos de 1 min. a 94°C- 1 min. a 40 °C- 2 min.35-40 ciclos, 72 °C,1.5 min y finalmente 1 ciclo de 7 min. a 72 °C ^{17,19}

Se amplificaron regiones codificadas en los segmentos E6 (aprox. de 126 pb), de 20 muestras de DNA de los tejido de CMDI, utilizando los primers VPH/E6 12.5pmol/ul (E6F5´CAGGACCCACAGGAGCGACCC´3) (E6R5´TCATATACCTCACGTGCGAG´3) 10X PCR (1X), dNTP (10.0mM), MgCl₂ (25mM), ADN Taq polymerasa (5U/ul). En termociclador presentó un ciclo inicial de 4 min. a 94°C, 1 ciclos de 1 minutos a 94°C- 35 minutos a 63 °C- 2l seg.33 ciclos, 72 °C,1 minutos y finalmente 1 ciclo de 4 minutos a 72 °C ^{17,19,25}

5.6.5.- Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos: los productos de amplificación fueron corridos en gel de agarosa 1%, a 80v y 110mAmp. Se evidencio si existía DNA de VPH. El control de amplificación interno fue un fragmento de la región D-loop/ADN mitocondrial (fragmento de 145 pares de bases). ^{10,30}

5.6.6.-Tipificación de HPV: Para secuenciación de ADN como método para tipificar los genotipos que se obtengan del estudio.

5.7 Análisis estadístico. Los datos fueron analizados con el programa estadístico NCSS. En la estadística descriptiva se utilizaron proporciones para variables cualitativas. Se utilizaron medidas de proporciones y porcentajes, obteniendo la proporción del 0% para la presencia de HPV en los tejidos de cáncer de mama ductal infiltrante en nuestra población ya que todos los resultados son negativos.

6.-RESULTADOS:

Las características de la población de estudio se resume en la tabla 1, utilizando una muestra de 108 bloques de parafina con tejidos de cáncer de mama ductal infiltrante, en una población que oscilaba entre los 30-81 años de edad, todas las mujeres con antecedentes de menarca antes de los 13 años, 95% sin toxicomanías; el 10% con antecedentes de cáncer de mama en la familia, son originarias del Estado de Puebla. Las mujeres provienen de estatus socioeconómico medio, las cuales desempeñan labores de docentes, secretarias, trabajadores de gobierno, y en 15% dedicadas a las labores del hogar particularmente las de mayor edad.

La prevalencia del cáncer de mama se describe en la siguiente tabla.

Año	Casos	Edades	Tipo Histológico
2002	15	32-81 AÑOS	CANCER DUCTAL INFILTANTRE
2003	14	37-72 AÑOS	CANCER DUCTAL INFILTRANTE
2004	15	30-82 AÑOS	CANCER DUCTAL INFILTRNATE
2005	22	45-73 AÑOS	CANCER DUCTAL INFILTRANTE
2006	24	41-77 AÑOS	CANCER DUCTAL INFILTRANTE
2007	18	33-81 AÑOS	CANCER DUCTAL INFILTRANTE
TOTAL	108		

