



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Departamento de Biología Celular



PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y DE VIRUS EPSTEIN-BARR (VEB) EN BIOPSIAS FRESCAS DE CÁNCER DE MAMA COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ESTA PATOLOGÍA.

Trabajo especial de grado

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Marla E. Ladera G. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor:

Lic. Andreína Fernandes

Asesor Académico:

Prof. Guillermina Alonso

Caracas, Octubre 2015

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
FINANCIAMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de mama	2
1.2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de mama	7
1.3. Virus de papiloma humano (VPH)	11
1.4. Virus Epstein-Barr (VEB)	19
2. ANTECEDENTES	27
2.1. Agentes virales y el desarrollo de cáncer	27
2.2. VPH y cáncer de mama	29
2.3. VPH y cáncer de mama en América Latina	32
2.4. VPH y cáncer de mama en Venezuela	33
2.5. VEB y cáncer de mama	34
2.6. VPH y VEB asociados al cáncer de mama	37
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo general	40
4.2 Objetivos específicos	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Población en estudio	41
5.2 Muestra	41
5.3 Descripción del material biológico	41
5.4 Reactivos	42

5.5 Criterios de selección	42
5.6 Plan de trabajo	43
5.7 Extracción del material genético	44
5.8 Evaluación de la calidad del ADN	45
5.9 Detección y tipificación del genoma de VPH	47
5.10 Detección del genoma de VEB	49
5.11 Electroforesis en geles de agarosa	50
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
7. RESULTADOS	53
7.1 Descripción general	53
7.1.1 Población de estudio	53
7.2. Procesamiento de las muestras	57
7.2.1. Evaluación de la calidad del ADN	57
7.2.2. Detección y tipificación de VPH en las pacientes de los grupos de estudio	58
7.2.3. Detección de VEB en las pacientes de los grupos de estudio	65
7.2.4. Coinfección viral en las pacientes de los grupos de estudio	69
7.2.5. Distribución geográfica de las pacientes con cáncer de mama evaluadas	70
8. DISCUSIÓN	74
9. CONCLUSIONES	102
10. ANEXOS	104
1. Aval del comité de bioética del Hospital Universitario de Caracas.	104
2. Consentimiento bajo información para la participación en el protocolo de investigación.	105
3. Protocolo de bioseguridad humana y ambiental.	111
4. Instrumento de recolección de datos clínicos.	118
11. BIBLIOGRAFÍA	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista horizontal de la mama y la pared torácica asociada.	3
Figura 2. Modelo tridimensional del Virus Papiloma Humano.	11
Figura 3. Representación esquemática del genoma del Virus de Papiloma Humano.	12
Figura 4. Esquema de la replicación del Virus de Papiloma Humano a nivel del epitelio escamoso estratificado.	16
Figura 5. Representación del proceso de ubiquitinación de p53 por efecto de la proteína viral E6.	18
Figura 6. Representación esquemática de un Herpesvirus.	19
Figura 7. Representación esquemática de la estructura del genoma de VEB.	21
Figura 8. Infección y ciclo de vida de VEB en células epiteliales y linfocitos B.	22
Figura 9. Mecanismos de infección de VEB.	25
Figura 10. Esquema del plan de trabajo del proyecto.	43
Figura 11. Distribución de las muestras seleccionadas, según el estadio tumoral.	56
Figura 12. Distribución de las muestras seleccionadas, según el diagnóstico histopatológico.	56
Figura 13. Distribución de las pacientes de acuerdo la expresión de los receptores moleculares.	57
Figura 14. Registro fotográfico del gel de agarosa teñido con SYBER-SAFE para la visualización de la calidad del ADN extraído de todas las muestras.	58
Figura 15. Gráfico de barra donde se representa la frecuencia de infección de VPH detectada en los dos grupos de estudio.	59
Figura 16. Gráfico de barras donde se representa los datos clínicos de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VPH. ACO: consumo de anticonceptivos orales.	60

Figura 17. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, según el tamaño del tumor.	60
Figura 18. Frecuencia de VPH en los tumores mamarios, según los estadios de cáncer de mama.	61
Figura 19. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, según el subtipo molecular.	62
Figura 20. Tiras de nitrocelulosa para la genotipificación de VPH mediante 28 sondas específicas.	63
Figura 21. Frecuencia de los genotipos de VPH en las biopsias tumorales de las pacientes con carcinoma mamario.	64
Figura 22. Frecuencia de infección de genotipos de alto y bajo riesgo encontrada en ambos grupos de estudio.	65
Figura 23. Detección del virus Epstein-Barr mediante PCR.	66
Figura 24. Gráfico de barra donde se representa la frecuencia de infección de VEB detectada en los dos grupos de estudio.	66
Figura 25. Gráfico de barras donde se representa los datos clínicos de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VEB.	67
Figura 26. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VEB, según el tamaño del tumor.	68
Figura 27. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VEB, según el estadio tumoral.	68
Figura 28. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, según el subtipo molecular.	69
Figura 29. Distribución de las pacientes con cáncer de mama por regiones geográficas.	70
Figura 30. Distribución de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VPH, según regiones geográficas.	71
Figura 31. Distribución de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VEB, según regiones geográficas.	72
Figura 32. Distribución de los genotipos de VPH más frecuente por región geográfica.	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agrupación TNM, según el Instituto Nacional de Cancerología.	5
Tabla 2. Definiciones de los subtipos moleculares de cáncer de mama.	9
Tabla 3. Tipos de VPH, según el riesgo de desarrollar cáncer.	14
Tabla 4. Secuencias de iniciadores para la realización del protocolo de calidad de ADN, BIOMED-2.	46
Tabla 5. Condiciones de la mezcla para el protocolo BIOMED-2.	46
Tabla 6. Condiciones de la reacción para el protocolo BIOMED-2.	46
Tabla 7. Secuencias de iniciadores para la realización de la SPF10 PCR.	48
Tabla 8. Condiciones de la mezcla para la reacción de amplificación, con el estuche INNO-Lipa HPV Genotyping Extra Amp, Innogenetics.	48
Tabla 9. Condiciones de la reacción de amplificación, con el INNO-Lipa HPV Genotyping Extra Amp, Innogenetics.	48
Tabla 10. Iniciadores usados para la amplificación del ADN de VEB.	50
Tabla 11. Condiciones de la mezcla de la PCR, para detectar VEB.	50
Tabla 12. Condiciones de la reacción, para la detección de VEB.	50
Tabla 13. Condiciones para preparar geles de agarosa 2% para la visualización de las moléculas de ADN de los productos de PCR.	51
Tabla 14. Total de muestras recolectadas durante el periodo de abril 2014 a mayo 2015, divididas según grupos de estudio.	54
Tabla 15. Resumen de datos demográficos, tanto en pacientes con carcinoma mamario (grupo 1), como de pacientes con patología benigna (grupo 2).	55

ABREVIATURAS

ACO: Anticonceptivos orales

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BCR: Receptor de Células B

CDIS: Carcinoma Ductal in situ

CIS: Carcinoma in situ

CISH: Hibridación in situ cromogénica

CMV: Citomegalovirus

CRPV: Virus de Papiloma de Conejo cola de algodón

E: Expresión Temprana

EBER: ARN codificados por VEB

EBNA: Antígenos nucleares de VEB

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

FISH: Hibridación in situ fluorescente

HER2: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2

HHV: Herpesvirus Humano

HUC: Hospital Universitario de Caracas

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IHQ: Inmunohistoquímica

IOH: Instituto de Oncología y Hematología

IR: Secuencias Internas Repetitivas

L: Expresión Tardía

LCR: Región Larga de Control

LIEAg: Lesión Intraepitelial de Alto Grado

LIEBg: Lesión Intraepitelial de Bajo Grado

LMP: Proteína Latente de Membrana

MMTV: Virus del Tumor Mamario en Ratones

MPPS: Ministerio del Poder Popular para la Salud

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RE: Receptor de Estrógenos

RP: Receptor de Progesterona

RSV: Virus del Sarcoma de Rous

TN: Triple negativo

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TR: Secuencias Terminales Repetitivas

TRAF2: Factor asociado al Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

U: Dominio de Secuencias Únicas

UPM: Unidad de Patología Mamaria

VCA: Antígeno de Cápside Viral

VEB: Virus Epstein-Barr

VHB: Virus de Hepatitis B

VHC: Virus de Hepatitis C

VHS: Virus de Herpes Simple

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VPH: Virus de Papiloma Humano

VPH-AR: VPH de alto riesgo

VPH-BR: VPH de bajo riesgo

VVZ: Virus de Varicela Zóster

FINANCIAMIENTO

El laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología cuenta con la infraestructura física, equipos, reactivos y suministros para la realización de este proyecto de tesis.

Este trabajo fue financiado por los proyectos de investigación PEII n° 2012001201 y FONACIT G2005000408.

DEDICATORIA

A la Santísima trinidad por guiarme e iluminarme a lo largo de mi carrera y de la realización de este trabajo.

A mi familia por apoyarme en todo momento y creer en mí y acceder a la realización de cada una de mis actividades.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por llenarme de luz cada día. A la Universidad Central de Venezuela por haberme recibido sus invaluable estructuras.

A mis padres por confiar, ser pacientes y por ese amor inconfundible que siempre les voy agradecer.

A mis tres hermanos que desde siempre me han brindado su apoyo físico y emocional, y más aún en cada uno de los días de mi carrera, así como también gracias por sus palabras y por cada una de sus singulares personalidades que alegran mis días, y a ese sobrino hermoso que siempre nos hace sonreír.

A cada una de las Licenciadas del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología, por haberme compartido sus experiencias tanto profesionales como personales y haberme apoyado en la realización de este trabajo. En especial quiero agradecer a mi tutora Lic. Andreina Fernandes por haber aceptado mi tutoría y por su responsabilidad y entusiasmo para con mi enseñanza y la realización de este trabajo, gracias por tu paciencia.

A cada uno de los excelentes Profesores de la Escuela de Biología que además de impartir sus conocimientos de la forma adecuada y amena, me apoyaron además durante mi carrera, en especial quiero agradecerle a la Profesora Guillermina Alonso por guiarme y darme sus consejos.

A los jurados por haber ocupado un espacio de su tiempo para evaluar mi trabajo y aportar sus conocimientos.

Al Lic. Simón Navarro por la realización de la estadística, a los médicos del Servicio de Ginecología, Unidad de patología mamaria (UPM); del Hospital Universitario de Caracas (HUC). Un profundo agradecimiento a las pacientes que participaron en este estudio y a cada una de las personas que directa o indirectamente aportaron sus conocimientos, tiempo y recursos disponibles para la culminación de este trabajo.

RESUMEN

El cáncer de mama es la patología oncológica más frecuente en mujeres a nivel mundial. En Venezuela representa la primera causa de muerte oncológica en la población femenina. Siendo esta enfermedad de origen multifactorial, actualmente se han reportado muchos factores de riesgo que favorecen su desarrollo, en los cuales se incluyen factores hormonales, ambientales, físicos y genéticos, sin embargo, en la mayoría de los casos de pacientes con carcinoma mamario no es posible identificar alguno en particular. Otros factores de riesgo asociados a esta patología han sido un grupo de agentes virales con potencial oncogénico asociados a distintos tipos de cáncer, destacando el Virus Papiloma Humano (VPH) y el Virus Epstein-Barr (VEB) como posibles factores de riesgo en el desarrollo de esta malignidad. Por ello, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia del genoma de VPH y de VEB en biopsias de cáncer de mama, para establecer una posible relación entre la infección por estos agentes virales y el desarrollo de esta patología, así como también correlacionar la presencia de los agentes virales con los datos demográficos de las pacientes Venezolanas en estudio. Para ello, se recolectaron 22 biopsias frescas de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario y 22 biopsias de pacientes con diagnóstico de patología benigna que asistieron a cirugía en el Servicio de Ginecología, del Hospital Universitario de Caracas. Se detectó la presencia del genoma de VPH y se realizó el genotipaje viral mediante el estuche comercial INNOLIPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics) y la detección del genoma de VEB se realizó mediante una PCR convencional. El 63,6% y 13,6% de los casos de cáncer de mama fueron positivos para el ADN de VPH y VEB, respectivamente, mientras que las muestras de patología benigna presentaron 4,5% de positividad para cada uno de los virus. El porcentaje de coinfección viral en las muestras de cáncer fue de 13,6%. El genotipo de alto riesgo oncogénico de VPH más frecuente fue el tipo 16, con 21,21%. La región Capital fue la que presentó mayor frecuencia de infección por VPH y VEB, con 43% y 66,7%, respectivamente. Con base en los resultados encontrados, podemos decir que los agentes virales oncogénicos estudiados están asociados con algunos parámetros del cáncer de mama, sin embargo, son necesarios estudios que permitan dilucidar mejor el papel viral en el desarrollo de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, en sus diferentes localizaciones, es un importante problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año hay aproximadamente 14,1 millones de casos nuevos de cáncer. En el 2012, de las 55 millones de muertes registradas a nivel mundial 8,2 millones se debieron al cáncer (OMS, 2014). En Venezuela, según el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2014), para el año 2012, se registraron 22.815 casos de muertes por cáncer, representando la segunda causa de muerte en la población venezolana, con un porcentaje de 15,4% del total de la mortalidad registrada.

El cáncer es un proceso descontrolado de crecimiento y diseminación en las células normales, que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo (OMS, 2014), por tanto el tipo de cáncer va a depender del tipo de célula que crece anormalmente y en qué parte del cuerpo ocurre dicho crecimiento. La pérdida generalizada del control de crecimiento presentado en células cancerígenas es el resultado neto de anomalías acumuladas en múltiples sistemas de control celular y es reflejada en muchos aspectos en el comportamiento celular. Algunos de los procesos fisiológicos críticos, de los cuales pierden el control las células cancerígenas son: auto-suficiencia proliferativa, evasión de apoptosis, angiogénesis, mecanismos de diferenciación, entre otros (Hanahan y Weinberg, 2000). En consecuencia, como el cáncer puede resultar de la proliferación anormal de cualquier tipo de célula en el cuerpo, existen más de cien tipos distintos de cáncer, siendo los más comunes: el cáncer de piel, de pulmón, de mama, de próstata, entre otros (Cooper, 2000; AAFP, 2002).

Debido a que el desarrollo de malignidad es un proceso complejo de múltiples pasos, muchos factores pueden afectar las probabilidades de que el cáncer avance, lo que conlleva a que su proliferación esté dictada por la interacción de los genes del organismo con todos aquellos agentes, intrínsecos o extrínsecos, capaces de modificar, directa o indirectamente, el genoma del individuo. Así que sería demasiado simplista hablar de causas individuales en la mayoría de los cánceres, tal es el caso del cáncer de mama, ya que su etiología sigue siendo desconocida, y está influenciada por distintos factores (Cooper, 2000; de Villiers y col., 2005).

1.1. Cáncer de mama

La mama está situada dentro de la fascia superficial (tejido conectivo) de la pared torácica anterior, ubicándose sobre la fascia profunda que recubre los músculos pectorales mayor, extendiéndose verticalmente desde la segunda a la sexta costilla inclusive, y horizontalmente desde el esternón a la línea axilar media. La mayor parte de la masa de la mama está constituida por tejido glandular y adiposo. La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: 1) glandular, de tipo túbulo-alveolar, 2) conjuntivo, que conecta los lóbulos y 3) adiposo, que ocupa los espacios interlobulares. Además un conjunto de 15 a 20 lóbulos mamarios conforman la glándula mamaria, subdivididos en numerosos lobulillos que irradian la mama unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor (Figura 1). Cada lóbulo termina en un conducto galactóforo que se abre a través de un orificio estrecho en el pezón. Debajo de la aréola cada conducto posee una porción dilatada

denominada seno galactóforo. El revestimiento epitelial del conducto muestra una transición gradual hasta que se convierte en dos capas de células cúbicas en el seno galactóforo y luego se transforma en una capa de células cilíndricas o cúbicas en el resto del sistema ductal. Bajo el microscopio las células epiteliales se observan adheridas a una capa subyacente denominada membrana basal. La integridad de esta capa de sostén es importante en la evaluación de las muestras de biopsias ya que los cambios presentes tiene implicaciones en la transformación, diferenciación y metástasis (Bland, 2007).

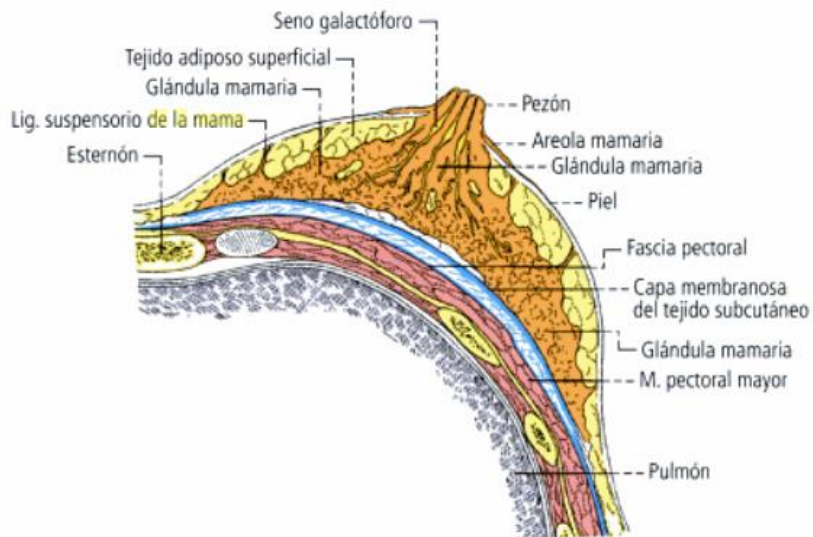


Figura 1. Vista horizontal de la mama y la pared torácica asociada. Tomado de: Ruiz y Latajert, 2008.

El cáncer de mama no es una enfermedad única, sino que representa un amplio espectro de enfermedades que incluyen diversos subtipos morfológicos y moleculares diferentes. Estos subtipos están asociados con características histológicas específicas y diferentes resultados clínicos. Las señales moleculares de estos tipos de cáncer no

solo reflejan las distintas características biológicas de estas neoplasias malignas, sino que también predice el comportamiento clínico y la respuesta a quimioterapias, con ciertos subtipos se tiene mejores resultados que otros (Sandhu y col., 2010)

Los tumores mamarios se pueden clasificar de acuerdo a su comportamiento en: tumores benignos, tumores malignos, *in situ*, invasivos o de comportamiento desconocido. Entre los tumores benignos se encuentran: los de origen no epitelial como lipomas, fibromas, angiomas, neurofibromas, y los de origen epitelial o mixto, como adenomas y fibroadenomas, respectivamente. Los tumores malignos más frecuentes en el tejido mamario, clasificados según su morfología son: carcinoma ductal, el cual se inicia en los conductos lactíferos de la mama y el carcinoma lobulillar originado en los lóbulos mamarios. Otros subtipos de cáncer de mama menos comunes incluyen mucinoso, papilar, tubular cribiforme, micropapilar, medular, metaplásico y carcinomas inflamatorios (Sandhu y col., 2010; Forman y col., 2014).

Además de su comportamiento y morfología los tumores mamarios son clínicamente clasificados según su estadio (Tabla 1). Con el uso de pruebas de diagnóstico se determina el estadio del tumor según el sistema de clasificación TNM, en el cual se evalúa el tamaño y ubicación del tumor primario (Tumor, T), si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos y cuántos ganglios están comprometidos (Ganglio, N) y por último se evalúa si el cáncer ha metastizado hacia otras partes del cuerpo (Metástasis, M). Los resultados se combinan para determinar el estadio del cáncer de cada paciente, pudiéndose encontrar cinco estadios diferentes: estadio 0 denominado

cáncer *in situ* o no invasivo, y los estadios I a IV, que representan cáncer de mama invasivo (Arce y col., 2011).

Tabla 1. Agrupación TNM, según el Instituto Nacional de Cancerología. Tomado de Arce y col., 2011.

Estadio	T (tamaño del tumor)	N (ganglios)	M (metástasis)
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

T: Tamaño tumoral. Tis: carcinoma *in situ*; T1: tumor ≤20 mm; T2: Tumor >20 mm pero ≤50 mm en su diámetro mayor; T3: Tumor >50 mm pero ≤50 mm en su diámetro mayor; T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o dermis (ulceración o nódulos cutáneos). N: Ganglios. N0: no hay metástasis en los ganglios regionales; N1: metástasis móviles en ganglios ipsilaterales, del nivel I o II de la axila; N2: metástasis en ganglios ipsilaterales en el nivel I o II de la axila, que están fijos o en conglomerado. Ganglios positivos en la cadena mamaria interna, en ausencia de ganglios clínicamente palpables; N3: metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III) ipsilaterales con o sin involucrar ganglios de los niveles I o II. Ganglios en la cadena mamaria interna con afección de los ganglios del nivel I o II axilar. M: Metástasis. M0: no hay evidencia clínica o radiográfica de metástasis a distancia; M1: metástasis a distancia detectables.

El cáncer de mama es el segundo cáncer más frecuente en el mundo, y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), en el 2012, estimó 1,6 millones de casos nuevos de cáncer de mama, representando el 25% de todos los tipos de cáncer diagnosticados en ese año, siendo la primera causa de muerte en la población femenina de países subdesarrollados (14,3%) y la segunda causa de muerte en países desarrollados (15,4%) (GLOBOCAN, 2015). Las bajas tasas de supervivencia en países poco desarrollados pueden deberse a la falta de programas de detección temprana y servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento precoz (Coleman y col., 2008). En Venezuela, según el MPPS, para el año 2012, el cáncer de mama fue la primera causa de muerte oncológica en la población femenina, reportándose 2.067 muertes, convirtiéndose esta patología en un alarmante problema de Salud Pública, que está afectando a la población femenina actualmente; que si bien puede afectar a los hombres, las cifras vigentes de mortalidad masculina en el país no supera los 10 casos anuales.

Ahora bien, las probabilidades de desarrollar cáncer de mama aumentan o disminuyen según el número de factores de riesgo que se conjugan, entre los cuales se incluye el ambiente, los genes y el estilo de vida (Lacey y col., 2009). Actualmente se conocen bien varios factores de riesgo asociados con el cáncer de mama, sin embargo, en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificar a los factores de riesgo específicos que originaron la enfermedad (Porter, 2009).

1.2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de mama

Diversos estudios han demostrado la existencia de variables que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres que las poseen. Entre estas variables se encuentran: 1) factores reproductivos, 2) factores físicos y 3) factores genéticos y biológicos, que también pueden afectar el desarrollo de esta enfermedad (Lacey y col., 2009; Porter, 2009).

Los factores reproductivos que incrementan el riesgo de transformar la células del tejido mamario a cáncer de mama se pueden dividir en aquellos que: a) involucran la exposición prolongada a estrógenos endógenos, tales como: menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad y primer parto posterior a los 40 años y los que b) involucran la exposición prolongada a estrógenos exógenos, como son: el uso de anticonceptivos orales y tratamientos de sustitución hormonal (Longnecker y col., 1996; Lacey y col., 2009; Porter, 2009). Dentro de los factores físicos se encuentran el sobrepeso u obesidad en la menopausia, el sedentarismo y hábitos tabáquicos y/o alcohólicos (Longnecker y col., 1996; García y col., 2004).

En cuanto a los factores genéticos y biológicos, que también pueden influir en el desarrollo del cáncer, se considera que los antecedentes familiares de cáncer de mama y la condición genética del paciente aumentan el riesgo de desarrollarlo. Por ejemplo, mutaciones en algunos genes como *BRCA1*, *BRCA2* y *p53* se asocian a un riesgo elevado de este tipo de cáncer (Porter, 2009).

La expresión de receptores hormonales, como los Receptores de Estrógeno (RE) y los Receptores de Progesterona (RP), así como la sobre expresión del Receptor del Factor

de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (HER-2), han sido identificados como factores predictivos entre las pacientes con cáncer de mama. Actualmente, estos marcadores son comúnmente usados para definir el tratamiento y establecer el pronóstico de la enfermedad asociados con las variables clínicas y patológicas, metástasis ganglionar axilar, tamaño del tumor, tipo histológico, grado del tumor y márgenes quirúrgicos, por lo tanto se han establecido cinco perfiles o subtipos moleculares de carcinoma mamario basados en la evaluación de la expresión de los receptores RE, RP, HER-2 y el índice de proliferación celular a partir de la detección del anticuerpo monoclonal Ki-67 (Duarte y col., 2011).

Múltiples estudios preliminares utilizando, inmunohistoquímica y microarreglos de ADN, han identificado diferentes perfiles de expresión o subtipos moleculares de cáncer de mama, basados en su morfología, el comportamiento clínico y sensibilidad a agentes terapéuticos de los tumores, así como también en la positividad para el receptor de estrógeno. En este estudio empleamos la clasificación planteada por Goldhirsch y colaboradores en el 2011, quienes de acuerdo a la decisión planteada en la Conferencia Internacional de Cáncer de Mama realizada en el 2011, agruparon los carcinomas mamarios en cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B HER2-, luminal B HER2+, sobreexpresión de HER2+, basal o triple negativo (TN), de acuerdo al fenotipo obtenido mediante análisis inmunohistoquímico (Tabla 2). En la clasificación propuesta, el índice de Ki-67 es importante para distinguir entre los subtipos luminal A y luminal B (HER2 negativo), ya que los tumores luminal B tienen mayor proliferación y pobre pronóstico que los luminal A. Si el índice de Ki-67 no está

disponible, medidas de proliferación alternativas son utilizadas, tales como el grado histológico (Cheang y col., 2009; Duarte y col., 2011; Goldhirsch y col., 2011).