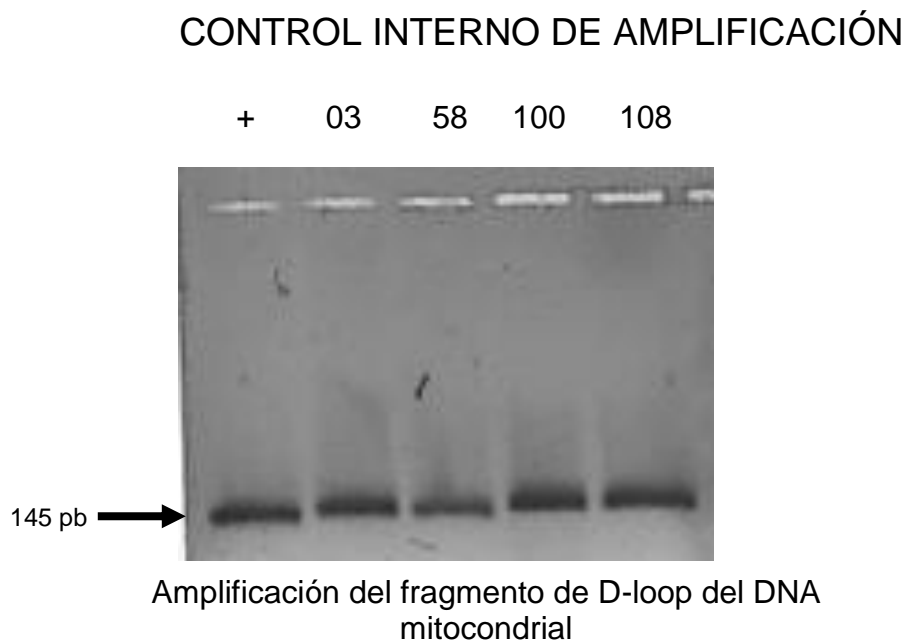
Tabla 1. Prevalencia de casos de cáncer de mama en el Hospital ISSSTEP.

Fuente: Departamento de patología del ISSSTEP.

Los bloques de parafina que se utilizaron reunieron las características mínimas necesarias para su proceso, como la concentración de células tumorales, la extracción del ADN de buena calidad. Los controles internos que se utilizaron (D- loop del DNA mitocondrial y línea celular SiHa) en cada prueba

con el fin de garantizar la factibilidad de la identificación, la reproducibilidad y sensibilidad del método de PCR, fue estandarizada y las muestras fueron validadas para su análisis molecular y aún con estas especificaciones los resultados fueron negativos. La calidad del ADN purificado fue probado mediante la amplificación del ADN mitocondrial. El fragmento utilizado mide aproximadamente 145 pb garantizando que los fragmentos de ADN de los tejidos se tuvieran la seguridad de amplificar ya que miden menos de 150 pb. Asimismo, la sensibilidad del método para amplificar el ADN viral fue de aproximadamente 2 copias de ADN viral/célula...

Fig. 2 Control interno de amplificación



CRITERIO: Si la muestra es positiva para el control interno, entonces pasa a la detección de secuencias del VPH. Toda muestra negativa para el control interno, SE ELIMINO.

Por lo tanto, el DNA purificado es amplificable para fragmentos menores de 150 pb