Tabla 2. Definiciones de los subtipos moleculares de cáncer de mama. Tomado de: Goldhirsch y col., 2011.

SUBTIPO INTRÍNSECO	DEFINICIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA
Luminal A	Luminal A RE y/o RP positivo HER2 negativo Ki-67 bajo (<14%)
Luminal B	Luminal B (HER2 negativo) RE y/o RP positivo HER2 negativo Ki-67 alto (>14%) Luminal B (HER2 positivo) RE y/o RP positivo HER2 positivo Ki-67 alto o bajo
HER2	HER2 positivo (no Luminal) HER2 positivo RE y RP negativo
Basal o triple negativo	Triple negativo (TN) HER2 negativo RE y RP negativo

Los tumores luminales han sido asociados con pronósticos más favorables, mientras que los subtipos triple negativos y la sobreexpresión de HER2 han sido asociados con pronósticos menos favorables. Los tumores triple negativos (TN) tienen un alto riesgo

de recurrencia dentro de tres años y alta tasa de mortalidad dentro de cinco años, cuando se compara con otros subgrupos (Sandhu y col., 2009; Duarte y col., 2011).

Finalmente, en las últimas décadas, se ha considerado como factor importante en el desarrollo de cáncer, la acción de un grupo de virus que provocan tumores tanto en modelos experimentales, como en humanos (Bonnet y col., 1999; Lawson y col., 2010). Tales como el Virus de Papiloma Humano (VPH), el cual es el agente etiológico del cáncer de cuello uterino y el Virus Epstein-Barr (VEB) asociado con el carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitts y otros tipos de cáncer (Andújar, 2004). Desde hace unos 20 años se ha venido estudiando el papel de estos virus en el desarrollo del cáncer de mama y las estrategias virales responsables de la transformación de las células hospederas, bien sea por la expresión de genes virales similares a genes celulares, o por la expresión de proteínas con capacidad de alterar el ciclo celular (Navas, 2008).

Algunos estudios han planteado la posibilidad de que la infección de células del tejido mamario por agentes virales como VPH y VEB influye en el nivel de expresión de los receptores hormonales en las pacientes con cáncer de mama (Lin y col., 2007; Piana y col., 2014; Fernandes y col., 2015b).

1.3. Virus de Papiloma Humano (VPH)

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es un virus de transmisión sexual, miembro de la familia *Papillomaviridae*, su genoma se compone de ADN bicatenario, con un viri3n de 52 a 55 nm de diámetro y una cápside icosaédrica de 72 capsómeros, donde se encuentra el ADN circular de aproximadamente 8.000 pares de bases (pb); este tipo de virus no presenta envoltura proteica sobre la nucleocápside por lo que se considera un virus desnudo (Figura 2) (Shors, 2009; Navarro, 2004).

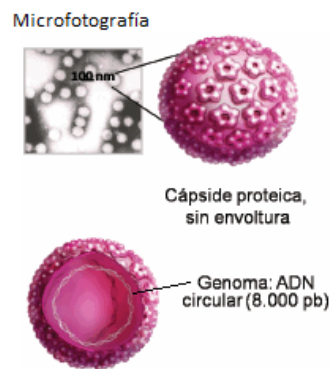


Figura 2. Modelo tridimensional del Virus Papiloma Humano. Modificado de: Picconi, 2013.

El genoma de VPH codifica ocho proteínas y está organizado en 3 regiones funcionales denominadas temprana (Early, E), tardía (Late, L) y no codificante (LCR/URR), de acuerdo al momento en que son expresadas en el ciclo viral, su estructura se esquematiza en la figura 3.

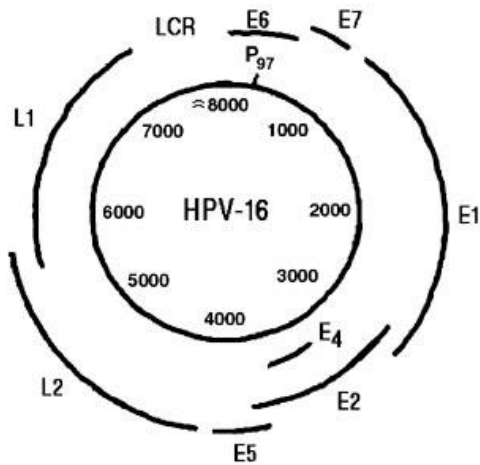


Figura 3. Representación esquemática del genoma del Virus de Papiloma Humano. Tomado de: Rivera y col., 2006.

La región temprana contiene seis secuencias (*E1, E2, E4, E5, E6 y E7*) que codifican las proteínas estructurales tempranas requeridas en la replicación extracromosómica del ADN viral, tales como: *E1, E2, E4 y E5*; y las oncoproteínas *E6 y E7*, que están asociadas con la maduración y proliferación del virus, favoreciendo la división de la célula huésped (células basales, parabasales e intermedias). La región tardía contiene los genes que codifican las proteínas estructurales *L1 y L2*, que se expresan en las células superficiales y forman la cápside viral. Y por último, la región no codificante o reguladora *Long Control Region (LCR)*, también conocida como región reguladora ascendente (*Upstream Regulatory Región, URR*), que consta de 400 a 1000 pares de bases, donde contiene el origen de replicación, una región promotora (*p97* en VPH-16) y una secuencia intensificadora que controlan la transcripción de los genes virales (López y Aristizábal, 2006; De Guglielmo y col., 2010).

Es importante señalar que los genes tempranos (*E*) difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de VPH, mientras que los genes de expresión

tardía (L) presentan secuencias conservadas entre ellos. Siendo estos últimos utilizados como diana, especialmente *L1*, para la detección de VPH por métodos de consenso, mientras que los genes de expresión temprana son utilizados para la detección por métodos tipo específicos (Puig y col., 2002).

Los genotipos y subtipos de VPH están clasificados taxonómicamente según la secuencia nucleotídica del gen *L1*, una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral. Un nuevo genotipo viral se define cuando se identifica un nivel de variación mayor al 10% en la secuencia de *L1*, respecto a la secuencia de los tipos previamente clasificados, y un subtipo entre el 2 y 10% de variación; de la misma manera, miembros de diferentes géneros comparten menos del 60% de homología en el marco abierto de lectura *L1* (de Villiers y col., 2004).

Los tipos virales encontrados en los humanos se encuentran clasificados dentro de 5 géneros, algunos de ellos son los virus que pertenecen a los géneros *Gamma* y *Beta*, los cuales sólo causan infecciones asintomáticas en individuos inmunocompetentes, detectados en hisopados de piel y para algunos *Gamma*, en hisopados de mucosas. Los virus del género *Alpha*, en cambio, producen lesiones cutáneas y mucoso/genitales, asociados al desarrollo de cáncer de cuello uterino y la formación de verrugas (Chouhy y col., 2012; Doorbar y col., 2012).

Los genotipos de VPH mucoso/genitales del género *Alpha* pueden clasificarse según el riesgo potencial que confieren de desarrollar lesiones de alto grado o lesiones invasivas (Tabla 3). Los tipos de VPH de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR) (6 y 11) suelen asociarse con condilomas y/o lesiones intraepiteliales de bajo grado (LiEBg), y

aquellos de alto riesgo (VPH-AR) (16, 18, 31, 33, entre otros) asociados a lesiones intraepiteliales de alto grado (LiEAg), carcinoma *in situ* (CIS) y con carcinomas invasivos, en cuello uterino (Lacruz y col., 2003).

Tabla 3. Tipos de VPH, según el riesgo de desarrollar cáncer. Tomado de Puig y col., 2002.

Bajo riesgo oncogénico (VPH-BR)	Alto riesgo oncogénico (VPH-AR)
6,11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

La infección por VPH tiene lugar en los queratinocitos (células epiteliales) de la membrana basal del epitelio estratificado escamoso, a través de lesiones en la piel, lo cual permite la entrada del virus a estas células. Sin embargo, la replicación y la expresión de los genes virales, que tiene lugar en el núcleo celular, es dependiente de la diferenciación y maduración normal del epitelio (Zheng y Baker, 2006; Shors, 2009). Esto se debe a que este virus carece de dos proteínas esenciales para completar su ciclo viral, la ADN y ARN polimerasa, las cuales sí se encuentran en la célula hospedera y son utilizadas por el virus para llevar a cabo su replicación y expresar las proteínas necesarias para completar su ciclo de vida. Esta dependencia del virus a la célula hospedera junto a la expresión de oncoproteínas virales conduce a la célula a un estado proliferativo sin que ocurra lisis celular (De Guglielmo y col., 2010).

El ciclo de vida del VPH inicia cuando las partículas virales entran a través de microlesiones a la membrana basal del epitelio escamoso estratificado, donde pueden permanecer de forma episomal, en estado latente, o salir de esa latencia y aprovechar

la diferenciación celular normal del epitelio cervical (Figura 4). De esta manera, paralelamente a la maduración del epitelio, el virus expresa sus genes en forma secuencial, en primer lugar los genes tempranos (*E1, E2, E4, E5, E6 y E7*) en las capas basales, y posteriormente en capas superficiales del epitelio más diferenciado expresan sus genes tardíos (*L1 y L2*) que forman la cápside de las nuevas partículas virales que repetirán el ciclo. En determinadas circunstancias fisiológicas de permisividad inmunológica y tras un periodo largo de persistencia de la infección, las partículas de ADN viral que se encuentran en forma episomal pueden integrarse dentro del genoma celular por eventos de recombinación no homóloga, proceso empleado frecuentemente por las células en la reparación de daños genéticos (López y Aristizábal, 2006).

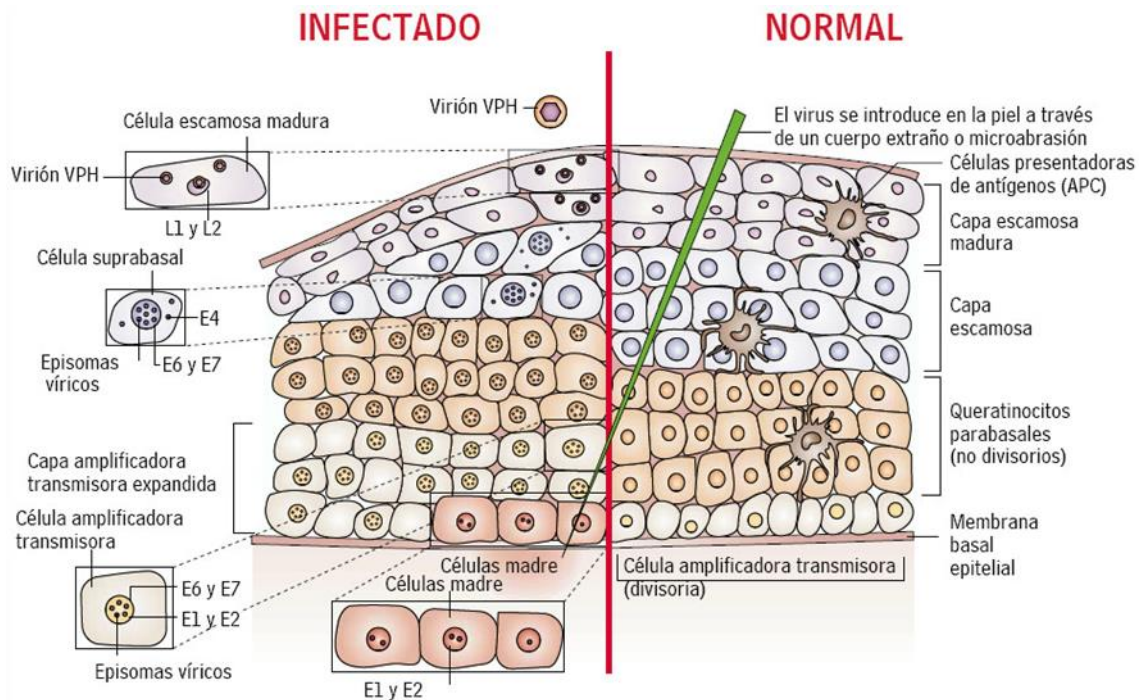


Figura 4. Esquema de la replicación del Virus de Papiloma Humano a nivel del epitelio escamoso estratificado. Modificado de: Frazer, 2004.

La integración de ADN VPH interrumpe y elimina el marco abierto de lectura de *E2*, perdiéndose la expresión de este gen. De esta manera, la integración del genoma viral y la pérdida concomitante de la expresión de *E2* podría ser un paso importante en el proceso carcinogénico que resulta en la expresión alterada de los genes virales *E6* y *E7*, debido a que la proteína *E2* funciona como control negativo de la replicación viral (Puig y col., 2002; López y Aristizábal, 2006).

Aunque los marcos abiertos de lectura de las proteínas *E6* y *E7* están presente en los genotipos virales de bajo riesgo, como VPH 6 y 11, al igual que en los de alto riesgo, estas proteínas, en los genotipos de bajo riesgo, no se unen a p53 o si lo hacen es con baja afinidad. Además, los genotipos de VPH de bajo riesgo no integran su genoma al

de la célula hospedera, lo que hace que se mantenga la integridad del gen *E2* y se regule la expresión de los oncogenes virales *E6* y *E7*, impidiendo así que estos tipos virales generen lesiones malignas (Navas, 2008).

El carácter oncogénico de VPH se debe a que tiene la capacidad de producir una infección persistente en el epitelio, ya que no produce lisis celular porque depende de la maquinaria replicativa de la célula para completar su ciclo viral, esto conlleva a la expresión de oncogenes virales que alteran la integridad del genoma celular y, consecuentemente se activan sistemas de reparación celular que facilitan la integración del genoma del ADN del virus, lo que a su vez conduce a la sobreexpresión de los oncogenes *E6* y *E7*. Estas proteínas son capaces de interactuar con las proteínas celulares p53 y pRb, respectivamente, afectando sus funciones en la regulación del ciclo celular y conduciendo a la inmortalización celular permanente (López y Aristizábal, 2006; Navas, 2008).

La proteína p53 en condiciones basales, permite detener el ciclo celular en fase G1 por inhibición de quinasas dependientes de ciclinas, o activar el mecanismo de apoptosis, mediante la activación del gen *bax*, procesos desencadenados frente a una carga viral elevada o ante mutaciones del ADN celular. Sin embargo, su función protectora del genoma celular puede verse afectada por la oncoproteína E6 y conducir a la transformación de la célula hospedera. Para ello, se debe formar un complejo dimérico entre la proteína viral E6 y E6-AP (Figura 5), el cual se une a la región central de la proteína p53. E6AP actúa como una proteína ubiquitin ligasa (E3), permitiendo así que p53 sea rápidamente ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Otras

funciones de esta proteína viral, corresponden a la amplificación de la actividad telomerasa, inducir síntesis de ADN mutado y aumentar la integración del ADN viral al de la célula hospedera (Rivera y col., 2006).

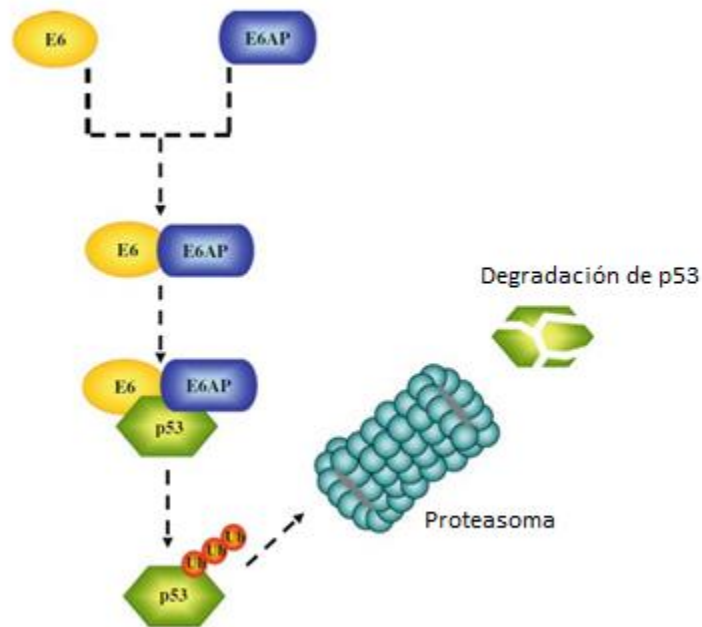


Figura 5. Representación del proceso de ubiquitinación de p53 por acción de la proteína viral E6. Modificado de: Ghittoni y col., 2010.

Por otro lado, en condiciones basales, la proteína del retinoblastoma (pRb) interacciona con el factor de transcripción celular E2F en la fase G1 del ciclo celular, inhibiendo la expresión de genes relacionados a la replicación del ADN y proliferación celular. La proteína viral E7 es una proteína ligante de Zinc, que experimenta fosforilación, permitiéndole unirse a través de su extremo N-terminal a pRb, alterando su función (Rivera y col., 2006). De esta forma, las proteínas E6 y E7 favorecen la proliferación e inmortalización celular con una mayor carga de ADN mutado.

1.4. Virus Epstein-Barr (VEB)

La familia *Herpesviridae* contiene únicamente el género *Herpesvirus*, los cuales son virus constituidos por ADN doble cadena, que compone el núcleo central en forma de toroide, una cápside icosaédrica, formada por 162 capsómeros que rodean el genoma, una capa proteica o tegumento, situada alrededor de la nucleocápside, que contiene al menos veinte proteínas diferentes, y un manto lipoproteico, del cual emergen 600 a 750 glicoproteínas, de diverso tamaño y función (Figura 6) (Fidel y col., 2012).

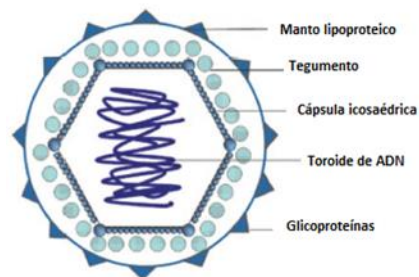


Figura 6. Representación esquemática de un Herpesvirus. Modificado de: Bascones y Pousa, 2011.

Dentro del género *Herpesvirus* se describen tres subgrupos: alfa, beta y gamma (α , β , y γ , respectivamente). El subgrupo alfa, incluye los Virus del Herpes Simple tipo 1 y 2 (VHS-1, VHS-2) y el Virus de Varicela Zóster (VVZ). El grupo beta, incluye a los Citomegalovirus (CMV) y los Herpesvirus tipo 6 y 7 (HHV 6 y 7). El grupo Gamma incluye el Virus Epstein-Barr (VEB) y el Herpes Virus tipo 8 (HHV 8) (Bascones y Pousa, 2011).

VEB es un herpesvirus transmitido por medio de secreciones orales (saliva) y es el responsable de producir la mononucleosis infecciosa, siendo además frecuentemente asociado con el desarrollo de diversas malignidades, tales como: Linfoma de Burkitt,

Linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico y carcinoma mamario (Andújar, 2004; Odumade y col., 2011).

El genoma de VEB es ADN lineal doble cadena de aproximadamente 172.000 pb, constituido por regiones de 500 pb, que por su ubicación en el genoma lineal se denominan secuencias terminales repetitivas (TR), internas repetitivas (IR) y dominios de secuencias únicas (U) (Straus y col., 1993; Tao y col., 2006). Dentro de cada una de estas secuencias se encuentran codificados tres tipos de genes, clasificados según el momento en que se expresan durante el ciclo productivo en: genes de expresión temprana inmediata (*ZEBRA* o *BZLF1*, *BRLF-1*, *BMLF-1*), de expresión temprana (*BNFL-2*) y de expresión tardía (proteínas de la envoltura glicoproteíca del virus, *VCA* y *gp350*). Así como también se encuentran codificados los genes expresados durante el ciclo de latencia, los cuales codifican para seis antígenos nucleares o *Epstein-Barr nuclear antigens* (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, B, C y EBNA-LP), tres proteínas latentes de membrana o *Latent Membrane Protein* (LMP1, 2A y 2B) y RNAs conocidos como *EBV-encoded small RNA* (EBER1 y EBER2) y *non-transcribed* (BART) (Figura 7) (Young y Murray, 2003; Kang y Kieff, 2015).

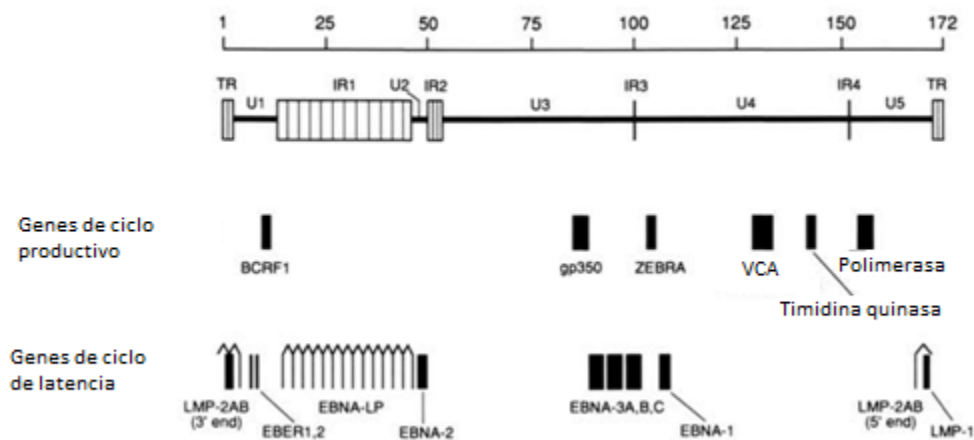


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del genoma de VEB. Modificado de: Straus y col., 1993.

El ciclo de vida de VEB está dividido en un ciclo productivo y un ciclo de latencia, donde no hay producción de nuevas partículas virales (Fidel y col., 2012). VEB es capaz de infectar células epiteliales de la faringe y linfocitos B, al interactuar con receptores celulares. En el caso de infección en células epiteliales, el virus se une a la integrina $\beta 1$ por medio de la proteína de la cápside viral BMRF-2, y en los linfocitos B la infección esta mediada por la interacción del ligando gp350/220 de la envoltura viral, con el receptor del complemento, CD21 (Odumade y col., 2011).

Se piensa que su ciclo de vida comienza cuando partículas virales presentes en la saliva infectan el epitelio oral (Figura 8), donde se comienzan a expresar los genes de expresión temprana inmediata del virus, como *BZLF1* o *ZEBRA* (*Z EBV replication activador*). La proteína *ZEBRA* actúa como activador de la replicación viral, así como también transactiva la expresión de otras proteínas tempranas inmediatas, que a su vez regulan la expresión de los genes tempranos, responsables de producir la ADN

polimerasa viral y la timidina quinasa, importantes para la replicación viral, así como también *BNFL2*, responsable del bloqueo del procesamiento de antígenos. Finalmente, los productos génicos tardíos son sintetizados, incluyendo los componentes estructurales del virión, tales como VCA (*viral capsid antigen*) y gp350, los cuales componen la envoltura glicoprotéica del virus; seguidamente liberando su progenie de las células infectadas por gemación, haciendo que VEB se disperse por el epitelio sin destruir la célula hospedera, y hacia tejidos epiteliales cercanos (lengua, glándulas salivales), saliva y linfocitos B, donde inicia también su ciclo productivo (Wolf y col., 1984; Straus y col., 1993; Pérez, 2014).

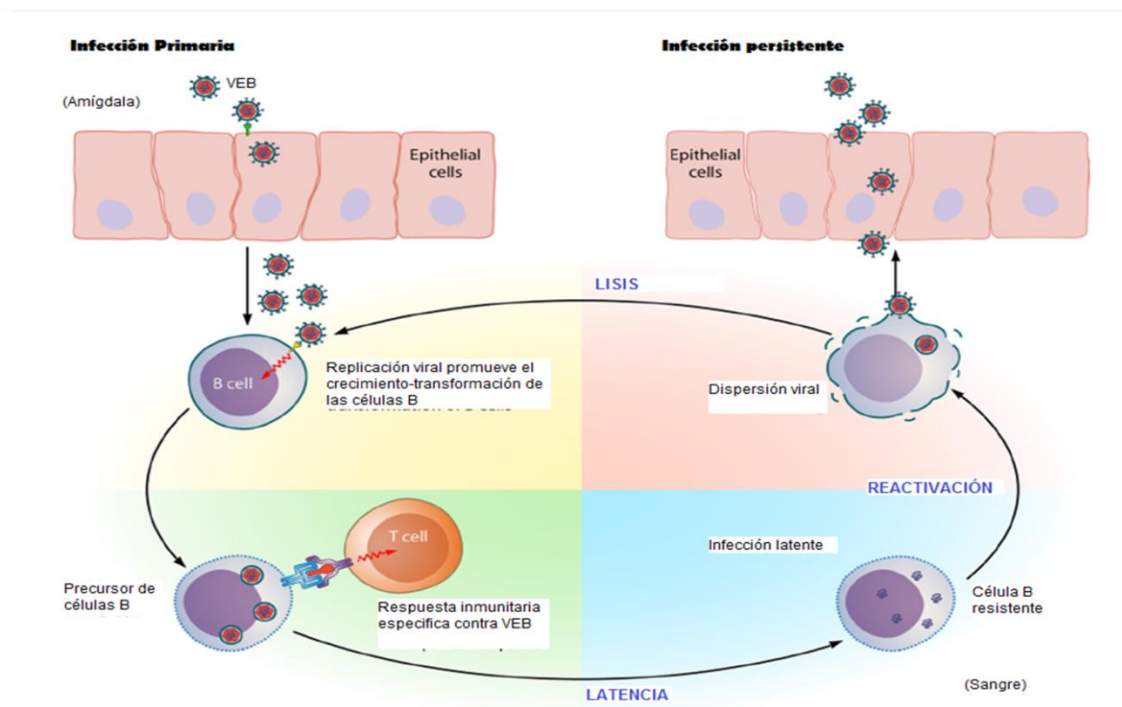


Figura 8. Infección y ciclo de vida de VEB en células epiteliales y linfocitos B. Modificado de: Odumade y col., 2011

Una vez que las partículas virales reconocen las glicoproteínas específicas en la superficie celular de linfocitos B, entran al citoplasma por gemación, lo que resulta en

el transporte del genoma de VEB dentro del núcleo celular, donde se produce la replicación viral mediada por las ADN polimerasas viral y de la célula. Los productos génicos del virus activan el programa de crecimiento de las células B, resultando en la proliferación de los linfocitos B (centroblastos). Las células T reconocen los antígenos presentados por las células B, y finalmente estos linfocitos B son destruidos por linfocitos T citotóxicos (Odumade y col., 2011). Por efecto de la respuesta inmunitaria contra las células infectas por VEB, bien sea en linfocitos B o células epiteliales, el virus detiene el ciclo productivo y recirculariza su ADN viral por unión de las secuencias terminales repetitivas (TR), permitiéndole permanecer en el núcleo en forma episomal (o en forma extracromosómica) durante su estado de latencia, aunque se ha planteado la posibilidad de que el ADN viral se pueda encontrar integrado al genoma celular (Odumade y col., 2011).

El virus una vez en fase latente expresa sus genes en uno de los tres patrones o programas de latencia (latencia I, II y III), donde cada programa conduce a la producción de un conjunto limitado de proteínas y ARN virales, tal como EBNA 1, la cual es capaz de evadir la respuesta inmune contra la infección, permitiendo además la replicación del ADN viral en la célula hospedera en división (latencia I). EBNA 1 y LMP1/2A son expresadas durante el programa de latencia II, induciendo la diferenciación celular. Durante el programa de latencia III son expresadas las proteínas LMP1 y LMP2, las cuales son las responsables de activar e inducir el crecimiento celular. El virus también puede dejar de expresar todas sus proteínas permitiéndole mantener la infección persistente y evadir el sistema inmune (Thorley y Gross, 2004; Odumade y col., 2011). Las infecciones por VEB en estado de latencia

pueden dar lugar al desarrollo de malignidades, ya que sus proteínas de latencia tienen la capacidad de transformar las células, caracterizadas por la presencia uniforme del genoma del virus y expresión génica (Pérez, 2014).

El virus puede ser reactivado de su infección latente en los linfocitos B por ciertos químicos o anticuerpos. Este estímulo conlleva a la expresión de productos génicos inmediatos tempranos de VEB, como es la proteína ZEBRA, la cual actúa como activador de la replicación viral en las células B de infección latente (Straus, 1993; Odumade y col., 2011).

Durante el ciclo productivo se producen viriones infecciosos y la ADN polimerasa viral es responsable de la copia del genoma viral. Esto contrasta con el ciclo de latencia, en la que la ADN polimerasa de la célula hospedera copia el genoma viral (Odumade y col., 2011; Pérez, 2014).

Tugizov y colaboradores en el 2003, plantearon un modelo de infección de las células epiteliales de la mucosa de la orofaringe, donde se proponen dos rutas independientes: el contacto célula a célula en la superficie apical del epitelio con células de la saliva infectadas por VEB, o la infección de la superficie basolateral del epitelio por viriones de VEB libres. La infección basolateral del epitelio podría estar mediada por la interacción de las partículas virales con integrinas de la superficie celular. La salida de las partículas virales ocurre por gemación, tanto de la superficie apical como la basal, permitiendo la secreción del virus a la saliva y el tejido, respectivamente. Además, la progenie viral de las células infectadas podría

dispersarse a células vecinas no infectadas a través de las membranas pudiéndose diseminar así el virus dentro del epitelio (Figura 9).

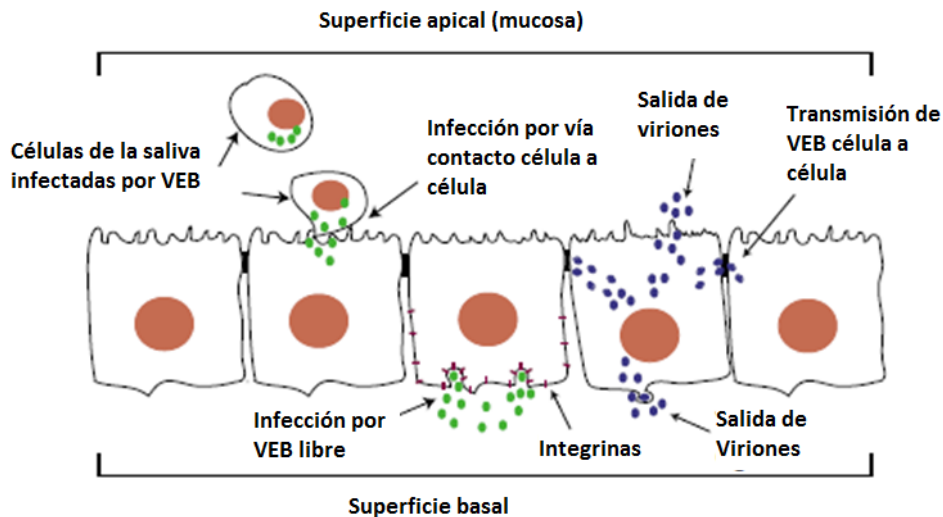


Figura 9. Mecanismos de infección de VEB. Modificado de: Tugizov y col., 2003.

En cuanto a la capacidad oncogénica de las proteínas de latencia de VEB, algunos autores han demostrado que el principal mecanismo de transformación celular de VEB, tanto en linfocitos B como en células epiteliales, corresponde a la expresión de una proteína integral de membrana (LMP1) capaz de causar la inmortalización celular y que eventualmente, conducirá a la transformación de la célula hospedera (Young y Murray, 2003). Pero también muchos reportes concluyen que el programa de latencia activado en el carcinoma nasofaríngeo es la Latencia II, en la cual se expresan los transcritos EBERs, BARTs, la proteína EBNA1 y proteínas latente de membrana (LMP1, LMP2A and LMP2B), el cual se presume que puede activarse en el carcinoma

mamario, ya que se ha encontrado la expresión de alguna de estas proteínas en el tejido tumoral de la mama (Lorenzetti y col., 2010). Siendo de gran importancia oncogénica las proteínas EBNA1, LMP1 y LMP2A, donde EBNA1 es capaz de suprimir la reactivación del ciclo lítico, manteniendo así la expresión del genoma viral en un estado silente, así como también evita la activación de p53 y la apoptosis como respuesta al daño genómico de las células huésped. Por su parte LMP1 y LMP2A mimetizan la señalización del receptor CD40 y los receptores de las células B (BCR), respectivamente, estas proteínas son capaces de inhibir la apoptosis mediante la activación de factores de transcripción NF- κ B (Young y Murray 2003; Odumade y col., 2011; Kang y Kieff, 2015). LMP1 además, es capaz de inducir la expresión de la proteína celular A20, la cual es capaz de unirse e inhibir la actividad de TRAF2 (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), conduciendo a la inmortalización celular (Laherty, 1992). Por otra parte, Miller y colaboradores en 1995 demostraron que LMP1 es capaz de inducir la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en células epiteliales, conduciendo a la replicación descontrolada del ADN.

2. ANTECEDENTES

2.1. Agentes virales y el desarrollo de cáncer

El cáncer ha sido reconocido como una enfermedad desde hace muchos años, sin embargo la causa específica que conduce al desarrollo de la carcinogénesis aún no ha sido clarificada. Desde el siglo XX se ha venido considerando a algunas infecciones virales como posibles factores etiológicos en el desarrollo de la carcinogénesis.

En 1911, Peyton Rous descubrió el primer virus asociado con el desarrollo de cáncer, demostrando que al inocular gallinas sanas con filtrados de extractos de células tumorales (que contenían agentes filtrables), provenientes de gallinas con sarcoma de células fusiformes, las gallinas sanas desarrollaban el mismo tumor en 4 semanas, este virus fue denominado Virus del Sarcoma de Rous (RSV) (Rous, 1911). Sin embargo, en ese tiempo no se reconoció este hallazgo, sino hasta 50 años después.

A pesar de la reticencia de muchos científicos ante el posible rol de los virus en el cáncer, investigadores continuaron identificando nuevos virus tumorales en las siguientes décadas, luego del descubrimiento de RSV. En 1933, Richard Shope y E. Weston Hurst, demostraron la presencia de agentes filtrables, en verrugas de conejos de rabo blanco, responsables del desarrollo de esta enfermedad, los cuales correspondían a papilomavirus. Peyton Rous y colaboradores en 1935, basados en estos estudios, revelaron el potencial tumorogénico del primer virus de ADN, ahora llamado Virus de Papiloma del Conejo cola de algodón (CRPV). Rous encontró que estos virus no pueden replicarse y producir verrugas en el conejo doméstico, una

especie diferente al conejo de rabo blanco, en su lugar induce a la formación de carcinomas de piel después de un periodo prolongado (Ronald y Janet, 2008).

De esta manera, las investigaciones acerca de los virus y su papel fundamental en el desarrollo de tumores en animales crearon cierto interés en la posible asociación de los virus en el desarrollo de malignidades en los humanos también. Tony Epstein e Yvonne Barr en 1965, estudiaron líneas celulares provenientes del linfoma de Burkitt basado en la hipótesis de que el agente etiológico de este linfoma era un virus, encontrando partículas virales de tipo herpesvirus, al que denominaron virus Epstein-Barr. En 1975, Blumberg y colaboradores, descubrieron una relación entre la infección crónica del virus de la hepatitis B (VHB) y el carcinoma hepático. Sobre la base de que las infecciones por VPH estaban asociadas al cáncer en humanos y pruebas que relacionan la infección por VPH a las verrugas genitales emergentes, Harald zurHausen propuso por primera vez en 1974 que el VPH podía representar el agente etiológico de cáncer de cuello uterino de la mujer, a pesar de la creencia general, en aquel tiempo, de que el virus de transmisión sexual, el Virus Herpes Simple tipo 2 (VHS-2) era la causa probable de esta enfermedad (Ronald y Janet, 2008).

Por otro lado, la teoría de Howard Temin a partir de modelos virales, con genes de potencial oncogénico, como los rotavirus, planteaba que en el ADN normal se encontraban genes con capacidad de transformar la célula, denominados protovirus, que por interacción con diversos factores se convertían en agentes oncogénicos (Temin, 1976). Más adelante se supo que los virus asociados con el desarrollo de algunas malignidades tenían un carácter oncogénico, capaz de integrarse en el

genoma celular y transformar las células normales, conduciéndolas a un crecimiento descontrolado. Por lo tanto, en los últimos 30 años se ha encontrado considerable evidencia del rol que cumplen diferentes agentes infecciosos, particularmente los virus, en el desarrollo de cánceres humanos. Existen seis grandes familias de virus que pueden causar cáncer, denominados oncogénicos: cinco familias corresponden a virus de ADN (Papilomavirus, Herpesvirus, Poliomavirus, Adenovirus, Hepadnavirus), y con contenido de ARN están los retrovirus. Entre los carcinomas asociados a algunos de estos virus son: hepatocarcinoma asociado al VHB, leucemia a los retrovirus, el cáncer de cuello uterino al VPH, carcinoma nasofaríngeo al virus Herpes y VEB, sarcoma de Kaposi al virus Herpes 8 (Andújar, 2004; Parkin, 2006). En este sentido, desde los años 90 se ha venido planteando también la posible asociación de las infecciones por VPH y/o VEB con el desarrollo de cáncer de mama.

2.2. VPH y cáncer de mama

Se ha demostrado que VPH es el agente causal del cáncer de cuello uterino, así como también un importante factor de riesgo para desarrollar cáncer de cabeza y cuello, y en estudios recientes ha sido asociado con el desarrollo de cáncer de mama. Asimismo, zurHausen, en su revisión, señala que más del 50% de todos los tipos de cáncer que afectan a las mujeres están asociados a infecciones causadas por VPH (zurHausen, 2009).

Sin embargo, la frecuencia con que se encuentra este virus en carcinomas mamarios varía según el tipo de estudio realizado, por lo que los resultados son aún una

controversia. Algunos autores no han encontrado evidencia de la presencia del genoma de VPH en carcinomas mamarios que soporte la hipótesis de la relación entre la infección viral y la carcinogénesis mamaria, entre ellos se encuentra el trabajo realizado por Wrede y colaboradores en el 1992, quienes trabajaron con 80 muestras de cáncer de mama en pacientes del Reino Unido, para detectar secuencias de ADN de VPH genital en el tejido mamario, mediante PCR. Lindel y colaboradores, en el 2007, buscaron la presencia del genoma de VPH mediante PCR en 81 biopsias de cáncer de mama embebidas en bloques de parafina, de una población Suiza. Hachana y colaboradores, en el 2010, realizaron la detección de VPH mediante PCR e hibridación *in situ*, en biopsias congeladas de 123 pacientes de Túnez con cáncer de mama, diagnosticado entre 1995-2006, particularmente de los genotipos virales 16, 18, 31 y 33. En el 2011, Hedau y colaboradores, utilizaron 228 biopsias de cáncer de mama de pacientes de la India, para detectar secuencias genómicas de VPH mediante PCR. Además en el 2015, Vernet y colaboradores, también evaluaron la presencia de VPH en biopsias embebidas en parafina de cáncer de mama mediante PCR, en España. Sin embargo, al igual que en los estudios antes mencionados tampoco fue encontrado el genoma de VPH en ninguna de las muestras de cáncer de mama evaluadas.

A la par con las investigaciones mencionadas anteriormente, se han venido realizando estudios que sugieren una asociación entre las infecciones por VPH de alto riesgo y la progresión de carcinomas mamarios, siendo los VPH tipo 16 y 18 los principales genotipos capaces de inmortalizar las células epiteliales de la mama y cambiar sus propiedades de proliferación, demostrando mediante diferentes técnicas la presencia del genoma de VPH en muestras de cáncer de mama (Band y col., 1990; Akil y col.,

2008). Entre ellos se encuentran el trabajo realizado en 1999, por Henning y colaboradores, quienes seleccionaron 41 pacientes femeninas con diagnóstico de cáncer de mama, provenientes de Italia y Noruega, con antecedentes de neoplasia intraepitelial cervical III (NICIII), para estudiar la presencia de VPH en las células tumorales de la mama. Esas muestras fueron examinadas mediante PCR, detectando 46% de positividad para VPH. Widschwendter y colaboradores, en el 2004, evaluaron la presencia de ADN de VPH en 13 muestras de cáncer cervical y cáncer de mama embebidas en parafina de pacientes provenientes de Austria, mediante PCR. Encontrando que el 100% de las pacientes fueron positivas para VPH en las muestras de cáncer cervical y 67,63% de las pacientes con cáncer de mama presentaron ADN de VPH, identificando el mismo genotipo en ambas localizaciones.

En el 2005, de Villiers y colaboradores, demostraron la presencia del genoma de VPH mediante PCR, en 29 biopsias frescas de carcinomas mamarios y en las correspondientes 29 biopsias de pezón, reportando 86% (25/29) y 69% (20/29) de positividad, respectivamente. En el 2008, Akil y colaboradores, evaluaron 113 biopsias de cáncer de mama embebidas en parafina para reconocer los tipos de VPH de alto riesgo en mujeres Sirias, reportando 61,06% de positividad, y la detección de los genotipos 33 y 35 en mayor proporción. Mou y colaboradores, en el 2011, detectaron la presencia de secuencias del genoma de VPH en 62 biopsias de tumores de cáncer de mama y 62 biopsias de tejido sano adyacente, además de 46 biopsias de tejido sano de otras pacientes. La detección se realizó mediante una PCR anidada y la tipificación con una hibridación reversa por dot blot. Reportaron 6,5% de positividad para las muestras tumorales, identificando los tipos 16 y 18. No hubo muestras

positivas para ninguno de los tejidos sanos evaluados. En estudios más recientes, como el realizado por Manzouri y colaboradores, en el 2014, quienes evaluaron 55 casos de cáncer de mama y 51 casos de muestras de lesiones benignas de la mama, utilizando PCR convencional para la detección de VPH, realizaron la tipificación viral mediante una hibridación reversa, y reportaron una frecuencia de positividad de 18,2% para los casos de cáncer de mama y de un 13,7% para lesiones benignas, encontrando en el primer grupo los genotipos 16, 11, 18, 33, 35, 45 y 55; y los genotipos 31, 43, 33, 44 y 55 en el segundo grupo. En el 2015, Fu y colaboradores, también evaluaron la presencia de VPH tipo 58 en 169 biopsias de pacientes con carcinoma mamario invasor y 83 biopsias de lesiones benignas de la mama, utilizando una PCR convencional con iniciadores tipo específicos para detectar el ADN de VPH-58. Estos autores obtuvieron 14,79% de positividad de ADN de VPH-58 en las pacientes con cáncer y 1,20% de positividad en las muestras benignas.

2.3. VPH y cáncer de mama en América latina

En América Latina también se han venido realizando algunos estudios que evalúan la relación entre la infección por VPH y el desarrollo de carcinoma mamario. Cantú de León y colaboradores, en el 2009, evaluaron 51 biopsias de cáncer de mama embebidas en parafina, de una población de México, de las cuales 29,4% fueron positivas, encontrando infecciones únicas con los genotipos 16 y 18 con 66,6% y 20%, respectivamente, y 13,4% de infección mixta. Un trabajo más reciente en Latinoamérica fue realizado por Herrera-Goepfert y colaboradores, en el 2013,

quienes evaluaron la presencia de VPH en 20 casos de cáncer de mama metaplásico, de mujeres mexicanas. La detección se realizó mediante PCR con los iniciadores L1C1/L1C2, MY09/MY11, GP5/GP6; para la tipificación utilizaron una secuencia específica de E6 para los genotipos 16 y 18, de alto riesgo oncogénico. Reportaron una frecuencia de positividad de 40%, encontrando al genotipo 16 en 87,5% y al 18 en 12,5%. Para la cuantificación de la carga viral realizaron una PCR en tiempo real (q-RT-PCR), encontrando una carga viral baja respecto al control positivo (Células SiHa), con un promedio de 0,208 copias/célula.

2.4. VPH y cáncer de mama en Venezuela

En Venezuela, a pesar de que la tasa de mortalidad por cáncer de mama en la población femenina es relativamente alta, no se han realizado muchos estudios que planteen esta relación. Los únicos estudios reportados actualmente en el país, realizados por Fernandes y colaboradores, en 2015 evalúan la presencia del genoma de VPH en muestras de cáncer de mama de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante, mediante el estuche INNO-LIPA Genotyping Extra, reportando valores de positividad para el genoma de VPH del total de muestras evaluadas dentro del rango mundial, siendo los genotipos más frecuentes el 18, 33, 51 de alto riesgo oncogénico. Además relacionan la presencia de VPH con los subtipos de cáncer de mama, encontrando relación con los triples negativos (Fernandes y col., 2015a; Fernandes y col., 2015b).

2.5. VEB y cáncer de mama

De esta misma manera, otro virus que ha sido asociado con el desarrollo de cáncer de mama es VEB, el cual fue el primer virus humano claramente asociado con el desarrollo de cáncer humano, a partir de esta evidencia se ha demostrado que tiene un rol importante en el desarrollo de numerosas malignidades humanas, incluidas Linfoma Africano de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, desórdenes linfoproliferativos post-trasplantes, carcinoma nasofaríngeo y carcinoma gástrico. Los cánceres asociados a VEB varían marcadamente desde 100% con el carcinoma nasofaríngeo a 10% con el carcinoma gástrico. Así como también los datos reportados de VEB en muestras de cáncer de mama son limitados y controversiales, variando desde 0% a 100%. Algunos autores no han encontrado relación entre la presencia de secuencias genómicas de VEB y el desarrollo de cáncer de mama. En el 2000, Brink y colaboradores evaluaron 24 muestras de biopsias de cáncer de mama congeladas para detectar la presencia del genoma de VEB. Sin embargo, no encontraron evidencia significativa que asocie la presencia de VEB con el cáncer de mama, ya que no detectaron la transcripción activa de EBNA1, EBER1/2, ni la región *Bam*HI-A. Aunque encontraron 20% de positividad de ADN de VEB, lo atribuyeron a la presencia de un infiltrado linfocitario en el tumor, infectado por el virus. En el 2001, Chu y colaboradores estudiaron 48 biopsias de casos de carcinoma mamario, en Estados Unidos, para evidenciar mediante hibridación *in situ* cromogénica (CISH) e inmunohistoquímica (IHQ) la presencia del ARN no codificante EBER1 y las proteínas de latencia EBNA1, LMP1 y ZEBRA, respectivamente. Para detectar la presencia del ADN viral utilizaron los iniciadores específicos para los genes *EBNA4* y *LMP1*. Sin

embargo, encontraron baja frecuencia de infección (10%), ausencia de expresión de algunos genes en la mayoría de los casos y baja positividad para EBER1 (10%).

De esta misma manera, Kadivar y colaboradores, en el 2011, utilizaron 100 biopsias de cáncer de mama de pacientes de Irán, usando IHQ para identificar las células infectadas y PCR para detectar la presencia del genoma de VEB. Otro estudio en el mismo país, realizado por Fadavi y colaboradores, en el 2013, midió la carga viral de VEB en células de 18 biopsias de cáncer de mama embebidas en parafina, y no detectaron ningún virus por célula. Estos autores no encontraron ninguna célula infectada por VEB, por ninguna de las metodologías utilizadas. Con estos trabajos no se logró establecer una relación entre la infección viral y el cáncer de mama.

Por otro lado, también se ha reportado la infección por VEB en pacientes de cáncer de mama. Una de las primeras investigaciones que sugieren la posible asociación de este virus al cáncer de mama fue realizada en 1995, por Labrecque y colaboradores, quienes evaluaron 91 biopsias frescas de pacientes con cáncer de mama primario mediante PCR, encontrando 21% de positividad. Fina y colaboradores, en el 2001, investigaron la frecuencia y carga viral de ADN de VEB en varios casos de cáncer de mama utilizando PCR, junto con la influencia de distintas áreas geográficas. Para ello tomaron 509 muestras de carcinomas ductales invasivos, en regiones geográficas con alto riesgo de carcinoma nasofaríngeo. Encontraron que 31,8% de los tumores contenían el genoma viral, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre cada una de las regiones estudiadas (norte de África, sur de Francia y norte de Europa). Xue y colaboradores, en 2003, detectaron la presencia, mediante PCR, y la expresión transcripcional de genes codificados por VEB en 15 biopsias de cáncer de

mama, de origen ductal. Los genes virales, incluidos el *EBNA1*, fueron encontrados en 40% de los tumores.

En Argentina, Lorenzetti y colaboradores, en el 2010, evaluaron la presencia de ADN de VEB en 71 biopsias de carcinoma de mama mediante PCR, encontrando 31% de positividad de ADN de VEB y 0% de positividad para los casos de tejido mamario no neoplásico. En el 2013, Nidal analizó la presencia del genoma de VEB mediante una PCR múltiple y por IHQ identificó sus productos proteicos en biopsias de cáncer de mama, de 92 en pacientes de Jordania, reportando 26% de muestras positivas para el genoma viral, y demostró la presencia de células infectadas por VEB y la expresión viral de la proteína EBNA1. En el 2014, Yahia y colaboradores, evaluaron 92 biopsias de cáncer de mama en pacientes de Sudán. Utilizaron PCR con dos juegos de iniciadores específicos para los genes *EBNA1* y *LMP1*, para detectar la presencia del genoma de VEB en las células tumorales, encontrando 53,3% y 11% de positividad en las pacientes evaluadas, respectivamente. Además confirmaron la presencia del genoma viral mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En el mismo año, Marrão y colaboradores realizaron un estudio prospectivo en el que evaluaron la infección por VEB en 85 biopsias frescas de pacientes con cáncer de mama de Portugal. Para ello, detectaron el ADN de VEB mediante PCR en tiempo real en biopsias de tumor mamario embebido en parafina, encontrando 25,8% de positividad para VEB y las copias de ADN viral oscilaban entre 10 y 2950 copias/ μ g. En el 2015, Mazouni y colaboradores evaluaron la presencia del ADN de VEB en 117 biopsias de cáncer de mama mediante PCR cuantitativa, y encontraron 32,5% de casos positivos para VEB.

2.6. VPH y VEB asociados al cáncer de mama

Algunos estudios han planteado la coexistencia de VEB y VPH en tejidos tumorales de la mama. En Chile, Aguayo y colaboradores (2011), evaluaron la presencia del genoma de VPH mediante PCR convencional y el genoma de VEB lo evaluaron usando qRT-PCR, en 55 muestras de pacientes con cáncer de mama. Estos autores reportaron un 8,7% de positividad para VPH, con 100% para el genotipo 16, de alto riesgo oncogénico, y 6,5% de positividad para VEB. La coinfección de ambos virus fue detectada solo en 2,1% de los casos. Asimismo, Glenn y colaboradores, en el 2012, trabajaron con 50 biopsias de cáncer de mama, para detectar la coexistencia de VEB, VPH y el virus del tumor mamario en ratones (MMTV) en pacientes Australianas. Como casos control utilizaron células epiteliales extraídas de la leche de mujeres en periodo de lactancia. Identificaron en 68% de la muestras secuencias del genoma de VEB, en 50% secuencias de VPH de alto riesgo y en 78% secuencias de MMTV en las biopsias. Además, estos mismos virus fueron identificados por PCR *in situ*, encontrando en 72% de las muestras de cáncer de mama la presencia de más de un virus.