Fig. 3 Amplificación de secuencia del VPH en muestras de CMDI

Detección de secuencias del VPH en muestras de cáncer de mama

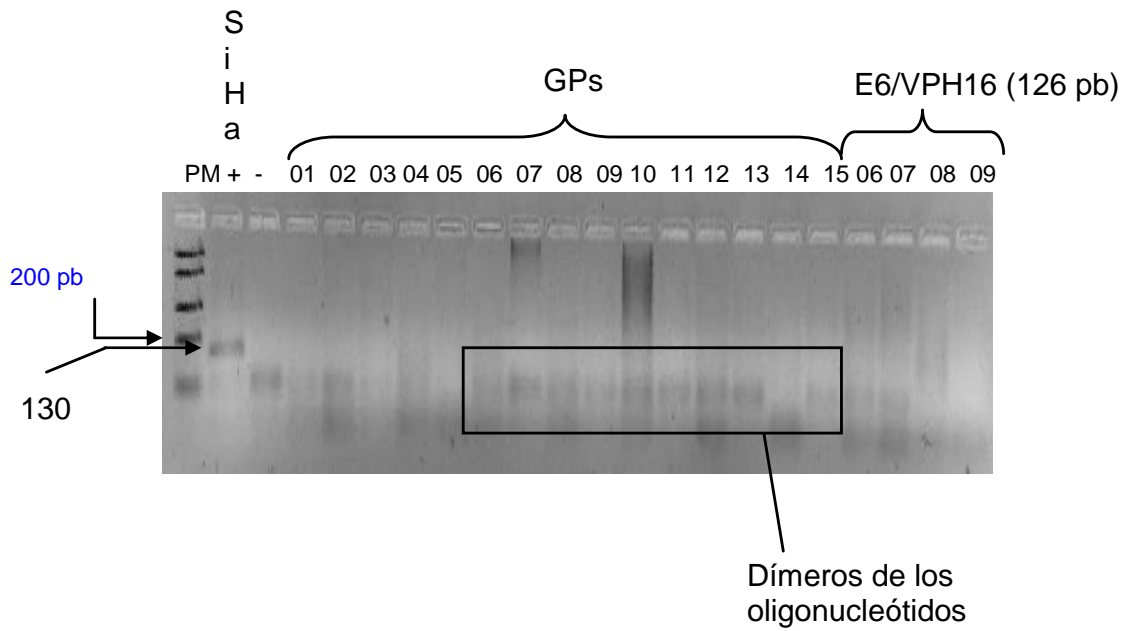


Tabla. 1 Esquema de los 108 bloques de parafina y 0% de VPH

Número de casos	VPH negativos	VPH positivos
108 (100%)	108 (100%)	0 (0%)

Tabla 2. Características de antecedentes patológicos de la población estudiada.

EDADES:	
< 40 AÑOS	18 (100%)
40-50 AÑOS	60 (100%)
51-60 AÑOS	20 (100%)
61-70 AÑOS	7 (100%)
71-85 AÑOS	3 (100%)
ANTECEDENTES DE HISTORIA FAMILIAR DE CANCER DE MAMA	
Con antecedentes	15 (100%)
Sin antecedentes	93 (100%)
TOXICOMANIAS	
Con toxicomanías	9 (100%)
Sin toxicomanías	99 (100%)
ESTADO CIVIL	
Casadas	85 (100%)
Solteras	23 (100%)
LACTANCIA	
No	38 (100%)
Si	70 (100%)
ANTECEDENTES DE CACU	
NO	108 (100%)
SI	0 (100%)

Con las características antes mencionada, la mayor incidencia de los casos de cáncer de mama se encuentra en las edades 40 -50 años, y ocupa el 64.8% de la población del estudio, las toxicomanías no son un factor relevante para nuestra población, y en los casos estudiados no se tuvo ningún antecedente de

cáncer cervicouterino, se homogeneizaron los criterios de selección de toda la población estudiada.

7.-DISCUSIÓN: En el presente estudio se procesaron las muestras tal como se reporta en diversos trabajos y que han sido validados y aprobados en nuestro laboratorio en estudios previos reportados.^{30, 31} La diversidad de tejidos de mama (frescos, bloques, fibroadenomas, carcinoma lobulillar, carcinoma ductal infiltrante, etc.) utilizados en los estudios reportados en la bibliografía internacional crea un alta heterogeneidad en las características de las muestras.^{5,6,7,15,16,21,25,27}

Los resultados que se reportaron en los estudios de Di Lonardo, (Italia), Henin (Noruega), Yu (China), Liu(USA), Damin (Canadá), Villiers (USA),^{5,6,13,20,22,24,28} entre otros muestran resultados positivos en la detección del VPH desde un 24-86%, pero aún con estos reportes sigue siendo desconocido que más factores intervienen en los mecanismos de carcinogénesis de esta enfermedad y en consecuencia esta la contra parte de investigadores como Bratthauer (USA), Wrede (Inglaterra), Golspaskrishha (India), Lindel (Suecia), De cremoux (Francia) donde la relación del VPH y el cáncer de mama se reporta negativa.^{14,16,17}