Estas evidencias permiten plantear una posible relación entre el cáncer de mama y la infección, bien sea por VEB o VPH, a partir de lo cual se pueden considerar estos virus como factores de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad, que causa muchas muertes en la población femenina a nivel mundial.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una patología muy frecuente en la población femenina a nivel mundial y la tasa de mortalidad por esta causa ha venido aumentando en los últimos años. Actualmente, el desarrollo de este carcinoma se ha relacionado con múltiples factores de riesgo intrínsecos y extrínsecos, tales como, menopausia tardía, menarquia temprana, el uso prolongado de anticonceptivos orales, la obesidad, la edad, presencia de hábitos tabáquicos y/o alcohólicos, predisposición genética, entre otros. A pesar de varios estudios realizados que evalúan la dependencia de algunos de estos factores y la carcinogénesis, aún no se ha encontrado el agente etiológico de esta enfermedad, de esta manera es de gran importancia identificar la causa del desarrollo del cáncer de mama y de esta manera, crear programas de prevención y tratamientos tempranos que permitan controlar el incremento de la mortalidad por esta patología oncológica.

Es por esto que durante las últimas décadas también se han venido planteando como posible factor de riesgo, virus con carácter oncogénico, relacionados además con otros carcinomas, tales como son VEB y VPH. Aunque esta hipótesis está en discusión, investigadores en distintas poblaciones a nivel mundial han obtenido resultados que evidencian la presencia del genoma de uno o ambos virus en células de carcinomas mamarios, así como también la expresión de algunas proteínas de estos virus, entre ellos destacan India, Estados Unidos, Jordania, Australia, Italia, Gran Bretaña, incluyendo algunas poblaciones de Latinoamérica, como Brasil, México, Argentina y Chile, reportando un porcentaje de positividad variable, que va desde 10% a 68% para VEB y desde 8,7% a 86% para VPH, aproximadamente, lo cual depende del tipo de muestra y técnicas utilizadas para la detección. En Venezuela, se registra un

considerable número de muertes por cáncer de mama cada año y hasta la fecha sólo se han reportado dos trabajos que evalúan la posible relación de VPH con esta patología. Sin embargo, no se ha realizado ningún trabajo que evalúe la presencia de ambos agentes virales en las pacientes con cáncer de mama.

Por esta razón, con el desarrollo de este trabajo se pretende dar inicio a la realización de estudios que evalúen esta asociación, y de esta manera abrir la oportunidad de crear estrategias de prevención temprana y seguimiento de las pacientes con esta patología en Venezuela, que afecta en gran manera a la población femenina, representando un problema de Salud Pública.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Evaluar la presencia de Virus de Papiloma Humano (VPH) y de Virus Epstein-Barr (VEB) en biopsias frescas de cáncer de mama como posibles factores de riesgo asociados a esta patología.

4.2. Objetivos Específicos:

- Extraer el material genético de las biopsias frescas de las pacientes de los grupos de estudio.
- Evaluar la calidad del ADN extraído de las muestras de las pacientes de los grupos de estudio.
- Detectar y tipificar la presencia de Virus de Papiloma Humano en las biopsias frescas de las pacientes de los grupos de estudio.
- Detectar la presencia del Virus Epstein-Barr en las biopsias frescas de las pacientes de los grupos de estudio.
- Correlacionar la presencia de los agentes virales con los datos demográficos de las pacientes en estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Población de estudio:

Se evaluó de forma prospectiva desde abril de 2014 hasta mayo de 2015, pacientes que asistieron a consulta en el Servicio de Ginecología, Unidad de patología mamaria (UPM); del Hospital Universitario de Caracas (HUC), situado en la Ciudad Universitaria de Caracas y fueron seleccionadas aquellas pacientes que cumplían los criterios de inclusión propuestos en este trabajo, descritos más adelante.

5.2. Muestra:

Se incluyeron un total de 44 mujeres de distintas edades, de las cuales 22 muestras fueron pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y 22 pacientes con diagnóstico de patología benigna, que asistieron a cirugía en el Servicio de Ginecología, Unidad de Patología Mamaria (UPM) del HUC. A cada una de las pacientes se les invitó a participar en el estudio, con previa información del diseño y protocolo, seguidamente se les realizó una encuesta para la recolección de datos clínicos y cada una firmó un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Bioética del HUC (ver Anexo 2).

5.3. Descripción del material biológico:

Luego de que los médicos especialistas realizaron la intervención quirúrgica, se tomó una biopsia fresca del tumor extraído, de aproximadamente 5 mm de diámetro, a las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama. Y se tomaron biopsias de tejido mamario sano de las pacientes con diagnóstico de patología benigna. Todas las

muestras fueron recolectadas en tubos estériles e identificados con el nombre de cada paciente, el mismo día de la cirugía en los quirófanos del HUC, y preservadas a -80°C en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología (IOH) del MPPS, hasta el momento de su análisis.

5.4. Reactivos:

Todas las soluciones que se utilizaron en este trabajo se prepararon con reactivos Grado Biología Molecular, siguiendo las especificaciones de la casa comercial correspondiente.

5.5. Criterios de Selección:

Inclusión:

- Grupo 1: Pacientes atendidas en el Servicio de Ginecología, del Hospital Universitario de Caracas, con diagnóstico de carcinoma mamario en estadios 0, I, II y aquellas pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario en estadios III y IV, quienes por motivos intrínsecos, no recibieron terapia neoadyuvante.
- Grupo 2: Pacientes atendidas en el Servicio de Ginecología, del Hospital Universitario de Caracas, con diagnóstico de patología mamaria benigna.

Se consideraron como patología benigna a aquellos diagnósticos que incluían fibroadenomas, abscesos mamarios, mamas supernumerarias.

Exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de enfermedad autoinmune u otro tipo de cáncer no relacionado con el tumor primario, objetivo del estudio.
- Pacientes embarazadas.
- Pacientes que recibieron terapia neoadyuvante.
- Que no aceptaran participar en el estudio.

5.6. Plan de trabajo

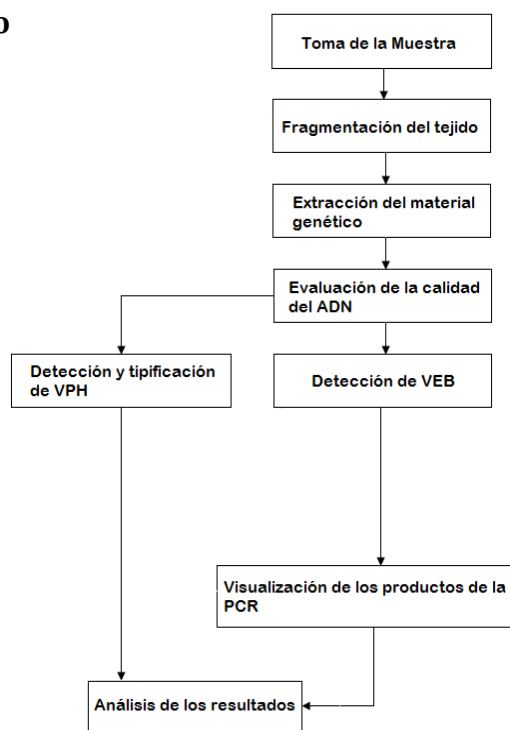


Figura 10. Esquema del plan de trabajo del proyecto.

5.7. Extracción del material genético:

El aislamiento del material genético fue realizado con el estuche comercial Pure Link™ Genomic DNA Kit de Invitrogen, siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

El tejido de las biopsias se cortó en pequeños fragmentos con hojas de bisturí estériles. Una vez cortadas, se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL junto a 180 µL de Pure Link™ Genomic Digestion Buffer y 20 µL de la proteínasa K (20 mg/mL). Se incubó en un Thermomixer a 56°C en agitación, durante toda la noche. Luego, se centrifugó a 20.000xg durante 3 minutos. Seguidamente, se añadieron 20 µL de RNAasa A y se mezcló brevemente en vórtex. Se dejó incubando a temperatura ambiente, durante 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 200 µL de Genomic Lysis/Binding Buffer y 200 µL de etanol (100%), se mezcló en vórtex durante 5 segundos. El lisado (440 µL aprox.) fue transferido a una columna con un tubo colector y se centrifugó a 6.000xg, durante 1 minuto. Luego, se descartó y se cambió el tubo colector. Se agregaron 500 µL de Wash Buffer 1 y se centrifugó a 6.000 xg, durante 1 minuto. La columna se transfirió a un tubo colector nuevo y seguidamente se añadieron 500 µL de Wash Buffer 2. Se centrifugó a 20.000 xg, durante 3 minutos. La columna se colocó en un Eppendorf de 1,5 mL nuevo y se agregaron 200 µL de Genomic Elution Buffer. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Finalmente, se centrifugó a 6.000 xg, durante 1 minuto. El eluato obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior estudio.

5.8. Evaluación de la calidad del ADN

Para garantizar la integridad del ADN genómico en posteriores análisis moleculares, es necesario evaluar su calidad, amplificando genes conservados en el genoma mediante iniciadores específicos, y de esta manera garantizar el buen análisis del material genético (van Dongen y col., 2003).

La evaluación de la calidad del ADN de todas las muestras se llevó a cabo con el protocolo de BIOMED-2, de Van Dongen y colaboradores (2003), el cual consta de 5 pares de iniciadores de genes de control, que amplifican productos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb, permitiendo evaluar la calidad del ADN y cuán apto está el mismo para ser amplificado mediante PCR. Los genes diana seleccionados en este protocolo fueron: el gen de la tromboxanosintasa humana (TBXS1), el gen activador de la recombinación (RAG1), el gen de la proteína de la leucemia promielocítica humana (PLZF) y el gen AF4 humano (AF4), el criterio de selección se basó en la presencia de marcos abiertos de lectura (ORFs) con exones de gran tamaño, para reducir el riesgo de seleccionar regiones polimórficas, según el protocolo de van Dongen y colaboradores 2003 (Tabla 4) (van Dongen y col., 2003).

En las tablas 4, 5 y 6 se muestran las secuencias de los iniciadores de cada uno de los genes utilizados, las condiciones de preparación de la mezcla y las condiciones de la reacción, respectivamente.

Tabla 4. Secuencias de iniciadores para la realización del protocolo de calidad de ADN, BIOMED-2.

GEN	FORWARD	REVERSE	TAMAÑO
AF4/exón 3 ^a	5'GGAGCAGCATTCCATCCAGC3'	5'CATCCATGGGCCGGACATAA3'	600
AF4/exón 11 ^a	5'CCGCAGCAAGCAACGAACC3'	5'GCTTTCCTCTGGCGGCTCC3'	400
PLFZ/exón 1 ^b	5'TGCGATGTGGTCATCATGGTG3'	5'CGTGTCATTGTCTGAGGC3'	300
RAG1/exón 2 ^c	5'TGTTGACTCGATCCACCCCA3'	5'TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA3'	200
TBXAS1/exón 9 ^d	5'GCCCAGCATTCTGCAAGTCC3'	5'GGTGTTCGCGGAAGGGTT3'	100

a: gen AF4 humano (AF4, exón 3, número de entrada en el Gene Bank: Z83679, exón 11, número de entrada en el Gene Bank: Z83687); b: gen de la leucemia promielocítica humana (PLZF, exón 1, número de entrada en el Gene Bank: AF060568); c: gen de activación de la recombinación humana (RAG1, exón 2, número de entrada en el Gene Bank: M29474); d: gen de la tromboxanosintasa humana (TBXAS1, exón 9, número de entrada en el Gene Bank: D34621).

Tabla 5. Condiciones de la mezcla para el protocolo BIOMED-2.

	CANTIDAD (µL)
dNTP's (100 mM)	0,1
Coctel de iniciadores (100 pM)	2
Buffer 10X	6,5
MgCl ₂ (50 mM)	2
Taq Polimerasa	0,6
H ₂ O	28,8
ADN	10
Volumen final	50

Tabla 6. Condiciones iniciales de la reacción para el protocolo BIOMED-2.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Pre-activación	95	7'	1
Desnaturalización	95	30"	x35
Hibridación	60	40"	
Extensión	70	40"	
Extensión final	70	15'	1
Mantenimiento	4	∞	

5.9. Detección y tipificación del genoma de VPH

La detección y el genotipaje de las secuencias de VPH, a partir de las biopsias de mama, para todos los grupos de estudio, se realizó utilizando el sistema SPF₁₀-LiPA (Short PCR Fragment-reverse line probe assay), el cual está diseñado para identificar 28 genotipos de VPH, clasificados en dos grupos basados en el riesgo oncogénico asociado al tipo de VPH. Los VPH de alto riesgo (VPH-AR) están constituidos por 15 genotipos, y los de VPH de bajo riesgo (VPH-BR) constituido por 7 genotipos. Los casos en estudio fueron clasificados en 3 grupos: 1) infectados con VPH-AR, 2) infectados con VPH-BR, 3) infectados con ambos tipos, VPH-AR y VPH-BR.

La identificación está basada en una amplificación del ADN mediante PCR, haciendo uso de un coctel de iniciadores biotinilados (SPF10) de amplio espectro, específicos para una porción de 65pb del marco abierto de lectura del gen *L1* (Tabla 7). Seguidamente, los amplificados biotinilados se desnaturalizan, y las hebras separadas, se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa, las secuencias hibridadas se observan mediante una reacción colorimétrica (Kleter y col., 1998; Else y col., 2011).

La amplificación del fragmento L1 de VPH por PCR se realizó utilizando el estuche de amplificación (INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra Amp*, Innogenetics). Las secuencias de los iniciadores, las condiciones de la mezcla y de la reacción se describen en las tablas 7, 8, 9.

Tabla 7. Secuencias de iniciadores para la realización de la SPF10 PCR.

GEN	FOWARD REVERSE	TAMAÑO (pb)
L1	SPF1A 5'GCiCAGGGiCACAATAATGG3' SPF2B-bio 5'GTiGTATCiACAACAGTAACAAA3'	65

Tabla 8. Condiciones de la mezcla para la reacción de amplificación, con el estuche INNO-Lipa HPV Genotyping *Extra Amp*, Innogenetics.

REACTIVO	CANTIDAD (µL) / tubo
Mezcla de amplificación	37,7
Mezcla enzimática	2,3
Muestra	10
Volumen final	50

Tabla 9. Condiciones de la reacción de amplificación, con el INNO-Lipa HPV Genotyping *Extra Amp*, Innogenetics.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Descontaminación	37	10´	x1
Desnaturalización	94	9´	x1
Desnaturalización	94	30´´	
Hibridación	52	45´´	x40
Extensión	72	45´´	
Mantenimiento	72	∞	

La detección y tipificación de los 28 genotipos de VPH fue llevada a cabo con el estuche INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra* (Innogenetics), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, descritas a continuación.

Previamente se precalentó la solución de hibridación y la solución de lavado astringente a 49 °C. Se rotularon las tiras de nitrocelulosa con números seriados, incluyendo una tira para el control negativo (sin ADN) y control positivo (ADN VPH). Se agregaron 10 µL de la solución de desnaturalización en la esquina superior de cada

cubeta. Se añadieron 10 μ L del producto amplificado, se mezcló bien y se dejó reposar por al menos 5 minutos. Se añadieron 2 mL de la solución de hibridación, se colocaron las tiras en las cubetas y fueron llevadas a un baño de agua a 49 °C durante 1 hora. Se agitaron frecuentemente. Con una bomba de vacío se aspiró la solución de hibridación. Se añadieron 2 mL de solución de lavado astringente y se agitó cuidadosamente, durante 20 segundos. Se aspiró y se repitió este paso una vez más. Se añadieron 2 mL de esta solución y se llevó al baño de agua, durante 30 minutos. Se preparó la solución de lavado, mezclando 20 ml de solución con 60 mL de agua destilada, para 10 tiras; y la de conjugado, mezclando 200 μ L de conjugado y se enrasó a 20 mL con el diluyente de conjugado, para 10 tiras. Se lavó cada tira con 2 mL de solución de lavado, durante 1 minuto. Se aspiró la solución y se repitió el procedimiento. Se añadieron 2 mL de solución de conjugado a cada tira y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación leve. Se preparó la solución del sustrato, mezclando 200 μ L de sustrato y se enrasó a 20 mL con el buffer sustrato, para 10 tiras. Se lavó cada tira con 2 mL de solución de lavado, durante 1 minuto. Se aspiró la solución y se repitió el procedimiento. Se lavó cada tira con 2 mL de buffer sustrato, durante 1 minuto. Se aspiró la solución. Se añadieron 2mL de solución sustrato y se incubó a temperatura ambiente, durante 30 minutos, en agitación leve. Se detuvo el revelado con varios lavados de agua destilada.

5.10. Detección del genoma de VEB.

La detección de VEB se realizó con el estuche comercial Epstein-Barr virus BMLF1 de Maxim Biotech, Inc., siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Los iniciadores que se utilizaron se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Iniciadores usados para la amplificación del ADN de VEB.

GEN	INICIADORES
BMLF1	5'oligo CTT GGA GAC AGG CTT AAC CAG ACT CA
	3'oligo CCA TGG CTG CAC CGA TGA AAG TTA T

En las tablas 11 y 12 se muestran las condiciones de la mezcla y de la reacción, respectivamente.

Tabla 11. Condiciones de la mezcla de la PCR, para detectar VEB.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)
Master Mix	40
Taq Polimerasa	0,2
ADN	10
Volumen final	50,2

Master mix: contiene los iniciadores premezclados, buffer, dNTP's, MgCl₂.

Tabla 12. Condiciones de la reacción, para la detección de VEB.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Pre-activación	96	1'	1
Desnaturalización	94	1'	x35
Hibridación	58	1'	
Extensión	72	1'	
Extensión final	72	10'	1
Mantenimiento	4	∞	

Se consideraron positivas sólo aquellas muestras en las que se observa una banda de 265pb.

5.11. Electroforesis en geles de agarosa:

Los productos de amplificación de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, con buffer TBE1Xstock de 10X de Invitrogen: 1.0mM Tris base, 0.9mM Borato y 0.01mM EDTA, pH 8.0) y se tiñeron con SYBR SAFE (Invitrogen). El

registro fotográfico se realizó con un fotodocumentador ChemicDoc XRS (BioRad), donde se observó cualitativamente el ADN, comparando su tamaño (en pares de bases) con el del marcador de peso molecular. De acuerdo al tamaño conocido del fragmento de ADN estudiado se determinó la presencia o ausencia de la muestra.

Las condiciones para la preparación del gel de agarosa se encuentran en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones para preparar geles de agarosa 2% para la visualización de las moléculas de ADN de los productos de PCR.

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer TBE 1X	40 mL
Agarosa	0,8 gr
SYBR SAFE	3 μ L

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos se realizó una prueba Chi-cuadrado para evaluar la dependencia de las variables con el programa Excel de Microsoft Office 2010. Valores de p menores o iguales a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Descripción General

7.1.1. Población de estudio

Se tomaron muestras de 44 pacientes que asistieron a la consulta del Servicio de Ginecología del HUC, en el período comprendido entre abril 2014 a mayo 2015. Las muestras fueron tomadas durante el proceso quirúrgico en la sala operatoria, mientras las pacientes estaban bajo anestesia general y monitorización continua, siguiendo las medidas de asepsia y antisepsia correspondientes. El total de casos evaluados presentó un promedio de edad de 43,68 años (rango 17- 86), de las cuales 22 corresponden a pacientes con carcinoma mamario en diferentes estadios y 22 pacientes con diagnóstico de patología mamaria benigna.

La población de pacientes incluidas en este estudio fue seleccionada en base al diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma mamario y patologías benignas, como fibroadenomas, mastitis abscedadas, fístula periareolar y mamas supernumerarias. En la tabla 14 se muestra el total de muestras recolectadas según los grupos de estudio.

Tabla 14. Total de muestras recolectadas durante el periodo de abril 2014 a mayo 2015, divididas según grupos de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	NÚMERO DE MUESTRAS POR GRUPO	TOTAL DE MUESTRAS
GRUPO 1	Carcinoma mamario, estadio 0	2	22
	Carcinoma mamario, estadio I	4	
	Carcinoma mamario, estadio II	14	
	Carcinoma mamario, estadio III	1	
	Carcinoma mamario, estadio IV	1	
GRUPO 2	Fibroadenomas	16	22
	Mastitis abscedadas	3	
	Fístulas periareolar	2	
	Mama supernumerarias	1	
Total de muestras			44

El promedio de edad de las pacientes con carcinoma mamario fue de 58 años de edad (rango 30-86), mientras que el promedio de las pacientes con patología benigna fue de 29,4 años (rango 14-50). En cuanto, al promedio de la menarquia fue de 12,5 años (rango 9-17) para ambos grupos de estudio. Las pacientes con cáncer de mama en promedio afirmaron haber tenido 1,85 parejas sexuales (rango 1-4), y las pacientes con patología benigna en promedio afirmaron haber tenido 1,73 parejas sexuales (rango 0-5). El promedio de embarazos a término para las pacientes con cáncer de mama fue de 3,14 embarazos (rango 0-9) y para las pacientes con patología benigna fue de 1,32 embarazos (rango 0-6).

En la tabla 15 se muestran los datos clínicos de las pacientes seleccionadas para ambos grupos de estudio. Los datos clínicos detallados son uso de anticonceptivos orales (ACO), hábitos tabáquicos y alcohólicos, y antecedentes familiares de cáncer, donde cabe destacar que, a pesar de que el 63,3% del grupo de pacientes con cáncer

de mama presentaron un antecedente familiar con algún tipo de cáncer, solo el 31,8% correspondió a cáncer de mama.

Tabla 15. Resumen de datos clínicos, tanto en pacientes con carcinoma mamario (grupo 1), como de pacientes con patología benigna (grupo 2).

		Nº de pacientes (%)	
		GRUPO 1	GRUPO 2
Anticonceptivos Orales	Si	10 (45,5)	16 (72,7)
	No	12 (54,5)	6 (27,3)
Tabaco	Si	7 (31,8)	5 (22,7)
	No	15 (68,2)	17 (77,3)
Alcohol	Si	3 (13,6)	13 (59,1)
	No	19 (86,4)	9 (40,9)
Historia familiar de cáncer		14 (63,6)	12 (54,5)

En las figuras 11 y 12 se muestra la distribución de las muestras seleccionadas, según el estadio tumoral y el diagnóstico histopatológico, respectivamente. Del total de muestras de cáncer de mama, el 63,6% correspondió a pacientes con tumores en el estadio II, seguido del estadio I, con un 18,2%. En cuanto al diagnóstico histopatológico, los tumores de mama recolectados fueron del tipo carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante y carcinoma papilar infiltrante, siendo el carcinoma ductal infiltrante el que se presentó con mayor frecuencia en el grupo, con 68,2%.

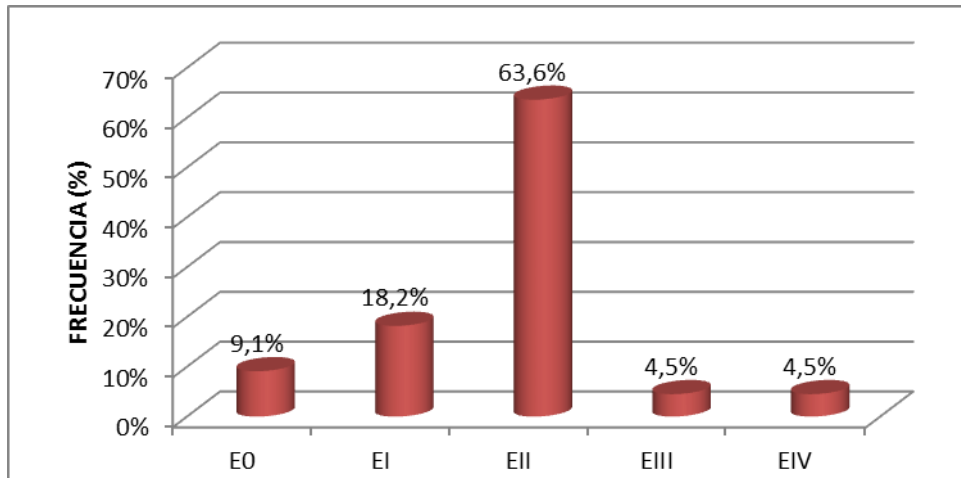


Figura 11. Distribución de las muestras seleccionadas, según el estadio tumoral. E0: estadio 0, EI: estadio I, EII: estadio II, EIII: estadio III, EIV: estadio IV.

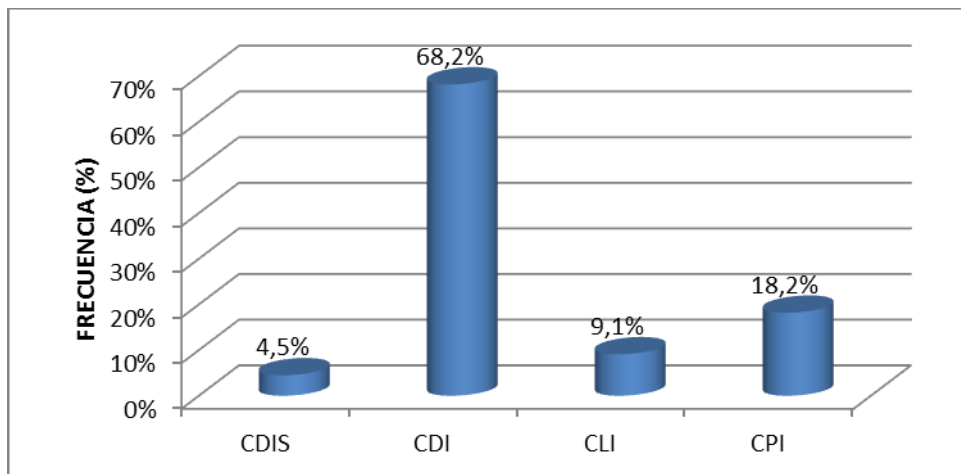


Figura 12. Distribución de las muestras seleccionadas, según el diagnóstico histopatológico. CDIS: carcinoma ductal *in situ*, CDI: carcinoma ductal infiltrante o invasivo, CLI: carcinoma lobulillar infiltrante, CPI: carcinoma papilar infiltrante.

El cáncer de mama es clasificado dentro de varios subtipos moleculares basados en la tinción inmunohistoquímica diferencial para el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor de crecimiento epidérmico humano 2 HER2 y Ki67. Al revisar los reportes de inmunohistoquímica incluidos en la historia clínica de las pacientes, encontramos el patrón expresión diferencial de estos biomarcadores proteicos en los diferentes subtipos de cáncer de mama. En la figura

13, se muestra un gráfico de barras con la distribución de las pacientes con cáncer de mama, de acuerdo a su perfil de expresión de los receptores hormonales. Donde se obtuvo que el 36% de los casos presentaron carcinoma mamario de tipo luminal A, 27% tanto luminal B HER2+, como luminal B HER2- y 9% basales.

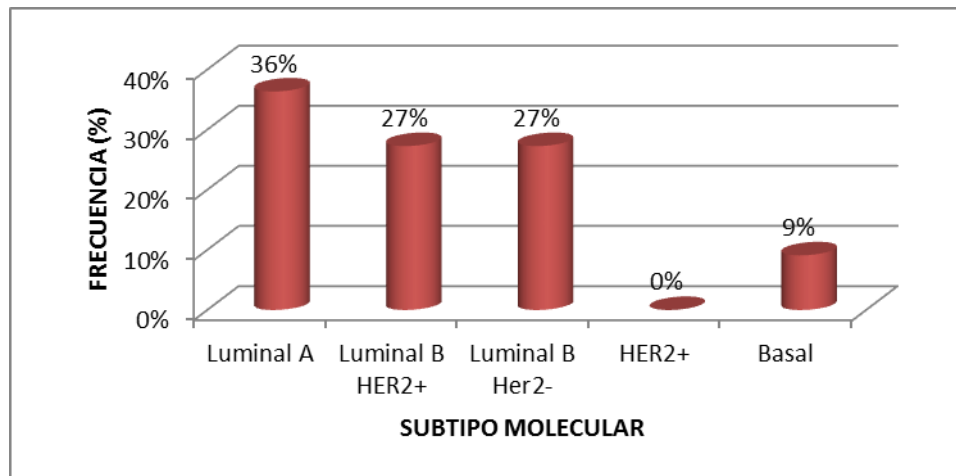


Figura 13. Distribución de las pacientes de acuerdo la expresión de los receptores moleculares.

7.2. Procesamiento de las muestras:

7.2.1. Evaluación de la calidad del ADN

Para la obtención del material genético se trabajó con 22 biopsias de tejido mamario tumoral y 22 biopsias de tejido mamario sano, realizándose una extracción basada en una lisis alcalina. Posterior a la extracción del ADN, se evaluó la calidad del mismo mediante el protocolo de BIOMED-2 (van Dongen y col., 2003), para la amplificación, mediante una PCR múltiple de cinco genes control (Tabla 4). En la figura 14 se muestra un gel representativo de sólo 9 muestras evaluadas, sin embargo todas las muestras mostraron integridad en el ADN, indicando que el material genético obtenido de la extracción, estaba en condiciones óptimas para la posterior detección

de VPH y VEB, evitando falsos negativos, tanto en los casos con cáncer, como en los tumores benignos.

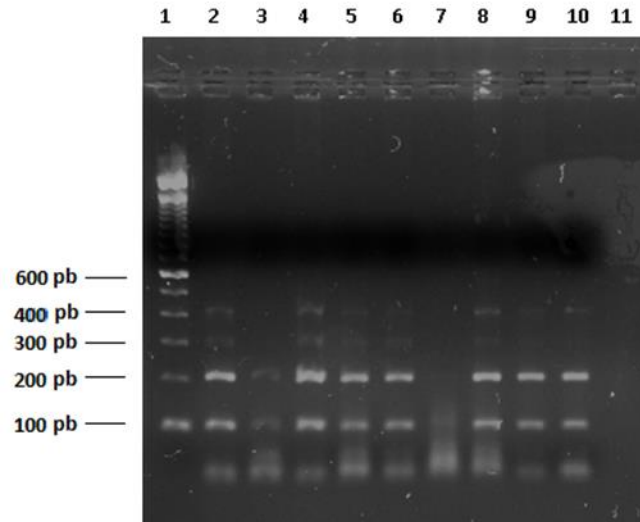


Figura 14. Registro fotográfico del gel de agarosa teñido con SYBER-SAFE para la visualización de la calidad del ADN extraído de todas las muestras. 1) Marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen), 2-10) ADN de las muestras estudiadas, 11): control negativo (sin ADN).

7.2.2. Detección y tipificación de VPH en las pacientes de los grupos de estudio

Luego de verificar la calidad del ADN, se realizó la detección y genotipificación mediante el uso del estuche comercial *INNOLIPA Genotyping Extra*, obteniendo 14 de 22 muestras de cáncer de mama positivas para ADN de VPH, representando el 63,6%, mientras que en las muestras de tejido sano sólo se detectó ADN de VPH en una muestra, representado el 4,5% de todas las pacientes con patología benigna evaluadas (Figura 15).

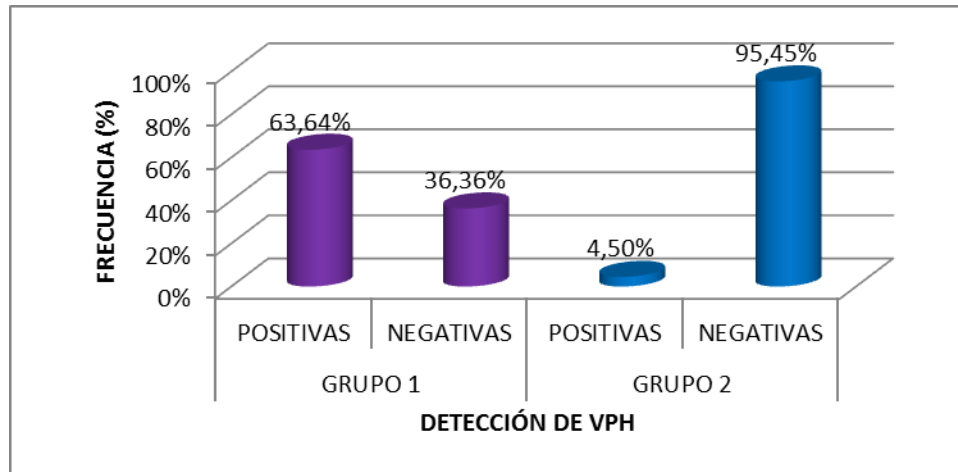


Figura 15. Gráfico de barra donde se representa la frecuencia de infección de VPH detectada en los dos grupos de estudio. Grupo 1: cáncer de mama; grupo 2: patología benigna.

El promedio de edad de las pacientes con algún tipo de carcinoma mamario positivas para VPH fue de 58,6 años (rango 47-86) ($p=0,985$), el promedio de edad de la menarquia fue de 12,4 (rango 9-16) ($p=0,480$), el promedio de número de partos fue de 3,6 (rango 0-9) ($p=0,719$) y el promedio de parejas que afirmaron haber tenido fue de 1,9 (rango 1-4) ($p=0,938$), encontrando que no existe una asociación significativa entre la presencia de VPH con ninguna de las características demográficas. Mientras que la paciente de patología benigna, diagnosticada con mastitis abscedada, tenía 34 años de edad con menarquia a los 12 años de edad y no había tenido ningún embarazo hasta el momento del estudio. En la figura 16 se presentan la frecuencia de casos positivos para VPH según las características clínicas de las pacientes con carcinoma mamario, tales como: antecedentes ginecológicos como el consumo de anticonceptivos orales en algún momento ($p=0,225$), si consumían alcohol y/o tabaco ($p=0,604$, $p=0,344$, respectivamente), y si presentaban antecedentes familiares de cáncer ($p=0,933$), donde podemos observar que el 64,29% de las pacientes positivas

para el ADN de VPH tenían historial de al menos un familiar con cáncer, de los cuales el 55,56% correspondían con antecedentes de cáncer de mama.

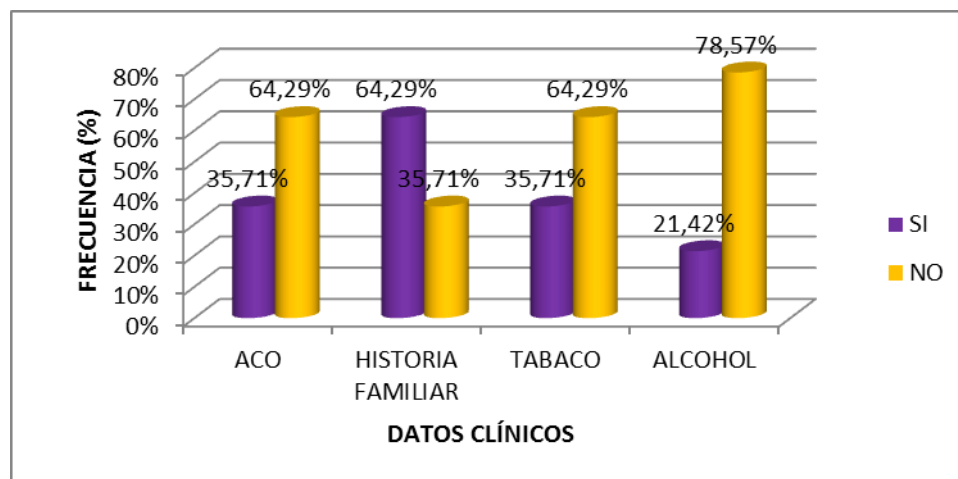


Figura 16. Gráfico de barras donde se representa los datos clínicos de las pacientes con cáncer de mama, positivas para VPH. ACO: consumo de anticonceptivos orales.

En cuanto a las características patológicas de las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, encontramos que el 50% de los casos fueron positivos para la prueba del ganglio centinela, es decir, tenían al menos un ganglio metastásico a nivel axilar ($p=0,197$). En la figura 17 se muestra el porcentaje de pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, de acuerdo al tamaño del tumor. Se puede observar que la mayor proporción de tumores positivos para VPH (54%) se encontró en aquellos clasificados como T2, el cual se ubica en el rango >20 mm y ≤ 50 mm, en su mayor dimensión, aunque esta asociación no fue estadísticamente significativo ($p=0,774$).

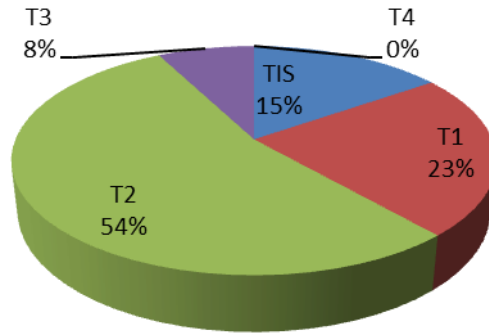


Figura 17. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, según el tamaño del tumor.

Al correlacionar la presencia de VPH en los tumores mamarios en las pacientes con cáncer de mama, de acuerdo a los estadios de la enfermedad (Figura 18), podemos observar que el estadio más frecuente en las pacientes con cáncer de mama fue el estadio II con 65% del total, sin embargo no hubo relación estadísticamente significativa ($p=0,721$).

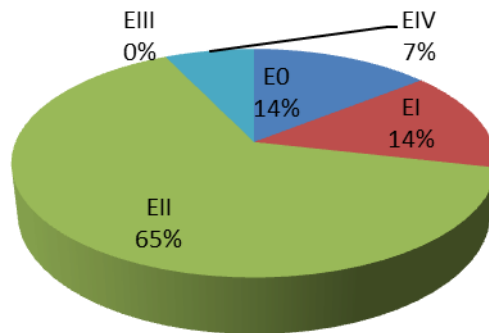


Figura 18. Frecuencia de VPH en los tumores mamarios, según los estadios de cáncer de mama.

En la figura 19, se muestra una gráfica de la frecuencia con que se encuentra cada subtipo molecular de cáncer de mama en las muestras positivas para VPH, donde el

35,7% de los casos correspondió a pacientes, tanto con el subtipo luminal A, como con el subtipo luminal B HER2-, es decir expresan RE+ y RP+ en la superficie celular.

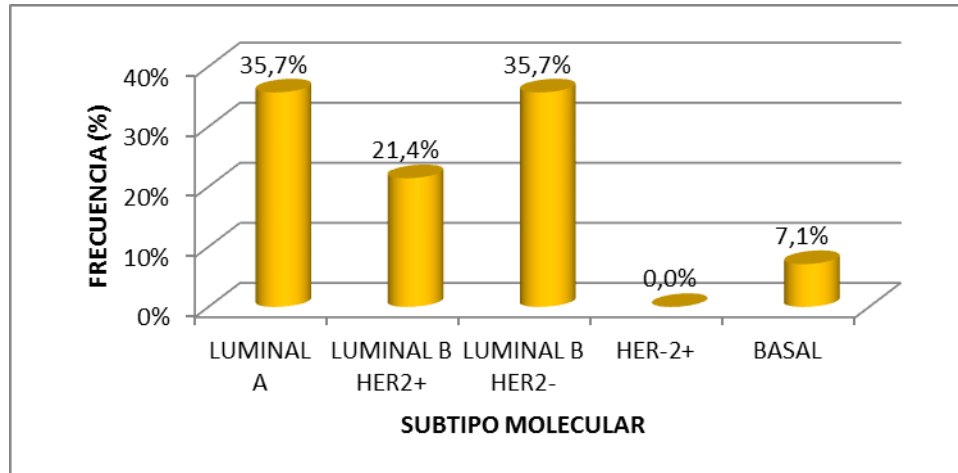


Figura 19. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH, según el subtipo molecular.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado de Pearson, para correlacionar los casos de cáncer de mama VPH positivos con los subtipos moleculares, encontramos que no existe una asociación significativa con ninguno de los subtipos moleculares ($p=0,647$).

Luego de detectar el genoma de VPH y evaluar las características clínico-patológicas de las pacientes positivas para este virus, se realizó la identificación de los genotipos virales de VPH encontrados en las pacientes. En la figura 20 se muestra una imagen representativa de 18 muestras de total de casos evaluados, obtenido en la tipificación de VPH mediante el estuche comercial *INNOLIPA Genotyping Extra*, donde en la tira 1 y 20 se encuentran los controles negativos y positivos, respectivamente, y en las tiras 2-19 se encuentran las muestras de cáncer de mama.

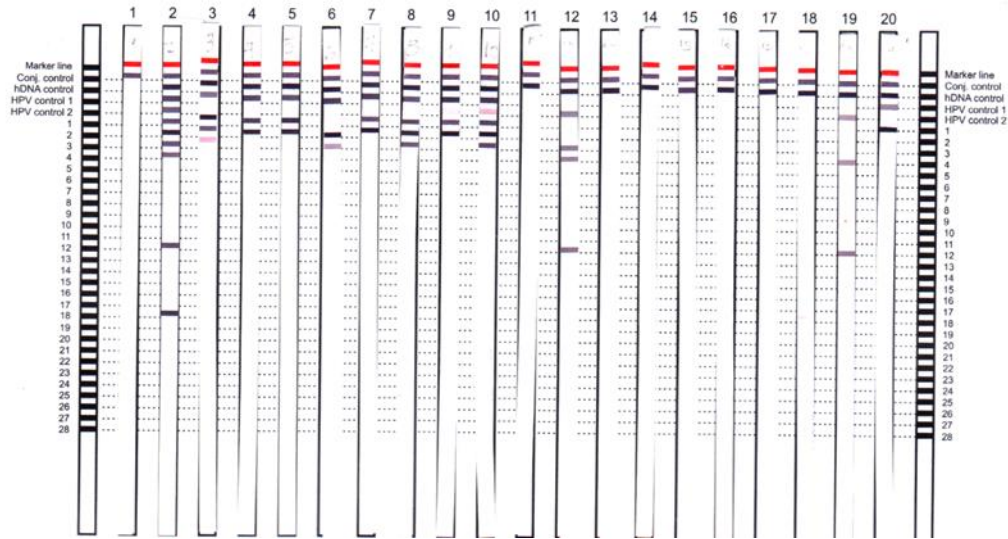


Figura 20. Tiras de nitrocelulosa de 18 muestras, utilizadas para la genotipificación de VPH mediante 28 sondas específicas. 1) Control negativo; 2) VPH 6, 11, 16, 18, 52; 3) VPH 6, 11, 16, 4) VPH 6, 11, 16; 5) VPH 6, 11; 6) VPH 11, 16; 7) VPH 6, 11; 8) VPH 6, 11, 16; 9) VPH 6, 11; 10) VPH 6, 11, 16; 11) negativo; 12) VPH-16, 18; 13-17) negativo; 18) VPH 52; 19) VPH-18; 20) control positivo VPH 6.

Dentro de las 14 muestras positivas se encontraron infecciones únicas y mixtas con los genotipos de alto riesgo oncogénico 16, 18, 52, 56, y de bajo riesgo 6 y 11. Los tipos más frecuentes fueron el 6 y 11 con 27,27% cada uno, seguidos por el tipo 16 con 21,21%. En cuanto a la paciente con patología benigna infectada por VPH, se identificó el genotipo viral de alto riesgo oncogénico VPH-33. En la figura 21 se puede observar un gráfico de barras con la frecuencia de cada uno de los genotipos de VPH encontrados en las pacientes con cáncer de mama.

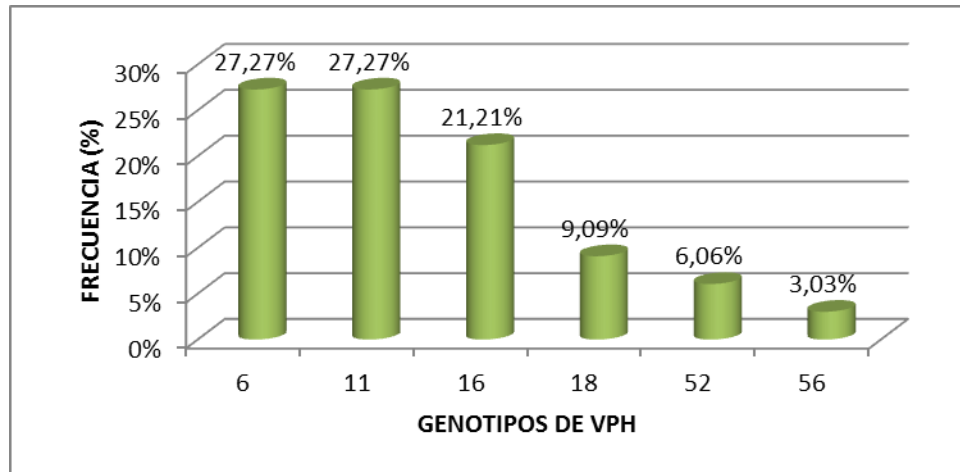


Figura 21. Frecuencia de los genotipos de VPH en las biopsias tumorales de las pacientes con carcinoma mamario.

Además, siguiendo la clasificación de VPH según el genotipo viral reportado, en este trabajo se agruparon los tipos de VPH de acuerdo a su riesgo oncogénico asociado al desarrollo de varios tipos de carcinomas, en la figura 22 se observa una representación gráfica de la frecuencia de infección de los genotipos de alto y bajo riesgo, encontrados en ambos grupos de estudio. Se obtuvo que 28,57% de las pacientes con cáncer de mama presentó infección única por genotipos de alto y bajo riesgo, respectivamente, y el 42,90% de las pacientes presentó coinfección por ambos grupos de genotipos. En cuanto a la muestra de tejido sano positiva para ADN de VPH, se encontró que era de alto riesgo oncogénico.

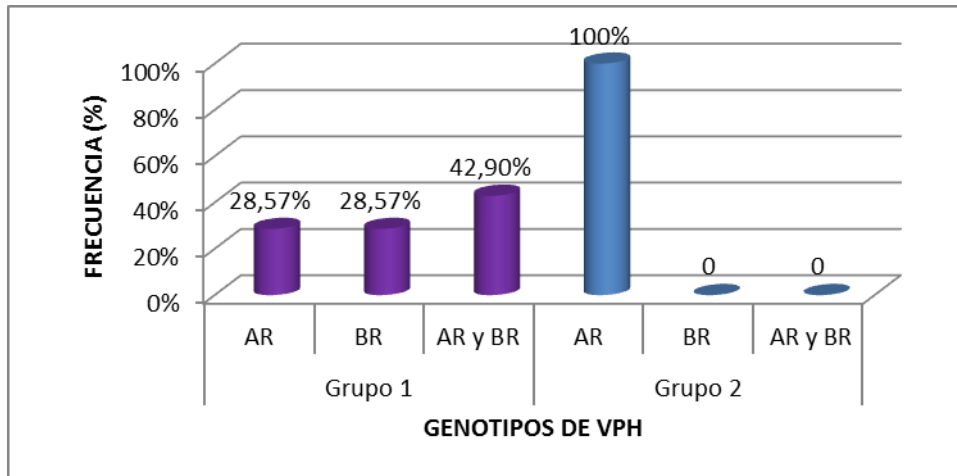


Figura 22. Frecuencia de infección de genotipos de alto y bajo riesgo encontrada en ambos grupos de estudio. Grupo 1: Pacientes con cáncer de mama, grupo 2: pacientes con patología benigna. AR: alto riesgo oncogénico, BR: bajo riesgo oncogénico, AR y BR: Coinfección por ambos genotipos virales.

7.2.3. Detección de VEB en las pacientes de los grupos de estudio

La detección de VEB fue realizada con el estuche comercial de Maxim Biotech, Inc., y los amplificadores fueron observados en un gel de agarosa. En la figura 23 se muestra un gel representativo de las muestras evaluadas para VEB. Dentro del grupo de los casos con cáncer, se detectó la presencia del genoma de VEB en 3 de las 22 muestras evaluadas, representando 13,6% de infección, y en las muestras tejido sano se detectó el ADN de VEB en sólo una muestra, representado el 4,5% del total (Figura 24).

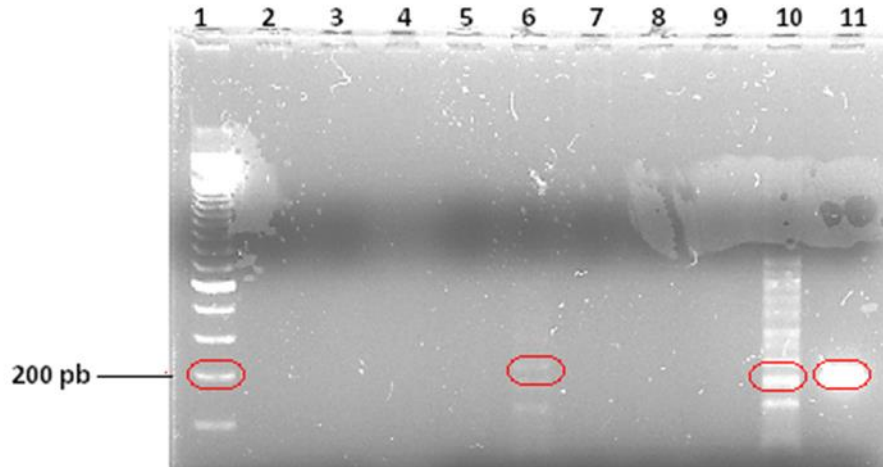


Figura 23. Detección del virus Epstein Barr mediante PCR. 1) Marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen), 2) Control negativo, 3-10) Muestras en estudio, 11) Control positivo.

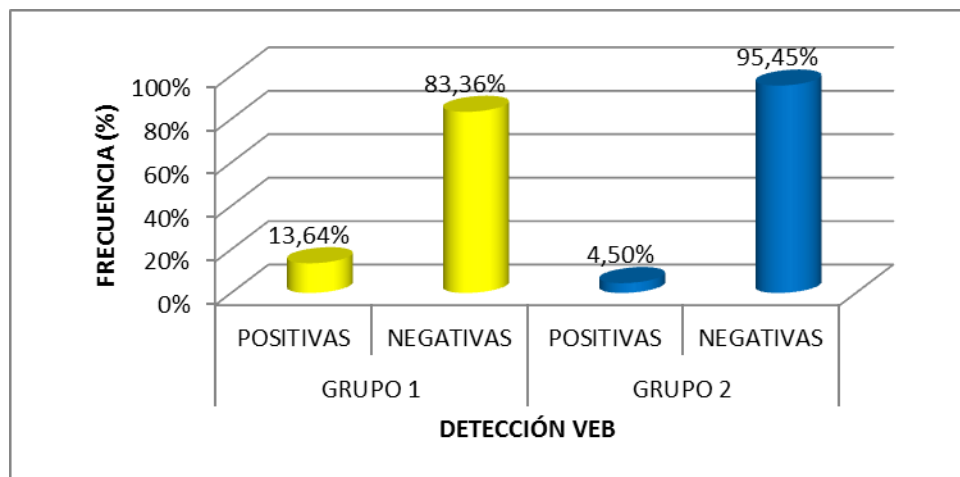


Figura 24. Gráfico de barra donde se representa la frecuencia de infección de VEB detectada en los dos grupos de estudio. Grupo 1: cáncer de mama; grupo 2: patología benigna.