Nuestros resultados son similares a los reportados en literatura internacional al no encontrar ninguna asociación de esta infección y el cáncer^{14,16,17} de mama, algunas de las discrepancias analíticas podrían mencionarse en la realización de los “primers” y la sensibilidad de la PCR, en nuestro caso el control interno utilizado mostró en cada momento que se amplificó el ADN con la calidad requerida por nuestro estudio, utilizando un primer de aprox. 145 pb, garantizando en todo momento que con la sensibilidad del método utilizado de 2 copias VPH/célula de existir las secuencias virales se hubieran detectado. Las características de tipo histológico del tejido fueron homogéneas, además se consideraron los bloques que contuvieran más del 80% de células tumorales, y tener la máxima posibilidad de detección de los virus, se tuvo la precaución de evitar contaminación y se probó la validez de nuestro método con el control positivo de células SiHa, amplificando en todo momento el control.

8.-CONCLUSIÓN: Los resultados muestran que la población mestiza mexicana estudiada afectada por CMDI no tiene evidencia de infección viral. Aunque la relación de VPH y cáncer de mama es aún controversial, no se descartaría la presencia de estos virus en otras entidades patológicas de la mama por ejemplo las lesiones condilomatosas. Debido a que en nuestro país es muy alta la incidencia de cáncer cervicouterino y la relación con el HPV, se observa que es extremadamente baja o negativa la relación entre el HPV y el cáncer de mama a diferencia con algunos países Europeos o EEUU., sin embargo se sugiere realizar estudios con un mayor numero de muestra en la piel, pezón y areola de la mama.

9. -BIBLIOGRAFIA.

1. DeBruin LS, Josephy PD. **Perspectives on the chemical etiology of breast cancer.** Environ Health Perspect 2002; 110 Suppl 1: 119-28.
- 2.- Rodríguez S., Capurso Marino, **Epidemiología del cáncer de mama.** Ginecol obstet Mex,2006 74; 585 – 93
- 3.-Rodríguez-Cuevas S, Guisa-Hohenstein F, Labastida-Almendaro S. **First Breast Cancer Mammography Screening Program in Mexico: Initial Results** 2005-2006. Breast J. 2009 Aug
3. -Charpenter A, Aldaz M. **The molecular basis of breast carcinogenesis.** En: Tsongalis GJ, editor. The molecular basis of human cancer. Totowa, NJ: Humana Press; 2002. p. 347-363.
4. -Secretaría de Salud. **Compendio de cáncer.** Registro histopatológico de neoplasias malignas 2002.
- 5.- Villier,EM, Sandstrom RE, Hausen HZ,. **Presencia of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamallie and invasive carcinoma of the breast.,** Breast Cancer Res 2005 7R1-R11, 2004.
- 6.- Kan C-Y, Lacoppeta BJ, Lawson JS, **Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer.,** British Journal of Cancer, 946-948, 2005
- 7.- HusnjakK, Gorce Magdalena, **Comparasion of five different chain methodos for detection of human papilloma virus in cervical specimen.** Journal of virological methods,88,2000: 125,134.
- 8.-San Miguel A. González BI, García IR,. **Factores pronósticos del Cáncer de mama y encogen Her-2/Neu.,** Rev. Electrón J Biomed 2006; 72-88.