El promedio de edad de las pacientes con cáncer de mama que presentaron infección por VEB fue de 62 años de edad (rango 55-68), la edad de la menarquia en promedio fue de 12 años (rango 11-13), el promedio de partos que afirmaron tener las pacientes fue de 3 (rango 0-6), y el promedio de parejas que habían tenido hasta el momento de estudio fue de 1,3 parejas (rango 1-2), sin encontrarse ninguna relación

estadísticamente significativa. En la figura 25 se muestra la frecuencia de casos positivos para VEB, según algunas características clínicas de las pacientes con cáncer de mama, donde se puede observar que el 66,7% de las pacientes positivas para VEB, presentaron antecedentes de cáncer en su familia.

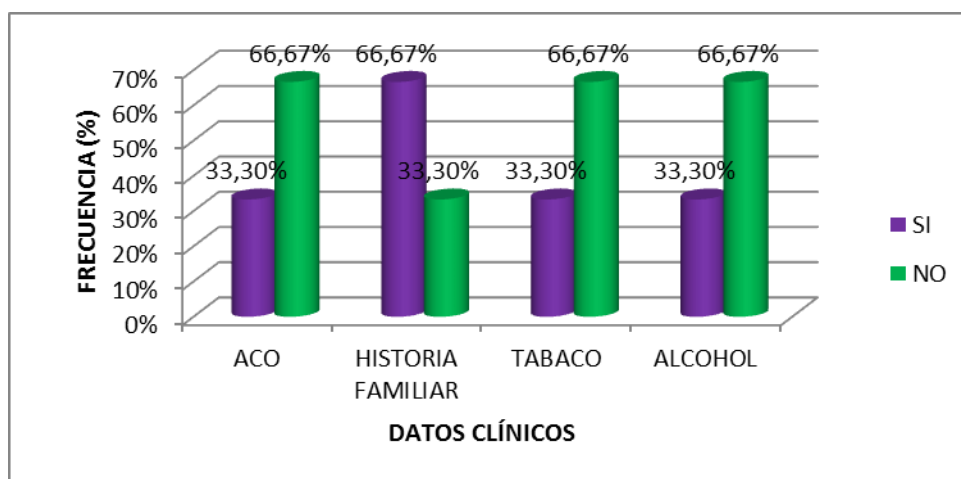


Figura 25. Gráfico de barras donde se representa los datos clínicos de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VEB. ACO: consumo de anticonceptivos orales.

Con respecto a las características patológicas de las pacientes con cáncer de mama infectadas por este virus, encontramos que ninguna de las pacientes presentó afección ganglionar, es decir no presentaron ganglios axilares metastásicos. En las figuras 26 y 27 se muestran el porcentaje de pacientes con algún tipo de carcinoma mamario positivas para VEB, de acuerdo al tamaño del tumor y el estadio del carcinoma. La mayor proporción de tumores positivos para VEB correspondió al tamaño T1, ubicado en el rango de ≤ 20 mm en su mayor dimensión, con 67%. En el caso de los estadios, el grupo positivo para VEB se ubicó con mayor frecuencia en el estadio I, con 67%, encontrándose que no existe asociación significativa entre estas variables y la presencia de VEB.

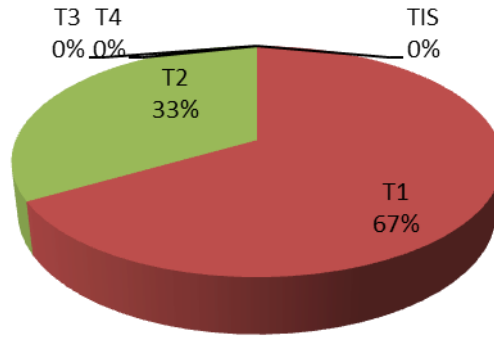


Figura 26. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VEB, según el tamaño del tumor.

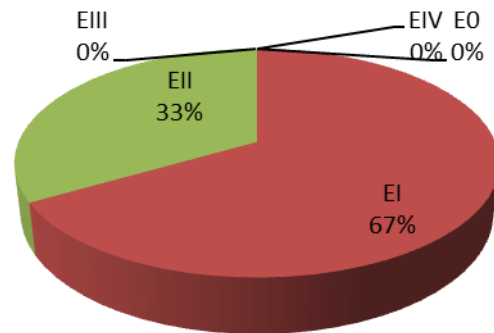


Figura 27. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VEB, según el estadio tumoral.

En la figura 28, se muestra una gráfica de la frecuencia con que se encuentra cada subtipo molecular de cáncer de mama en las muestras positivas para ADN de VEB, donde se puede observar que tanto los tumores luminal A, luminal B HER2+ y luminal B HER2- se presentaron en 1 de las 3 (33,33%) pacientes con cáncer de mama positivas para VEB, es decir expresan receptores de estrógenos (RE+) y receptores de progesterona (RP+) en la superficie celular.

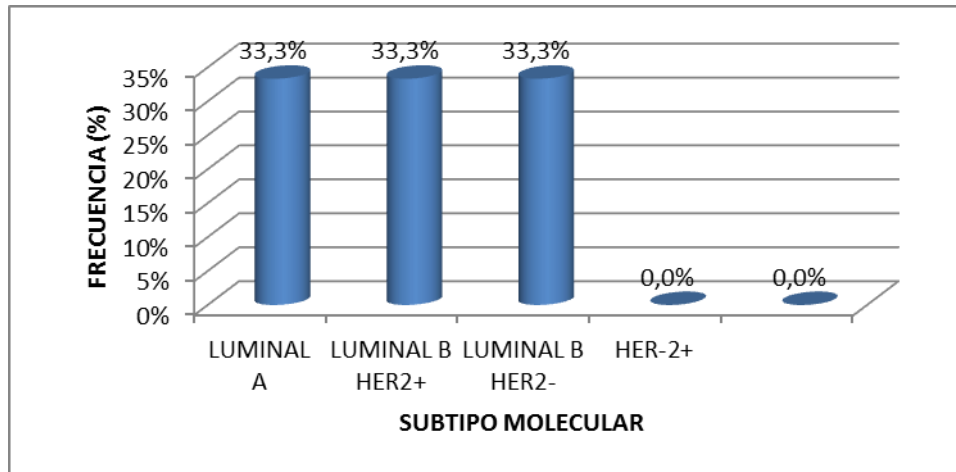


Figura 28. Distribución de las pacientes con cáncer de mama positivas para VEB, según el subtipo molecular. S/C: sin clasificación.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado de Pearson, para correlacionar los casos de cáncer de mama VEB positivos con los subtipos moleculares, encontramos que no existe una asociación significativa con ninguno de los subtipos moleculares ($p=0,936$).

7.2.4. Coinfección viral en las pacientes de los grupos de estudio

Al revisar las pacientes con cáncer de mama infectadas con ambos virus (VPH y VEB) se observó que en las tres pacientes que presentaron ADN de VEB, también se detectó la presencia del ADN de VPH, correspondiendo al 13,6% de todas las pacientes con carcinoma mamario evaluadas. En el caso del grupo de patología benigna, la coinfección entre ambos virus fue del 100%, correspondiendo a una paciente con diagnóstico de mastitis abscedada, encontrando que no existe relación estadísticamente significativa entre la presencia de ambos virus y el cáncer de mama ($p=0,344$).

7.2.5. Distribución geográfica de las pacientes con cáncer de mama evaluadas

Las pacientes fueron agrupadas en cinco regiones geográficas, según la clasificación propuesta por Sánchez y colaboradores (2012), dentro de las cuales se encuentran los 24 estados venezolanos, ordenados de la siguiente manera: 1) Región capital: Distrito capital, Miranda y Vargas, 2) Región de los Andes y región Zuliana: Mérida, Táchira, Trujillo, Barinas y Zulia, 3) Región centro-occidental: Lara, Falcón, Yaracuy y Portuguesa, 4) Región de los llanos: Aragua, Carabobo, Cojedes, Guárico y Apure, 5) Región nororiental y región de Guayana: Anzoátegui, Monagas, Sucre, Nueva Esparta, Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro. En la figura 29 se muestra la distribución geográfica de donde provenían las pacientes con cáncer de mama evaluadas, donde se observa que el 50% de la población evaluada en este estudio son provenientes de la región capital.

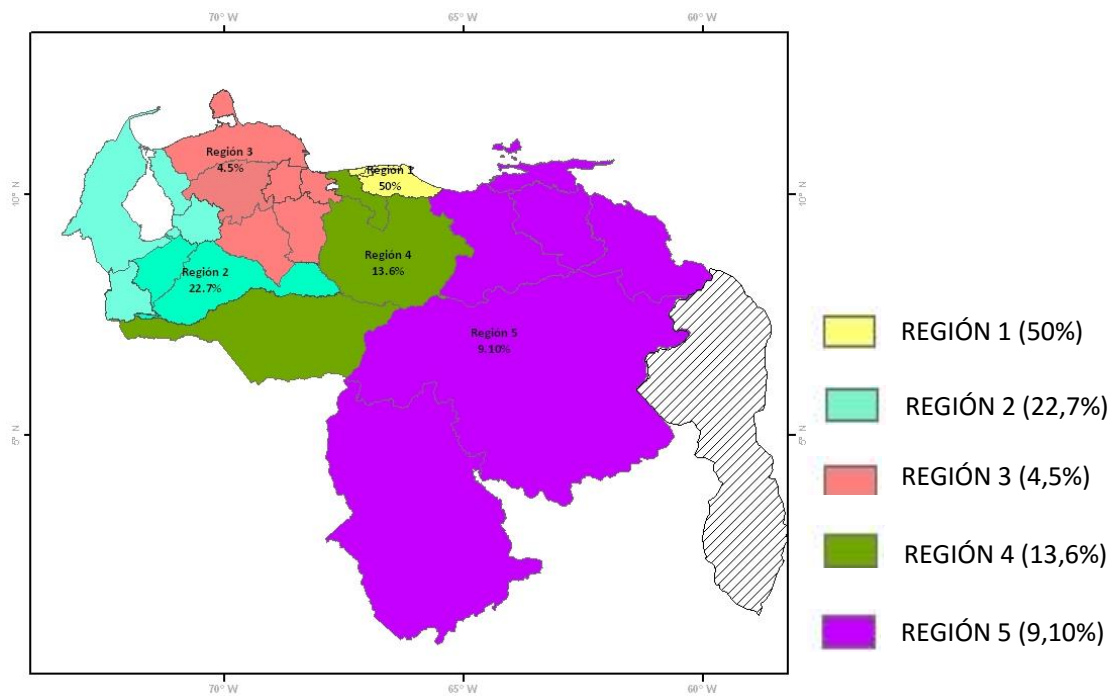


Figura 29. Distribución de las pacientes con cáncer de mama por regiones geográficas.

En las figuras 30 y 31 se muestran las frecuencias de infección de VPH y VEB en las pacientes con carcinoma mamario evaluadas, por regiones geográficas en Venezuela, respectivamente. Observamos que la mayor frecuencia para ambos virus se presentó en la región 1, la cual corresponde a la región capital, con un 43% y 66,7%, para VPH y VEB, respectivamente, encontrado que no existe relación estadísticamente significativo ($p=0,598$).

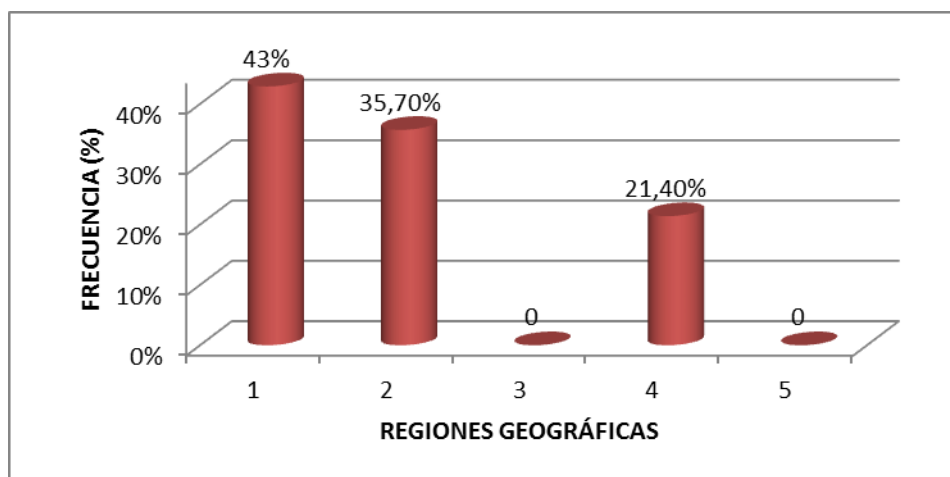


Figura 30. Distribución de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VPH, según regiones geográficas.

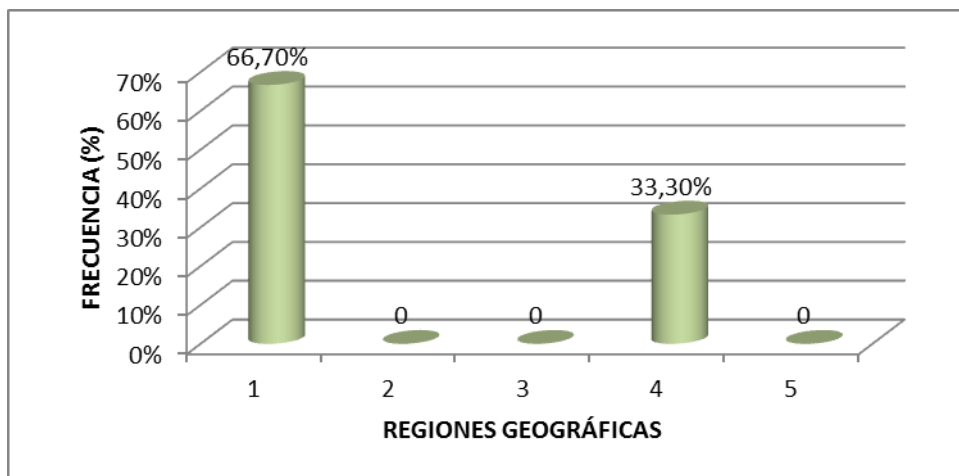


Figura 31. Distribución de las pacientes con cáncer de mama, infectadas por VEB, según regiones geográficas.

Por último, se evaluó la distribución de los genotipos de VPH, permitiéndonos observar la frecuencia de cada tipo viral en regiones específicas de Venezuela (Figura 32). El genotipo de alto riesgo más frecuente encontrado en la región capital fue VPH tipo 16 con 42,9%; en la región 2 (región de los Andes y región Zuliana) del país se observó mayor frecuencia de VPH tipo 52 (100%) y tipo 18 (66,7%). En la región de los Llanos se encontró mayor prevalencia de VPH tipo 56, con 100%. En cuanto a las pacientes provenientes de las regiones 3 y 5 evaluadas todas fueron negativas para VPH.

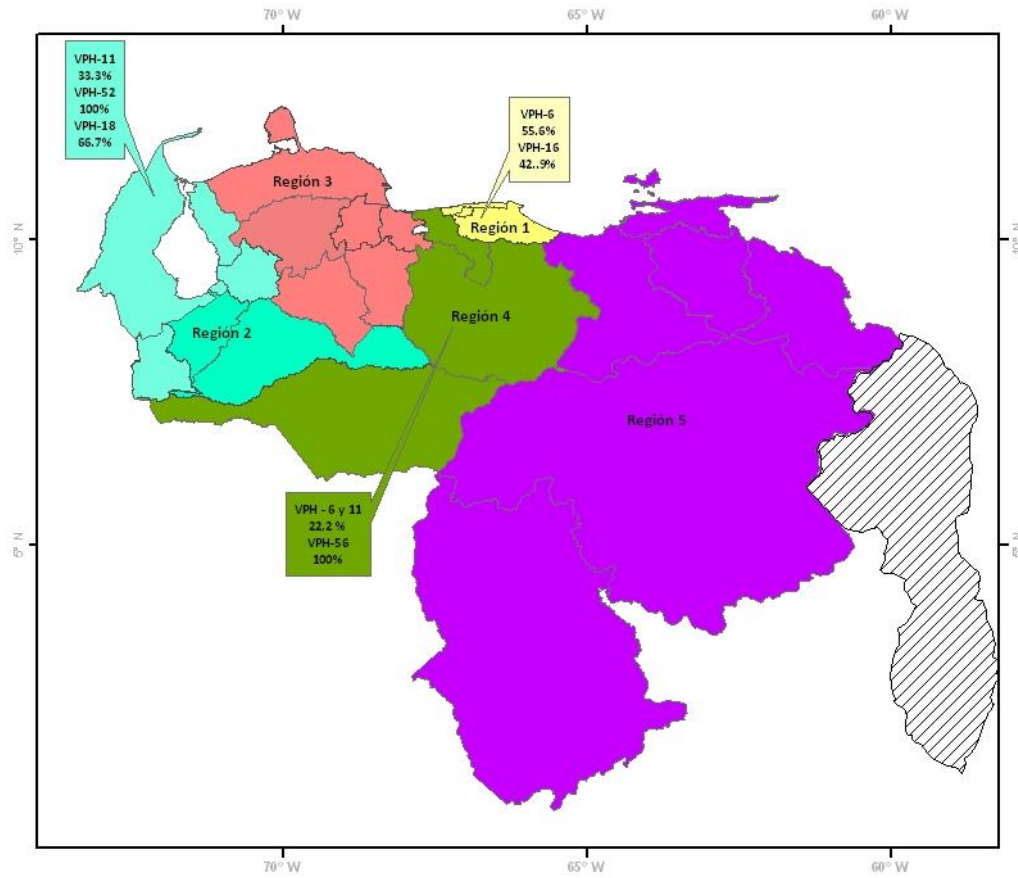


Figura 32. Distribución de los genotipos de VPH más frecuente por región geográfica.

8. DISCUSIÓN

El cáncer de mama se ha convertido en un preocupante problema de Salud Pública en la población femenina a nivel mundial, registrándose un incremento considerable en el número de casos cada año, en países desarrollados. Sin embargo, países de Latinoamérica entre ellos Venezuela, carecen de técnicas de diagnóstico y tratamientos de prevención temprana, en todo el territorio nacional, que eviten el avance del cáncer de mama a estadios de mayor riesgo en la población femenina afectada, principalmente en la población de estratos socioeconómicos bajos. El cáncer de mama es el segundo cáncer más frecuente en el mundo, según cifras de la IARC en el año 2012 representó el 25% de todos los tipos de cáncer diagnosticados a nivel mundial. En nuestro país, según el MPPS, para el año 2012 el cáncer de mama fue la primera causa de muerte oncológica en la población femenina entre 45 y 65 años, reportándose 2.067 muertes en todas las edades (18,25% del total de muertes por cáncer). Además, según cifras reportadas por la Sociedad Anticancerosa de Venezuela, en el año 2010, se registraron 4.073 nuevos casos de cáncer de mama; con una tasa de 29,78 por cada 1.000.000 mujeres.

Por otro lado, el origen de esta enfermedad no está completamente claro y los factores asociados al desarrollo de esta carcinogénesis son numerosos, por lo tanto, en la mayoría de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama se desconoce el origen etiológico de esta enfermedad.

Muchos agentes virales se han considerados causantes del desarrollo de distintos tipos de cáncer humanos. En los últimos 30 años, se ha encontrado considerable

evidencia que afirma una fuerte asociación entre agentes infecciosos, particularmente virus, y el desarrollo de algunos tipos de cáncer. El total de infecciones atribuibles a cáncer, estimadas en el año 2002 es de 1,9 millones de casos, representando el 17,8% de la carga global de cáncer. Entre los principales agentes infecciosos responsables de esta enfermedad se encuentran: *Helicobacter pylori*, el Virus de la Hepatitis B y C, VIH, VPH y VEB, donde la incidencia anual de cáncer debido a VPH oscila entre el 5,2% y 27,2%, y debido a VEB oscila entre el 1% y 10,3% a VEB para todos los tipos de cáncer (Parkin, 2006; zurHausen, 2009; Morales y Fuentes, 2015). En Venezuela la frecuencia de infección por VPH, reportada en estudios realizados en distintas regiones del país, oscila entre el 10% y 90% aproximadamente. En cuanto a VEB, los reportes a nivel mundial expresan que este virus se encuentra en aproximadamente el 90% de la población adulta, en forma asintomática.

En este trabajo se incluyeron a 44 pacientes que asistieron a consulta en el Servicio de Ginecología, específicamente aquellas que fueron diagnosticadas con carcinoma mamario y patología benigna de la mama, que fueron referidas a cirugía. El promedio de edad de las pacientes con carcinoma mamario fue de 58 años de edad (rango 30-86), de las cuales 16 pacientes (72,72%) tenían entre 45 a 65 años (de mediana edad), 4 pacientes (18,8%) eran mayores a 65 años (de tercera edad) y 2 pacientes (9,09%) menores a 45 años (mujeres jóvenes). Mientras que el promedio de edad de las pacientes con patología benigna fue de 29,4 años (rango 14-50), de las cuales la mayoría (72,72%) eran mujeres jóvenes de 14 a 35 años. Estos datos se corresponden con los obtenidos en publicaciones previas, donde se ha reportado que el rango de edad de las pacientes afectadas por cáncer de mama se encuentra entre los 45 y 65

años en Venezuela y entre 50 a 80 años de edad en países de Europa y Norteamérica. Mientras que las patologías benignas están asociadas a edades tempranas de la mujer en todo el mundo. La alta incidencia de lesiones benignas en mujeres jóvenes se debe a que la carga hormonal es mayor en edades tempranas, donde el estímulo hormonal durante el ciclo reproductivo femenino conduce a un aumento de la actividad mitótica celular. Por lo que las pacientes con desequilibrio hormonal, se han asociado con el desarrollo de patologías benignas en este sitio. Mientras que en las pacientes de edad media y tercera edad con mayor número de embarazos a término, se ha reportado que la carga hormonal va disminuyendo (Hómez, 2008).

En cuanto a la alta incidencia de cáncer de mama en mujeres de mediana y tercera edad, se ha planteado que el riesgo global aumenta con la estímulo acumulativo de factores de riesgo como son la exposición prolongada a estrógenos endógenos y exógenos, factores físicos y dietéticos, predisposición genética, entre otros. Se estima que el riesgo de desarrollar un cáncer de mama entre los 20 y 40 años de edad es de 0,49% y llega a 5,5% entre los 65 y 85 años (Peralta, 2007). En Venezuela, el trabajo de Hernández y colaboradores en el 2011, evidenció que el 7% de las pacientes con algún tipo de carcinoma mamario son menores de 40 años, y un 19% se ubica en el grupo etario mayor de 64 años (Hernández y col., 2011; Dikshit y col., 2012).

Hasta el momento, se han descrito numerosos factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de mama, los cuales son importantes para la detección precoz y la aplicación de estrategias de prevención temprana del cáncer mamario. Recientemente se publicó la relación de algunas características demográficas y

clínicas, así como también el estilo de vida con el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Peralta, 2007; Hernández y col., 2010 Hernández y col., 2011; Aguilar y col., 2012; Scoccianti y col., 2014). Entre las características demográficas y clínicas incluidas en este estudio se encuentran la edad, edad de la menarquia, número de embarazos a término, el uso de anticonceptivos orales (ACO), número de familiares con cáncer de mama y hábitos tabáquicos y/o alcohólicos.

Al evaluar cada uno de estos factores de riesgo encontramos, que nuestra población de pacientes eran en el 90,9% mujeres mayores a 45 años, en estadios tempranos de la enfermedad. Actualmente la edad del diagnóstico también es considerado como factor de riesgo, ya que la incidencia de cáncer de mama aumenta progresivamente con la edad de la mujer. En los Estados Unidos de América se ha calculado un riesgo de 1 en 20.000 para mujeres menores de 25 años que se eleva hasta 1 en 9 para mujeres de 85 y más años. Se estima que el riesgo de desarrollar un cáncer de mama entre los 20 y 40 años de edad es de 0.49% y llega a 5.5% entre los 65 y 85 años (Peralta, 2007). Y como factor pronóstico, se ha evidenciado que en pacientes jóvenes menores a 35 años fue más frecuente encontrar tumores indiferenciados, de grado histológico tipo 3, con compromiso nódulo-linfático y receptores hormonales negativos, es decir, más agresivos y de peor pronóstico que en las pacientes de mediana edad pre y postmenopáusicas. Esta diferencia se debe a que en mujeres jóvenes los tumores tienden a ser de rápido crecimiento y con capacidad invasiva, así como también se ha reportado expresión anormal de p53 y alto índice mitótico; mientras que las mujeres mayores a 35 años se presentan frecuentemente en estadios tempranos y con tumores de mejor pronóstico (Bonnier y col., 1995).

En cuanto a la edad media de la menarquia de las pacientes con cáncer evaluadas en este trabajo fue de 12,5 años, la cual es similar a las pacientes con patología benigna. Se ha demostrado que la edad de la menarquia inferior a los 12 años aumenta el riesgo global de desarrollar cáncer de mama en 1,2 y 1,5 veces. Además, está demostrado que existe una disminución de riesgo para desarrollar cáncer de mama de un 20% por año que se retrase la aparición de la menarquia (Hernández y col., 2010).