- 9.- Woods K., Dziubinski ML., Ammerman Cheryl. **Cooperative interactions of Her-2/Neu and HPV-16 oncoproteins in the malignant transformation of Human Mammary epithelial cells.** Neoplasias vol. 7 pp 788-798, 2005.
- 10.-Lawson JS., Gunzburg WH, Whitaker NJ. **Viruses and human breast cancer.**, Future Microbiol, 2006, 1:33-55.
- 11.- Herrera T-E, Negrete E-K, Téllez B-E. **Frecuencia del receptor Her-2/neu en el cáncer de mama en el ISSSTEP,** 2007.
- 12.- Katleen M., Woods I, Lapointe Allison. **erbB-2 overexpression in human mamma de epiteil cells confers growth factor independence.** Endocrinology, 2007
- 13.- Damin AO, **Evidence for an association of human papilloma virus y breast carcinomas,** Breast Cancer Res Treat 2004, 2: 131-7.
- 14.- Lindel K, Forster A, Altermtt HJ, **Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of a viral etiology in a group de Swiss women.** Breast, 2007 2; 172-177.
- 15.- Manavi M, Baghestanian M, Kucera E. **Papilloma virus and c-erbB-2 expresion in diseases of the mammary nipple.** Anticancer Res, 2001 797-801.
- 16.- Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair a. **Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history.** J. Clin Virol, 2004 292-7.
- 17.- Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Pichi B, Giannarelli D, Rahimi SS, Vigili MG, Venuti A. **Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours.** Oncol Rep. 2007 Apr;17(4):931-9.

18. - Coughlin SS, Ekwueme DU. **Breast cancer as a global health concern.** Cancer Epidemiol. 2009 Nov 5.
- 19.- Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Al Moustafa AE (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: 404–407
- 20.- Choi YL, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, Yang JH, Kim DS (2007) **Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women.** Tumour Biol 28: 327–332
- 21.- Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, Basaran G, Kaya H, Barisik N, Turhal NS (2006) **HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples.** J Exp Clin Cancer Res 25: 515 –521
22. Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM (1999). **Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III).** Breast Cancer Res Treat 53: 121–135
23. Khan NA, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, Higashi M, Sagara Y, Yoshinaka H, Tsuji T, Natsugoe S, Douchi T, Eizuru Y, Akiba S (2008) **Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan.** Br J Cancer 99: 408–414
24. Kroupis C, Markou A, Vourlidis N, Dionyssiou-Asteriou A, Lianidou ES (2006) **Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics.** Clin Biochem 39: 727–731

25. Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, Henry-Tillman R, Hermonat PL (2001) **Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers.** J Hum Virol 4: 329–334
26. Lonardo DA, Venuti A, Marcante ML (1992) **Human papillomavirus in breast cancer.** Breast Cancer Res Treat 21: 95–100
27. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H (2009) **Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue.** Breast Cancer Res Treat 114: 189–194
28. Heng B, Glenn WK, Ye Y, B Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, Whitaker NJ, Lawson JS. **Human papilloma virus is associated with breast cancer.** British Journal of Cancer (2009) 101, 1345 – 1350) with unclear conclusions.
28. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. **The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 39 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR.** J Gen Virol 1995, 76:1057–1062
29. Terris M, Peehl DM. **Human Papillomavirus detection by Polymerase Chain Reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized.** Urol 1997, 50:150-156.)
30. Obiso R. Lorincz A. **Digene Corporation. Digene Co.;** Pharmacogenomics. 2004 Jan;5(1):129-32.
31. Talmage DA, Freund R, Dubensky T, Salcedo M, Gariglio Rangel LM, Dawe CJ Benjamin TL, **Heterogeneity in state and expression of**

viral DNA in polyoma virus-induced tumors of the mouse.

Virology.1992 Apr;187(2):734-47.

32. Benjamin TL. **Polyoma virus: old findings and new challenges.**

Virology. 2001 Oct 25;289(2):167-73.

33.- Cardiff RD, Kenney N. **Mouse mammary tumor biology: a short history.**Adv Cancer Res. 2007;98:53-116.

34.- Amarante MK, Watanabe MA **The possible involvement of virus in breast cancer.** J Cancer Res Clin Oncol 2009 Mar;135(3):329-37.

35.- Montoya-Fuentes, **Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue;** Breast cancer Res Treat 2008.

36.-Desu, M. M. and Raghavarao, D. 1990. **Sample Size Methodology.** Academic Press. New York.

Machin, D., Campbell, M., Fayers, P., and Pinol, A. 1997. **Sample Size Tables for Clinical Studies,** 2nd Edition. Blackwell Science. Malden, MA.

Hahn, G. J. and Meeker, W.Q. 1991. **Statistical Intervals.** John Wiley & Sons. New York.

10.-ANEXOS:

PROTOCOLO DE CANCER DUCTAL INFILTRANTE Y VPH

DESPARAFINACION:

- 1) REALIZAR CORTES DE 10-20 micras del bloque de parafina con CM
- 2) Agregar a un tubo ependdort de 2.0 ml junto con 1.5 ml de xilol y poner a incubación a 60°C durante 1hr mezclarlo, centrifugarlo y hacer cambio de xilol nuevamente 1.5 ml, a la siguiente hora observar si se ha eliminado por completo la parafina se vera transparente el xilol, si no es así dejarlo en incubación el tiempo necesario hasta ver el tejido libre de parafina.
- 3) Realizar de 2 a 3 lavados y centrifugados con alcohol absoluto para eliminar el resto del xilol, se logra hasta que no se percibe el olor del xilol.
- 4) Poner a secar el tejido hasta que se ve libre de solución tomando color blanquecino y seco.

DIGESTION:

- 1) Agregar 250 uL de reactivo de lisis + 50uL de EDTA A PH 8.0
- 2) Dejarlo 5 min a 80°C y en seguida bajar la temperatura a 55°C y agregar
- 3) 20uL de proteinasa K dejar incubar 24-48 hrs a 55°C hasta ver totalmente disuelto el tejido y quedarnos solo liquido en nuestro tubo problema.

EXTRACCION

- 4) Agregar 250 uL de reactivo de buffer de lisis y realizar un vortex de 30 seg
- 5) Dejar incubar 5 min y agregar 650 uL de sol. De soln de lavado y pasar a la microcolumna centrifugar 3 min a 13000 rpm y realizar esto mismo por 4 lavados y desechar en cada centrifugado la sol. De lavado, al final en la microcolumna se agrega 60 uL de agua libre de nucelas y se lee la concentración deL ACIDO NUCLEICO EN EL NANODRO.

6) Se cuantifica la concentración del ADN obtenido.

PCR CON VOL FINAL 50 UL PARA GPS

PCR PARA GPS VOL. FINAL 50 uL

			Final	Condiciones de ciclado	
Buffer	10X	5uL	1X	94°C	5 Minutos
MgCl ₂	25mM	7uL	3.5 mM	94°C	60 Segundos
dNTps	10mM	1uL	0.2 mM	40°C	2 Minutos 35-40 ciclos
Gp5	50pmol	0.5 uL	0.25 uL	72°C	90 Segundos
Gp6	50pmol	0.5 uL	0.25 uL	72°C	7 Minutos
Taq	5U/uL		0..25 uL	1.25	4 °C

PCR PARA E6 HPV16 Terris VOL. FINAL 50 uL

			Final	Condiciones de ciclado	
Buffer	10X	5uL	1X	94°C	5 Minutos
MgCl ₂	25mM	3uL	1.5 mM	94°C	30 Segundos
dNTps	10mM	1uL	0.2 mM	55°C	60 Segundos 35-40 ciclos
E6 +	50pmol	0.5 uL	0.25 uL	72°C	60 Segundos
E6 -	50pmol	0.5 uL	0.25 uL	72°C	7 Minutos
Taq	5U/uL		0..25 uL	1.25	4 °C

PCR PARA DNA Mitocondrial				VOL. FINAL 50 uL	Condiciones de ciclado		
			Final				
Buffer	10X	5uL	1X	94°C	5 Minutos		
MgCl ₂	25mM	3uL	1.5 mM	94°C	30 Segundos		
dNTps ciclos	10mM	1uL	0.2 mM	55°C	60 Segundos	35-40	
R3+	50pmol	0.5 uL	0.25 uL	72°C	60 Segundos		
F3 -	50pmol	0.5 uL	0.25 uL	72°C	7 Minutos		