Encontramos que el promedio de embarazos a término fue de 3,14 embarazos, aunque más que el número de embarazos, se ha reportado que la edad del primer embarazo y la edad entre el primer y segundo embarazo tiende a aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de mama; el riesgo disminuye mientras más corto sea el tiempo entre el primer y segundo embarazo a término. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos reportados, el promedio de número de embarazos se encuentra entre 2 y 3 embarazos (Hernández y col., 2010; Hernández y col., 2011). Por otro lado, observamos que el 45,5% de las pacientes con cáncer de mama consumían o habían consumido ACO, mientras que en el caso de las pacientes con patología benigna fue de 72,7%. Un metaanálisis demostró que el consumo de ACO aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar cáncer de mama en pacientes que tomaban el anticonceptivo en comparación con el grupo de pacientes que nunca lo habían ingerido (Calle y col., 1996). En los trabajos realizado por Hernández y colaboradores, en el 2010 y el 2011, en 515 pacientes venezolanas con cáncer de mama, se evidenció que los factores reproductivos como la exposición a estrógenos endógenos (edad de la menarquia, edad de la menopausia, número de embarazos a término) y exógenos (uso de ACO) aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar carcinoma mamario,

tanto en mujeres jóvenes como en mujeres de mediana y tercera edad (Hernández y col., 2010; Hernández y col., 2011). La explicación que se ha venido planteando, a la asociación de factores hormonales con tumores en la mama es, que la exposición prolongada a estrógenos endógenos y exógenos promueve la proliferación epitelial de la mama, lo que le confiere a la glándula mamaria mayor susceptibilidad a ser transformada por agentes carcinógenos; así como también se ha confirmado esta asociación en estudios que han evidenciado el crecimiento de tumores mamarios en animales e incremento de la proliferación de las células cancerosas humanas *in vitro*, a través de la inducción de la expresión de oncogenes y la producción de factores de crecimiento (Clemons y Goss, 2001; Dumitrescu y Cotarla, 2005).

Encontramos que el 31,8% de las pacientes afirmaron tener historia familiar de cáncer de mama. Hernández y colaboradores (2010), reportaron que 21% de las pacientes de mediana edad presentan antecedentes de familiares con cáncer de mama, mientras que en las pacientes jóvenes (menores a 40 años) el 31% presenta antecedentes familiares con cáncer de mama. Encontrando que la presencia de antecedentes familiares con cáncer de mama disminuye con la edad, y el riesgo global incrementa de 1,5 a 3 veces si la mujer tiene su mamá o una hermana con cáncer de mama en edad temprana.

Y por último, 31,8% y 13,6% de las pacientes con cáncer de mama consumían o habían consumido tabaco y/o alcohol, respectivamente. Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación moderada entre la ingesta de alcohol y el cáncer de mama, tanto en pacientes pre-menopáusicas, como post-menopáusicas; el riesgo aumenta de

manera lineal con la cantidad, sobre los 60 gramos (2-5 bebidas diarias). Por cada 10 g de consumo diario el riesgo aumenta en 9%. A pesar de la baja frecuencia encontrada en pacientes con cáncer de mama que ingería alcohol en nuestro estudio, es importante destacar el rol carcinogénico de esta sustancia, ya que actúa indirectamente a través de su primer metabolito, el acetaldehído, un carcinogénico y mutagénico bien caracterizado, que puede actuar como un promotor tumoral (Clemons y Goss, 2001; Peralta, 2007; Scoccianti y col., 2014).

De igual forma, se han descrito varias características del tumor que actúan como factores pronóstico de la enfermedad, jugando un papel importante en el estadiaje y clasificación del cáncer, donde destacan el estadio, dado por el tamaño tumoral, el número de ganglios afectados y la presencia o no de metástasis a distancia; además del diagnóstico histopatológico que brinda información del tipo de células afectadas, y el grado de diferenciación celular. En cuanto a las características patológicas de los tumores; el estadio tumoral más frecuente del total de muestras de cáncer de mama correspondió al estadio II con 63,6%, seguido del estadio I con un 18,2%, lo que significa que las pacientes con estadio II presentaron tumores de 2 a 5 cm en su mayor dimensión, y entre 1 a 3 ganglios afectados. En cuanto al tipo histológico, el que se presentó con mayor prevalencia fue el carcinoma ductal infiltrante con 68,2%, frecuentemente de grado 2, es decir moderadamente diferenciado, seguido del carcinoma papilar infiltrante con 18,2%. Esto concuerda con los resultados reportados a nivel mundial donde la mayoría (54,5% a 88,8%) de las pacientes con cáncer de mama presentan carcinoma ductal infiltrante, en estadio II (en el 36% a 54%) (Preciado y col., 2004; Widschwendter y col., 2004; Herrera y col., 2011; Fadavi

y col., 2013). En la publicación del 2003 de la OMS y la IARC, donde evaluaron la patología y la genética de los tumores mamarios, reportaron que el carcinoma mamario invasivo es el más común (22% de todos los cánceres femeninos) a nivel mundial. De los cuales, el carcinoma mamario ductal invasivo comprende entre el 40% y 75% de las series publicadas. Además, es raramente encontrado en pacientes menores de 40 años. En cuanto al carcinoma papilar invasivo, este tipo histológico comprende entre el 1-2% de los cánceres de mama invasivos, y cuando el carcinoma papilar invade se comporta con el mismo patrón de infiltración que el carcinoma ductal, es frecuentemente detectado en pacientes post-menopáusicas y con compromiso ganglionar, sin embargo ninguna de las pacientes con este tipo histológico presentaron metástasis ganglionar (Tavassoli y Devile, 2003).

Adicionalmente, existe una serie de marcadores moleculares importantes para determinar el pronóstico del carcinoma, tales como los receptores hormonales y marcadores de proliferación. Diversos estudios se han interesado en investigar la importancia de la expresión de los receptores hormonales, donde destacan el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP), así como también la sobreexpresión del receptor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) en cáncer de mama (Sandhu y col., 2010; Duarte y col., 2011). En este estudio, de acuerdo a la clasificación molecular propuesta por Goldhirsch y colaboradores (2011), el 36% de los casos se incluyeron en el subtipo luminal A y agrupando los dos subtipos de luminal B (HER2+ y HER2-) el porcentaje de casos de este subtipo fue de 54%, y el 9% de los casos fueron triple negativos. En estudios de expresión de genes se han identificado cinco subtipos moleculares de cáncer de mama distintos que tiene valor

pronóstico para la aplicación de múltiples tratamientos, entre ellos se encuentran los RE+ luminal A, RE+ luminal B, sobreexpresión de HER2, los triples negativos. Los tumores luminales suelen ser asociados con pronóstico favorable con 80 a 85% de supervivencia en 5 años, mientras que los triples negativos y HER2 son asociados con pobre pronóstico y con alto riesgo de recurrencia en un periodo de 3 años y alta tasa de mortalidad en 5 años, y la supervivencia decrece en un 50 a 60% (Duarte y col., 2011; Fernandes y col., 2015b). En publicaciones previas se ha reportado al subtipo luminal A como el más frecuente, con el 67% de los casos y además, se relaciona con estadios tumorales tempranos y de mejores pronósticos, ya que posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular, mientras que el subtipo luminal B, en comparación con el subtipo luminal A, tiende a ser ligeramente más agresivo y de peor pronóstico, por presentar un índice de proliferación mayor, esto nos sugiere que la mayoría de las pacientes incluidas en este estudio tenía alto índice de proliferación, a pesar de que el mayor porcentaje de las pacientes se encontraban en estadio temprano tipo II, considerados de buen pronóstico y menos agresivos (Sorlie y col., 2003; Cheang y col., 2009; Imigo y col., 2011). Por otro lado, los subtipos HER2 y TN, no expresan receptores hormonales y son tumores más agresivos, de peor pronóstico y baja supervivencia, ya que la ausencia de los receptores hormonales dificulta la aplicación de quimioterapias hormonales (Cheang y col., 2009). Los subtipos HER2 son encontrados en el 20 a 30% de los cánceres de mama. Este receptor es capaz de formar un heterodímero con HER3 e inducir la activación de potentes cascadas de señalización oncogénicas, las cuales pueden ser importantes en la transformación y

progresión de tumores (Rubin y Yarden, 2001; Lin y col., 2007). En un estudio realizado con 472 pacientes del estado Mérida, encontraron que el 11% de las pacientes presentaron tumores TN, y se encontraban mayoritariamente entre los 60 y 69 años de edad, resultado que se ajusta al reportado en nuestro estudio (Márquez y col., 2012).

Luego de realizada la extracción del material genético de las biopsias del estudio, se pudo corroborar la calidad del mismo, mediante la identificación de 5 genes de expresión constitutiva, para garantizar que el genoma se encontrara en óptimas condiciones. Todas las muestras amplificaron los genes blanco, debido a que las muestras recolectadas fueron biopsias frescas conservadas a -80°C , sin necesidad de estar embebidas en parafina, evitando así la posible fragmentación del ADN durante el procesamiento de la muestra para preparar los bloques de parafina, lo que dificulta la detección del ADN viral.

En este estudio, la presencia de VPH fue detectada en el 63,6% de las muestras de cáncer de mama, mientras que sólo el 4,5% de las biopsias de tejido con patología benigna fueron positivas para este virus. Esta frecuencia de detección se encuentra dentro del rango publicado previamente, a nivel mundial, con una prevalencia que oscila entre 10 y 86% (de Villiers y col., 2005; Kan y col., 2005; Akil y col., 2008; Cantú de León y col., 2009; Heng y Glenn., 2009; Lawson and Glenn, 2010; Antonsson y col., 2011; Aguayo y col., 2011; Herrera-Goepfert y col., 2013; Fernandes y col., 2015a), donde los trabajos de Akil y colaboradores en el 2008 y el de Antonsson y

colaboradores en el 2011, detectaron mediante PCR múltiple y PCR consenso, 61,06% y 50% de casos positivos para ADN de VPH, respectivamente.

En Latinoamérica, la tasa de infección de VPH en cáncer de mama es baja. Se ha reportado entre el 8 y 40% de positividad (Aguayo y col., 2011; Herrera y col., 2013; Pereira y col., 2013, Fernandes y col., 2015a). Por lo tanto nuestro trabajo es el primero en reportar alta frecuencia de VPH en tejido mamario maligno. Sin embargo, algunos estudios no han detectado VPH en tejido tumoral ni en tejido normal de la mama (Lindel y col., 2007; Hedau y col., 2011; Chang y col., 2012). Esta diferencia en los reportes publicados puede atribuirse al número de muestras evaluadas, diferencias en la metodología y la sensibilidad de los métodos usados, tales como el uso de diferentes juegos de iniciadores, así como también el tipo de muestra utilizada.

Al realizar la identificación de los genotipos virales de VPH encontramos que las 14 muestras positivas presentaron infecciones únicas y mixtas con los genotipos de alto riesgo oncogénico 16, 18, 52, 56, y de bajo riesgo oncogénico 6 y 11. En los tumores malignos, el genotipo de alto riesgo más frecuente fue el tipo 16 con 21,21%, y en cuanto a los genotipos de bajo riesgo, los tipos encontrados fueron el 6 y 11 con un 27,27% cada uno. En la paciente con patología benigna infectada por VPH, se identificó el genotipo viral 33, de alto riesgo oncogénico. Estos genotipos identificados coinciden con los reportados en pacientes Venezolanas (Muñoz y col., 2003; Rivero, 2007; Quintero y col., 2013) y de otros países a nivel mundial, donde el genotipo de alto riesgo oncogénico más frecuentemente detectado, en cuello uterino, es VPH-16 en 20 a 90% (Khan y col., 2011).

Agrupando los genotipos virales según su riesgo oncogénico, obtuvimos que en 28,57% de las pacientes con cáncer de mama se detectó infección única por genotipos de alto y bajo riesgo, respectivamente, y el 42,90% de las pacientes positivas para VPH presentó coinfección por ambos grupos de genotipos.

Por otro lado, los genotipos de alto riesgo 16 y 18 están asociados con un crecimiento acelerado de las células epiteliales cervicales, ya que tienden a integrarse en el genoma y conducir a la proliferación celular descontrolada debido a la inhibición de la función de las proteínas celulares p53 y pRb (Rivera y col., 2006; Morales y Fuentes, 2014). En este trabajo encontramos que del 57,1% de las pacientes infectadas por VPH -16 y/o 18, el 75% de las mismas tenían alta expresión de Ki67, indicando alta proliferación celular. Mientras que en el resto de las pacientes infectadas con otros genotipos virales (6, 11, 52 y 56), sólo 1 de 6 pacientes tenía sobreexpresión de Ki67. Esto se relaciona con la expresión incrementada de los genes virales E6 y E7 asociados con el importante potencial oncogénico de VPH, lo que nos sugiere un posible rol de VPH en la carcinogénesis del tejido mamario.

Se realizó la correlación de la presencia del genoma de VPH en el tejido tumoral de la mama con las características clínicas de estas pacientes, observando que ninguna de las características presentó relación estadísticamente significativa. En cuanto al número de parejas podemos sugerir que a mayor número de parejas, es mayor el riesgo de adquisición del virus, como ocurre en el caso de las infecciones genitales.

En cuanto a las características patológicas de las pacientes con cáncer de mama infectadas por VPH, encontramos que el 35,7% de los casos fueron positivos para la

prueba del ganglio centinela, es decir, presentaron células cancerígenas en al menos 1 ganglio axilar, sin embargo, en este grupo de pacientes no se encontró una relación estadísticamente significativa. No obstante, otros estudios han evidenciado una asociación significativa entre la presencia de nódulos metastásicos y la presencia de VPH, detectando VPH-16 en el 13,3% de las pacientes con nódulo linfáticos metastásicos (di Lonardo y col., 1992).

En cuanto al tamaño tumoral, la mayor proporción de pacientes positivas para VPH presentaron tumores de menor tamaño, agrupados en el grupo T2, que incluye tumores >20mm y ≤50mm, en su mayor dimensión. A pesar de que no hubo una relación estadísticamente significativa, estos resultados concuerdan con los reportados por trabajos previos (di Lonardo y col., 1992; Aguayo y col., 2011; Khan y col., 2011; Fernandes y col., 2015b) donde indican que los tumores positivos para VPH son tumores pequeños; y que esto pudiera estar asociado con el patrón de crecimiento y el potencial metastásico de los carcinomas mamarios, asociados con mejor pronóstico, como en el caso de los tumores de cabeza y cuello (Antonsson y col., 2011).

Además, al correlacionar la presencia de VPH con los tumores mamarios en las pacientes con cáncer de mama, de acuerdo a los estadios de la enfermedad, se observó que el estadio más frecuente fue el estadio tumoral II, con 65% del total, concordando con lo antes mencionado y los resultados de otras publicaciones (Herrera y col., 2011; Fernandes y col., 2015b; Fu y col., 2015).

La presencia de VPH se ha asociado a subtipos moleculares de mama luminales, es decir de expresión de receptores de estrógenos y progesterona y bajo índice de proliferación (Fernandes y col., 2015b). En este trabajo observamos que el 35,7% de las pacientes presentaron subtipos luminales con predominante expresión de receptores hormonales, lo cual coincide con publicaciones previas donde la frecuencia de subtipos luminales en Venezuela oscila entre 30,77% y 60,63% (Uribe y col., 2010; Fernandes y col., 2015b). Sin embargo, la posible asociación de VPH y subtipos luminales (receptor de estrógenos positivos) aún no está totalmente clara, ya que otros estudios como los de Henning y colaboradores (1999) y Khan y colaboradores (2011), no encontraron relación entre subtipos luminales y la presencia de VPH, así como también, Yasmeen y colaboradores en el 2007, reportaron que las proteínas E6/E7 cooperan con el efecto de HER2 e induce la tumorigénesis y metástasis. Sin embargo, tampoco encontraron relación entre la sobreexpresión de HER2 y tumores invasivos.

Desde que se reportó por primera vez la presencia de VEB, el número de estudios que apunta hacia el potencial oncogénico de este y otros virus, y su relación con diferentes tipos de cáncer ha ido aumentando progresivamente. La fuerte asociación de la infección de VEB con ciertas malignidades está bien documentada. El genoma de VEB y los antígenos virales son consistentemente detectados en linfoma de Burkitt's, endémicos de África, en síndromes linfoproliferativos de hospedadores inmunocompetentes y en una malignidad epitelial como es el carcinoma nasofaríngeo. Se ha demostrado que VEB se encuentra entre el 90% y 100% de linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo. En este sentido, se han realizado nuevas investigaciones que

asocian este virus con otros tipos de linfomas como son: linfoma de Hodking y la enfermedad de no Hodking, así como también se ha asociado con varios tipos de carcinomas como son el carcinoma gástrico, de pulmón y recientemente, con el carcinoma mamario. Estas asociaciones están basadas en el tipo de células que es capaz de infectar VEB, las cuales son células B y células epiteliales escamosas estratificadas.

Diversos estudios han demostrado que existe una posible asociación entre VEB y el desarrollo de carcinoma mamario, basados principalmente en algunas observaciones directas o indirectas, tales como: 1) alta incidencia de cáncer de mama masculino, en países del mediterráneo endémicos de VEB; 2) el desarrollo de linfomas asociados a VEB, a nivel de las mamas; 3) similitudes morfológicas entre carcinomas medulares de mama y los carcinomas nasofaríngeos; 4) detección de ADN de VEB en tejido mamario y leche de algunas mujeres; 5) algunos linfomas asociados a VEB ocurren en la mama; 6) *in vitro*, células epiteliales de la mama pueden ser infectadas por contacto directo con líneas de linfoblastos infectados por VEB (Junker y col., 1991; Speck y Longnecker col., 2000; Mant y col., 2004; Joshi y col., 2009).

En este estudio, se detectó, mediante una PCR con iniciadores específicos para el gen de expresión temprana *BMFL1*, la presencia de VEB en 13,6% de pacientes Venezolanas con cáncer de mama, mientras que en las pacientes con patología benigna estudiadas, se detectó el ADN de VEB en sólo una paciente, representando el 4,5%. Este resultado se encuentra por debajo de los valores reportados en otros estudios realizados a nivel mundial, los cuales oscilan entre 21% y 55% de positividad

para ADN de VEB (Joshi y col., 2009; Nidal y col., 2013; Yahia y col., 2014; Aboukassim y col., 2015; Mazouni y col., 2015; Richardson y col., 2015). Sin embargo, en trabajos que emplearon algún tipo de PCR, como el de Xue y colaboradores en el 2003, quienes detectaron mediante PCR transcriptasa reversa específica para BZLF1, el RNA viral en 1 de 6 (17%) casos de cáncer de mama y el trabajo de Yahia en el 2014, quien detectó 11% de positividad de ADN de VEB en los casos de cáncer de mama mediante PCR, con iniciadores específicos para EBNA-1.

Con respecto al porcentaje de positividad de VEB a nivel mundial, existen numerosos reportes que oscilan entre el 30 y 60%, dependiendo del tipo de técnica empleada en la detección del ADN viral, sin embargo, algunos estudios no han encontrado ninguna relación entre VEB y el cáncer de mama (Chu y col., 1998; Glaser y col., 1998; Chu y col., 2001; Kadivar y col., 2011; Fadavi y col., 2013). En Latinoamérica, son muy pocos los estudios que han evaluado la presencia de VEB en cáncer de mama, los cuales han reportado una frecuencia de infección de VEB entre el 6% y 31% (Preciado y col., 2005; Lorenzetti y col., 2010; Aguayo y col., 2011). La gran diferencia obtenida con respecto a otros estudios puede ser debido a la variación en la epidemiología de VEB, de acuerdo a la región geográfica. Estudios en Europa y África sugieren que las diferencias en la frecuencia de infección de VEB podría variar según factores ambientales inherentes al estilo de vida, hábitos alimenticios, entre otros (Fina y col., 2001).

El ADN de VEB no ha sido encontrado en células epiteliales normales de la nasofaringe, pero puede ser detectado en casos de carcinoma nasofaríngeo

indiferenciado, es decir en estadios tempranos. Y estudios han reportado que el ADN de VEB está presente en células tumorales monoclonales más que en el estroma, y varios genes latentes son expresados en células de carcinoma. La infección clonal de VEB has sido encontrada en lesiones displásicas (pre malignas) de la nasofaringe, en pacientes con elevado título de anticuerpos monoclonales contra LMP1 de VEB, en fase premaligna de la enfermedad (Pathmanathan y col., 1995; Parkin, 2006).

La evidencia más específica de la asociación de VEB con el cáncer de mama ha sido la identificación de secuencias génicas de VEB dentro de tumores mamarios (Labrecque y col., 1995; Glenn y col., 2012). Sin embargo, otros estudios también han evaluado la expresión de proteínas de la fase de latencia de VEB, en líneas celulares de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (Chu y col., 1998; Arbach y col., 2006), así como también la capacidad oncogénica de sus proteínas virales en tejido epitelial. Entre estos trabajos se encuentra el estudio realizado por Laherty y colaboradores en 1992, quienes evaluaron el efecto de la proteína latente de VEB, LMP1, sobre la expresión del gen *A20*, el cual es inducible por factores de necrosis tumoral (TNF) y codifica una proteína que confiere resistencia al efecto citotóxico de TNF, encontrando que LMP1 es capaz de activar la transcripción de *A20* y regular negativamente la apoptosis. Así como también Miller y colaboradores en 1995, evaluaron el efecto de LMP1 sobre la expresión y actividad tirosina-quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en células epiteliales humanas, encontrando que la expresión de LMP1 incrementa la expresión de EGFR en células epiteliales, mas no en linfocitos B, y además es capaz de inducir la actividad de EGFR (Laherty y col., 1992; Miller y col., 1995).

Por lo tanto, siendo VEB un cofactor en el desarrollo de varias malignidades, incluyendo diferentes carcinomas (carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico) (Rickinson, 2014); podemos sugerir que la presencia de VEB en tumores del tejido mamario podría ser un factor de riesgo importante de éste cáncer, gracias a su potencial oncogénico (Glenn y col., 2012). Dentro de las críticas hechas a los estudios de detección de VEB en células epiteliales, se encuentra el hecho de que la mayoría de las técnicas moleculares aplicadas no son capaces de discriminar entre células cancerígenas e infiltrados linfocitarios. Sin embargo, en un estudio definitivo de 509 tumores, usando hibridación *in situ* y microdissección con láser combinada con PCR cuantitativa, realizado por Fina y colaboradores (2001), se demostró que la localización de VEB estaba restringida a células epiteliales de cáncer de mama (Fina y col., 2001). Esta localización ha sido confirmada por estudios posteriores (Fawzy y col., 2008; Joshi y col., 2009; Glenn y col., 2012). Sin embargo, es importante tomar en consideración la carga del ADN genómico del virus y la cantidad de ADN evaluado en las muestras, para evitar las discrepancias en la detección del ADN del virus.

Mazouni y colaboradores (2015) evaluaron la asociación de VEB con fenotipos de cáncer de mama agresivos, encontrando que la frecuencia de infección de este virus incrementa significativamente con el aumento del grado del tumor, desde 16,2% para grado I a 32% y 46,4% para grados II y III, respectivamente. Esto sugiere, que la distribución de los tipos histológicos de tumores analizados, podría explicar las discrepancias en la frecuencia de detección de VEB en cáncer de mama, debido a que en el 22,72% de las pacientes presentaron grado histológico de grado I, el 68% de los casos presentaron grado II y el 9,09% grado III.

Aun así, la diferencia obtenida en este trabajo entre la presencia de ADN de VEB en muestras malignas en comparación con las muestras benignas, no se encontró relación significativa, sin embargo no se pueden descartar los resultados obtenidos ya que el papel oncogénico de este virus ha sido ampliamente demostrado, siendo importante incrementar el número de la muestra para poder observar una tendencia determinante.

Con respecto a las características patológicas de las pacientes con cáncer de mama infectadas por este virus, encontramos que ninguna de las pacientes presentó afección ganglionar, es decir sin metástasis axilar.

Y al igual que VPH, en cuanto al tamaño tumoral, la mayor proporción de pacientes positivas para VEB presentaron tumores de menor tamaño agrupados en el grupo T1, ubicado en el rango de ≤ 20 mm en su mayor dimensión, con 67%. Resultado que concuerda con el reportado por Mazouni y colaboradores, 2011 y Mazouni y colaboradores en el 2015, donde evidenciaron que 31 de 65 (31,3%) y 21 de 38 (55,3%) tumores positivos para VEB fueron T1, respectivamente. Sin embargo, en otros estudios (Fawzy y col., 2008; Joshi y col., 2009; Nidal y col., 2013) la mayor proporción de pacientes positivas para VEB presentaron tumores tipo T2 y T3, entre el 26% y 45%.

Estudios han evaluado el pronóstico de los subtipos moleculares de acuerdo a la presencia de VEB en pacientes con cáncer de mama, reportando que los tumores triple negativos (21,1%), HER2 (23,7%) y luminal B (18,4%) fueron más frecuentes en casos de cáncer de mama VEB positivos, demostrando que los casos de cáncer de mama VEB

positivos, exhiben características más agresivas. Sin embargo, la presencia de VEB no está asociada significativamente con la supervivencia global (Labrecque y col., 1995; Fina y col., 2001; Mazouni y col., 2011; Mazouni y col., 2015). Por lo tanto, VEB está asociado a tumores agresivos pero su pronóstico en el cáncer de mama aun no está claro.

En cuanto a la coinfección por VPH y VEB en cáncer de mama se observó que en las tres pacientes que presentaron ADN de VEB también se detectó ADN de VPH, correspondiendo al 13,6% de todas las pacientes con carcinoma mamario evaluadas. Siendo entonces esta frecuencia de coinfección por VPH y VEB intermedia con respecto a la reportada en otros estudios a nivel mundial, los cuales oscilan entre 2,1% a 38% (Aguayo y col., 2011; Glenn y col., 2012; Corbex y col., 2014). Es importante destacar que son pocos los estudios que han evaluado la presencia de este virus en Suramérica. Aguayo y colaboradores, en Chile, estudiaron la coinfección de VEB y VPH, quienes encontraron 6,5% de positividad de VEB en muestras de cáncer de mama.

Este es, para el mejoramiento de nuestros conocimientos, el primer estudio que evalúa la presencia de ambos virus (VPH y VEB) en pacientes Venezolanas con cáncer de mama. A pesar de que no hubo relación estadísticamente significativa en cuanto a la presencia de ambos agentes virales, los resultados de Corbex y colaboradores en el 2014, sugieren que la coinfección por VPH y VEB podría actuar como cofactor en el proceso oncogénico que conduce particularmente a cánceres de mama agresivos, ya que detectaron mayor infección de VEB y VPH (45% y 36%, respectivamente) en

comparación con otros virus evaluados, y además detectaron coinfección por VPH y VEB sólo en carcinoma mamarios inflamatorios (2,4%), un tipo agresivo de cáncer de mama, mientras que en los carcinomas no inflamatorios no detectaron ninguno de estos dos virus. Sin embargo el rol de VPH/VEB aún sigue siendo debatido.

Recientemente se ha postulado que VEB podría no ser oncogénico cuando está presente de forma única en tejido normal de la mama, pero podría aumentar la actividad oncogénica en sinergia con otros virus (Glenn y col., 2012). Incluso Corbex y colaboradores en su trabajo, plantearon que las células infectadas por VPH podrían liberar IL10 u otras citocinas inflamatorias y crear un microambiente favorable para la infección de VEB, y el único caso en el cual detectaron la expresión de EBER fue con la infección de VPH.

Las pacientes con cáncer de mama incluidas en este estudio provenían de diferentes regiones de Venezuela, permitiéndonos evaluar la distribución geográfica de las pacientes con cáncer de mama en el país. Para ello fueron agrupadas en cinco regiones geográficas, según la clasificación propuesta por Sánchez y colaboradores (2012), dentro de las cuales se encuentran los 24 estados venezolanos, ordenados de la siguiente manera: 1) Región capital: Distrito capital, Miranda y Vargas, 2) Región de los Andes y región Zuliana: Mérida, Táchira, Trujillo, Barinas y Zulia, 3) Región centro-occidental: Lara, Falcón, Yaracuy y Portuguesa, 4) Región de los Llanos: Aragua, Carabobo, Cojedes, Guárico y Apure, 5) Región nororiental y Guayana: Anzoátegui, Monagas, Sucre, Nueva Esparta, Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro. Esto nos permitió además de observar la distribución de las pacientes con cáncer de mama en

el país, también correlacionar la distribución de las pacientes afectadas con esta patología y la frecuencia de infección por VPH y VEB, descritas más adelante. Encontramos que la mayoría (50%) de las pacientes evaluadas provenían de la región 1, la cual corresponde a la región Capital, seguido por el 22,7% de pacientes provenientes de los Andes y la región Zuliana del país, el 13,6% de las pacientes provenían de los llanos, el 9,10% de las pacientes eran originarias de la región nororiental y Guayana, y 4,5% de las pacientes provenían del centro-occidente de Venezuela (Figura 29). La alta frecuencia de pacientes de la región capital posiblemente es debido a que el único centro de salud donde fue realizado el muestreo está ubicado en Caracas, y el acceso de pacientes de bajos recursos del interior del país hasta este centro es difícil, lo que produce deficiencia en la detección y diagnóstico de pacientes de todo el país. Sin embargo, esta distribución reportada de las pacientes con cáncer de mama en Venezuela abre paso a estudios epidemiológicos posteriores, donde se evaluó la incidencia de cáncer de mama a lo largo del territorio nacional, involucrando una muestra representativa de cada región.

En cuanto a la distribución geográfica de las pacientes VPH positivas, encontramos que el 43% provenían de la región capital, 35,70% de la región andina y 21,40% de los llanos. En una serie de trabajos realizados en distintas regiones del país, se ha reportado que la frecuencia de detección de VPH en muestras ginecológicas, en la región capital oscila entre el 40% y 60%, aproximadamente (Alfonzo y col., 2003; de Guglielmo y col., 2008), en la región andina se ha reportado una frecuencia entre 27% y 34% (Reigosa y col., 2004; Contreras y col., 2008; Sanoja, 2013) y en los llanos se ha reportado 79,1% de infección (Álvarez y col., 2000). Esta distribución puede ser

debido a las diferencias epidemiológicas de VPH en las diferentes regiones del país. De hecho, en este trabajo se realizó una evaluación de la prevalencia de cada genotipo viral por región geográfica (ver Figura 32), encontrando que los genotipos virales de alto riesgo más prevalentes la región andina y zuliana fueron los VPH tipo 52 y 18, con 100% y 66,7%, respectivamente. Mientras que el genotipo de alto riesgo más frecuente en la región capital fue VPH tipo 16 con 42,9%. En el trabajo realizado por Correnti y colaboradores en el 2011, en 450 pacientes Venezolanas con lesiones intraepiteliales y cáncer cervical, se reportó que los genotipos de alto riesgo más frecuente (65%) en el país son los tipos VPH-16 y VPH-18. Por otro lado, la distribución de los genotipos VPH-16 y VPH-18 encontrada en este trabajo, concuerda con la reportada en estudios realizados en pacientes de la región Andina y de la región Capital. Entre los cuales destacan los realizados por Muñoz y colaboradores en el 2003, quienes estudiaron 271 mujeres que acudieron a diversos centros asistenciales en la ciudad de Mérida encontrando que 60% de las mujeres presentaron VPH-18 y el 30% VPH-16, y en el trabajo realizado por Michelli y colaboradores en el 2013, quienes evaluaron 250 mujeres atendidas en el servicio de ginecología de la Universidad de los Andes, en el estado Mérida. Los autores encontraron que el 78% de las pacientes presentaron VPH-18 y el 37,4% presentaron VPH-16. Mientras que en la región capital se ha reportado al genotipo 16 con mayor frecuencia (Alfonzo y col., 2003).

Los tipos de VPH de alto riesgo son aceptados como carcinógenos en cáncer cervical y anogenital, sin embargo, la relación entre la infección de VPH y cáncer de mama también ha sido reportada, y aunque la vía de transmisión aún no ha sido

determinada, Widschwendter y colaboradores en el 2004 encontraron el mismo genotipo (VPH-16) de VPH en tejido de cáncer de cuello uterino y en cáncer de mama de las mismas pacientes, sugiriendo que el ADN de VPH puede ser transportado desde el sitio original o inicial de la infección a través de la sangre hacia el tejido mamario, considerando que en este estudio el cáncer de mama fue el segundo primario.

Por su parte, De Villiers y colaboradores detectaron ADN de VPH, tanto en biopsias de tumor mamario como en el tejido del pezón de las mismas pacientes, en una frecuencia de 86% y 69% respectivamente, sugiriendo una posible vía de infección externa de VPH en el tejido mamario a través el complejo areola-pezón. Sin embargo, mayor evidencia es necesaria acerca de la vía de infección de VPH, la biología de infección VPH en células epiteliales de los conductos de la mama y los pasos de VPH que inducen a la carcinogénesis del cáncer de mama.

Al revisar las muestras de las pacientes con patología benigna, se encontró que era la misma paciente que se encontraba infectada por ambos virus, y quien fue diagnosticada con una mastitis abscedada, apuntando esto a una posible vía de entrada de estos virus al tejido mamario. Entre las vías de infección del tejido mamario propuestas para VPH se encuentran: a) vía externa, en forma retrograda desde el complejo areola-pezón a los conductos linfático (de Villiers y col., 2005), b) vía hematológica y/o linfática, a través de linfocitos provenientes de lesiones en un órgano hasta la mama (Hennig y col., 1999; Widschwendter y col., 2004; Bodaghi y col., 2005). En cuanto a VEB, las vías de infección del tejido mamario aún no han sido muy evaluadas, sin embargo algunos estudios sugieren una vía sanguínea, durante la

reactivación de los linfocitos B de la fase latente, donde el virus entra a el ciclo lítico replicativo y dispersa las partículas virales a otros tejidos, así como también vía contacto célula a célula (Labrecque y col., 1995; Speck y Longnecker, 2000; Tugizov y col., 2005; Morales y Fuentes; 2015).

Las técnicas de biología molecular han permitido evaluar desde otro enfoque esta enfermedad, como lo es la detección de ADN de diferentes agentes virales. Sin embargo, aún no se ha estandarizado una técnica para la detección de VPH o VEB en pacientes con cáncer de mama, lo que hace que los resultados de los diferentes estudios difieran considerablemente. Aunque existe un consenso relativo con respecto a la detección de la infección latente de VEB, en que el método estándar es la hibridación *in situ* para EBER-1, un estudio realizado por Aguayo y colaboradores, detectaron tres muestras positivas usando qRT-PCR para EBNA-1, mientras que usando hibridación *in situ* para EBER-1, todas las muestras fueron negativas. Las técnicas utilizadas en este trabajo fueron la PCR convencional con iniciadores tipo específicos y la tipificación de VPH, por un sistema altamente sensible y de amplio espectro. Para evitar la contaminación cruzada se trabajó con sumo cuidado.

Es importante destacar que entre los criterios de selección utilizados en este trabajo, ha sido el de evaluar pacientes que no hubiesen sido sometidas a un tratamiento de terapia neoadyuvante previo a la cirugía, ya que la quimioterapia podría afectar la detección viral, en los tumores de las pacientes, debido a que la quimioterapia destruye las células, lo que sugiere la disminución de la carga viral por célula transformada. En estudios donde se evaluó la presencia de ADN viral en pacientes que

ya habían recibido tratamiento neoadyuvante, encontraron baja frecuencia de detección en comparación con otros trabajos, tal es el caso de Lindel y colaboradores en el 2007, quienes evaluaron la presencia de ADN de VPH en 81 pacientes con cáncer de mama, en condición de post-neoadyuvancia. Sin embargo, a pesar de que utilizaron una PCR sensible no encontraron positividad en ninguna de las muestras. A partir de esta observación podríamos suponer que la evaluación de pacientes en condición de post-neoadyuvancia podría afectar el resultado de la detección del ADN viral.

Con este estudio se puede sugerir un papel de VPH y VEB en la patogénesis del cáncer de mama, sin embargo la presencia de secuencias virales en las biopsias no es una condición suficiente (Fernandes y col., 2015a). Nuestro hallazgo está basado principalmente en la detección del genoma viral por la técnica de PCR, por lo que haría falta una prueba confirmatoria como inmunohistoquímica o Hibridación *in situ*. Se necesitan más investigaciones para determinar el papel de VPH y VEB en la etiología o la progresión del cáncer de mama, incluyendo la evaluación de la carga viral para ambos agentes y la determinación de la integración viral de VPH al genoma del hospedero, ya que se conoce que este es un paso importante en el desarrollo de la carcinogénesis, afectando importantes puntos de control de la replicación viral. Además, es necesario incrementar el número de muestras, lo que permitirá observar una tendencia más clara en cuanto a la relación entre la presencia de los virus y el desarrollo de cáncer de mama.

La prevención del cáncer a través de la educación, junto a otras medidas para disminuir las adicciones al tabaco, al alcohol, los malos hábitos alimenticios, las

conductas sexuales de riesgo, reducir la exposición a otros agentes cancerígenos físicos y químicos, y las infecciones por algunos virus con potencial cancerígeno, pueden conducir a largo plazo a una reducción de la incidencia y mortalidad por cáncer.

El diagnóstico precoz seguido de un tratamiento inmediato permite curar, en promedio, algo más del 50% de los casos de cáncer en general. Este porcentaje puede llegar a ser mayor en algunas neoplasias. Por ejemplo, en el cáncer de cuello uterino en estadios iniciales, el porcentaje de curación se aproxima al 100% y en el cáncer de mama temprano, es mayor al 95%. Estos dos cánceres son los más frecuentes en nuestro país dentro de la población femenina, contribuyendo con más del 50% de la incidencia total de cáncer en ambos sexos.

Es evidente que existe cierta incertidumbre en cuanto al rol patogénico de VPH y VEB en el desarrollo del carcinoma mamario, sin embargo, la mayoría de las limitaciones encontradas residen en las técnicas empleadas para la detección del ADN viral, ya que no existe una prueba estándar para evaluar estos virus en tejido mamario. Así como también, las diferencias epidemiológicas de estos virus en las diferentes regiones del mundo, conduciendo a que haya variaciones en la frecuencia de infección encontrada en las pacientes. Y la dificultad de establecer a los virus tumorales como agentes causales de cáncer reside en que algunos actúan en la oncogénesis de forma indirecta, están presentes en la mayoría de la población sin producir la enfermedad, porque ningún cáncer surge como consecuencia de la infección grave, sino después de aproximadamente 15 a 40 años, entre otras razones. Sin embargo, es importante

considerar que la infección de virus tumorales nunca es suficiente, pero siempre es requerida para el desarrollo de tumores.

9. CONCLUSIONES

- Las pacientes con cáncer de mama se ubicaron en el grupo de mujeres de mediana edad entre 45-60 años, con una edad media de 58 años, mientras que las pacientes con patología benigna eran mujeres jóvenes, quienes tenían una edad media de 29,4 años.
- El 90% de las pacientes con cáncer de mama tenían tumores luminales, de las cuales el 36% correspondía a pacientes con subtipos luminal A y el 27% tenían tumores con subtipos luminal B HER2+ y luminal B HER2-, cada uno, y 9% fueron triple negativos. No encontramos ninguna paciente con subtipo HER2.
- En todas las muestras evaluadas el ADN extraído se encontró en condiciones óptimas para su posterior análisis.
- Se detectó la presencia de VPH en 63,6% de las pacientes con cáncer de mama y en 4,5% de las pacientes con patología benigna.
- Las pacientes con cáncer de mama positivas para VPH tenían una edad media de 58,6 años, y el 65% presentó estadios tempranos, EII.
- El 35,7% de los casos de cáncer de mama positivos para VPH presentaron subtipos moleculares luminal A y luminal B HER2-, cada uno.
- Identificamos en el 28,57% de los casos genotipos de alto riesgo (VPH-16, 18, 52, 56 y 33) y bajo riesgo (VPH- 6 y 11) para cada uno, donde el 27,27% de los casos evaluados presentaron VPH-6 y 11, seguido de VPH-16 con el 21,21%.
- Se detectó la presencia de VEB en el 13,6% de las pacientes con cáncer de mama, mientras que en las pacientes con patología benigna se detectó en 4,5%.

- Todas las pacientes del grupo con cáncer de mama positivas para VEB tenían una edad media de 62 años, y el 67% presentó estadios tempranos de tipo EI.
- El 33,33% de los casos de cáncer de mama positivos para VEB presentaron subtipos moleculares luminal A, luminal B HER2+ y luminal B HER2-, cada uno.
- Encontramos que el 13,6% de las pacientes con cáncer de mama presentó coinfección por VPH y VEB.
- La frecuencia de pacientes con cáncer de mama en las distintas regiones geográficas de Venezuela fueron variadas: el 50% provenían de la región Capital, el 22,7% de la región Andina y región Zuliana, el 13,6% de los llanos, el 9,10% del oriente y sur del país y el 4,5% de la región centro-occidental.
- La región Capital presentó mayor frecuencia tanto de VPH (43%), como de VEB (66,7%).
- El genotipo de alto riesgo más frecuente en la región capital fue VPH-16, con 42,9%, mientras que VPH-18 fue más frecuente en la región Andina y Zuliana, con 66,7%.

10. ANEXOS

1. Aval del comité de bioética del Hospital Universitario de Caracas:



INSTITUTO AUTÓNOMO
HOSPITAL UNIVERSITARIO
DE CARACAS

.COMITÉ DE BIOÉTICA

INTEGRANTES:

DR. CLAUDIO UROSA- COORDINADOR

DR. OSCAR IVÁN SILVA - SECRETARIO

DR. JOSÉ M. GUEVARA IRIBARREN

DR. JULIO BORGES ITURRIZA

DR. FRANK PÉREZ ACUÑA

DRA. MARGARITA SALAZAR

DR. Pbro. ALFREDO RINCÓN M.

DRA. OMAIRA VERA R.

DR. JOSÉ JOAQUÍN FIGUEROA

DR. GARCÍA FLORES FREDDY MANUEL

DR. ANGEL MILLAN CUETO

DR. EZEQUIEL MUÑOZ OBANDO

DRA. CLARA PACHECO

LIC. BERTHA Y. ÁLVAREZ

CBE N° 43/2012

Caracas, 31 de julio de 2013

Ciudadano

DR. RICARDO BLANCH

Jefe del departamento de Ginecología y obstetricia

Hospital Universitario de Caracas

Presente.-

En nombre del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas, me dirijo a usted, en la ocasión de informarle que en Reunión Ordinaria N° 13 del día 25-07-2013, hemos considerado y evaluado el Trabajo Científico titulado: "DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y DEL VIRUS EPSTEIN-BARR (VEB)", que será realizado por la Lic. Andreina Fernández, Biólogo Molecular, laboratorio Genético Molecular, Instituto de Oncología y Hematología, tomando la decisión de **APROBARLO**.

Sin otro particular a que hacer referencia, me suscribo de usted.



Atentamente,

Claudio Urosa
DR. CLAUDIO L. UROSA P.
Coordinador

CLUP/yn.-

2. Consentimiento bajo información para la participación en el protocolo de investigación:

PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y DE VIRUS EPSTEIN-BARR (VEB) EN BIOPSIAS FRESCAS DE CÁNCER DE MAMA COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ESTA PATOLOGÍA

PRIMERA PARTE: descripción de la propuesta de investigación

Como es conocido, el Virus de Papiloma Humano (VPH) está asociado con el cáncer uterino y el Virus Epstein-Barr (VEB) con el carcinoma nasofaríngeo y el Linfoma de Burkitt. Recientemente se comenzó a estudiar el papel del VPH y VEB en el cáncer de mama. El presente protocolo de investigación tiene como objeto fundamental la realización de un estudio clínico en pacientes femeninas, que como en su caso, acudan de manera espontánea e independiente, a la consulta de Patología Mamaria, del Servicio de Ginecología, del Hospital Universitario de Caracas, para establecer el diagnóstico y la frecuencia de infección por VPH y VEB en el tejido mamario, mediante la detección y genotipificación viral por el método INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra* (Innogenetics) y el estuche comercial Epstein-Barr Virus BMLF1 (Maxim Biotech, Inc.), en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología, MPPS. Los resultados que genere la detección de VPH y VEB de estos estudios serán manejados con hermética confidencialidad y en el caso de algún tipo de infección, los médicos que participan en este protocolo, realizarán una junta médica para sugerir el tratamiento farmacológico o quirúrgico pertinentes, a los fines de brindar un beneficio directo a la paciente afectada.

1. Objetivos generales de la investigación:

Evaluar la presencia de Virus de Papiloma Humano (VPH) y de Virus Epstein-Barr (VEB) en biopsias frescas de cáncer de mama como posibles factores de riesgo asociados a esta patología.

2. Descripción detallada del procedimiento de investigación, especialmente los aspectos significativos que pudiesen afectar su disposición a participar, tales como riesgos físicos, incomodidad o experiencias desagradables.

Historia Clínica:

Se realizará una encuesta médica con formato de historia clínica para recolectar datos personales, familiares, epidemiológicos y clínicos. La información contenida en esta

historia clínica es absolutamente confidencial y el grupo de médicos y de investigadores asume el total compromiso de confidencialidad y secreto médico, de acuerdo a los códigos deontológicos.

Toma de muestras:

Biopsia:

La biopsia será tomada durante el proceso quirúrgico en la sala operatoria, en la cual usted estará bajo anestesia general y monitorización continua. El procedimiento se realizará siguiendo las medidas de asepsia y antisepsia correspondiente.

A la pieza quirúrgica obtenida por los cirujanos se le extraerá un pequeño fragmento tisular representativo de aproximadamente 2 mm de diámetro, el cuál será transportado en un medio estéril y conservado a bajas temperaturas hasta que llegue al Laboratorio de Genética Molecular del IOH, donde será preservado a -80 °C hasta su posterior análisis. A ésta biopsia se le realizará detección de VPH y VEB.

Los procedimientos de toma de muestra tisular no implican riesgo alguno para la integridad física de la paciente; se trata de una simple muestra de tejido para estudio molecular.

3. Plan de trabajo:

Fase 1:

Recopilación de los datos clínicos y de la muestra, que incluye una biopsia mamaria.

Fase 2:

Procesamiento de las muestras, en cuanto a detección y tipificación viral y diagnóstico como posibles cofactores en el desarrollo de cáncer de mama.

En resumen, toda paciente que como usted, consienta su participación en este estudio, será evaluada desde los puntos mastológicos, microbiológicos, a los fines de diagnosticar y llevar un control estricto de la infección por VPH y VEB para tratar oportunamente cualquier alteración que se produzca en tejido mamario.

4. Por toda incomodidad que resulte en la aplicación de la historia clínica y/o en la toma de las muestras, la paciente tendrá absoluto derecho de reclamarla y exigir

los correctivos necesarios. Podrá presentar su queja con el responsable del proyecto de investigación, Lic. Andreína Fernandes (Lab. De Genética Molecular, MPPS. Telf. 605-0647); Dra. Adriana Pesci-Feltri (Servicio de Patología Mamaria, HUC-UCV. Telf. 0414-3327971).

5. Este estudio no comprende pruebas con fármacos.
6. Su participación es voluntaria y puede, con todo derecho, tomar la decisión de retirarse en cualquier momento de la investigación sin que ello conlleve represalias o pérdida de algún beneficio.
7. Los beneficios esperados como resultado de la investigación consisten en el diagnóstico oportuno y veraz de VPH y VEB, y la inducción a centros que puedan impartir el tratamiento médico-ginecológico precoz. En caso de ameritar tratamiento médico mastológico, le será debidamente informado y el mismo será canalizado por la Lic. Andreína Fernandes (responsable del proyecto) por ante los responsables de la parte mastológica, Dra. Adriana PesciFeltri y/o Dra. Isabel García Fleury, del Servicio de Patología Mamaria del Hospital Universitario de Caracas, UCV.
8. Todos los datos, especialmente los publicados al término de la investigación, mantendrán el compromiso de confidencialidad y sin causar identificación o daño personal.
9. El proceso de información será continuo, de acuerdo a las características de la investigación, a fin de que la participante pueda evaluar los hechos durante el proyecto.
10. El paciente estará amparada por la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, Ley del Código Civil, Ley del Ejercicio de la Medicina, y en caso de ser

menor de edad, por la Ley Orgánica para la Protección de Niños, Niñas y Adolescentes.

11. El artículo 50 de la Lopna sobre Salud Sexual y Reproductiva indica que los y las adolescentes mayores de catorce (14) años de edad, tienen derecho a solicitar por sí mismos y a recibir estos servicios.
12. Los resultados serán guardados con estricta confidencialidad y le serán suministrados a la paciente. En calidad de paciente voluntario se podrá retirar del estudio en el momento que lo crea conveniente sin ninguna consecuencia.
13. Auditores y algunas autoridades debidamente identificadas, tendrán acceso a su historia clínica para la verificación de procedimientos y/o datos, sin violar su confidencialidad.

SEGUNDA PARTE: de la comprensión del proyecto de investigación por parte de la participante.

Declaro haber comprendido el propósito y los términos de mi participación en el proyecto de investigación “PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y DE VIRUS EPSTEIN-BARR (VEB) EN BIOPSIAS FRESCAS DE CÁNCER DE MAMA COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ESTA PATOLOGÍA”; el cual consiste en un estudio clínico que servirá para establecer la asociación y la frecuencia de infección por VPH y VEB en tejido mamario mediante métodos moleculares.

Declaro entender también que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento de la investigación, puedo retirarme de la misma si así lo deseo, sin que mi decisión conlleve a represalias o a la pérdida de cualquier beneficio como producto de la investigación.

Así lo declaro y confirmo a los ____ días del mes de _____ del año 20__.

Nombre y Apellido

Firma de la participante

Huella digital si no sabe escribir o tiene algún impedimento para firmar



Cédula de identidad

En caso de ser paciente menor de edad firma el representante legal:

Firma _____ C.I. _____

Se hacen dos copias del mismo documento.

TERCERA PARTE: del consentimiento definitivo para formar parte del proyecto de investigación por parte de la participante.

Este CONSENTIMIENTO establece un común acuerdo con la persona participante (paciente), con el tiempo previo que sea necesario, para que esta última pueda ampliar su consulta y comprenderla, de manera que pueda tomar una decisión de participar en la investigación.

CONSENTIMIENTO acordado a los ____ días del mes de _____ del año 20__.

Lic. Andreína Fernandesó
Dra. María Correnti. Telf. 605-0647

Firma de la paciente

Dra. Adriana Pesci-Feltri.
Telf. 0414-3327971

Firma de testigo 1

Firma de testigo 2

Cédula de Identidad

Cédula de Identidad

3. Protocolo de bioseguridad humana y ambiental de Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología:

Infraestructura y apoyo técnico:

A la fecha, el Laboratorio de Genética Molecular cuenta con un equipamiento suficiente para el aislamiento y amplificación de fragmentos de ADN de agentes infecciosos de origen viral y bacteriano y visualización: 3 congeladores de -20 °C, 1 congelador de -80 °C, 3 termocicladores de punto final, 1 termociclador para tiempo real, 1 vórtex, 2 centrifugas refrigeradas, 1 visualizador de geles con computadora, 2 thermomixer, 2 bombas de vacío, 1 baño de agua, 1 incubadora de CO₂, 1 cabina de trabajo, 1 luminómetro. Con respecto al apoyo técnico, se cuenta con 5 profesionales especialistas en el área de biología molecular.

1. Finalidad del Laboratorio de Genética Molecular:

La finalidad del laboratorio es apoyar el diagnóstico de infecciones virales y bacterianas asociadas con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, en pacientes del Instituto de Oncología y Hematología, además de colaborar con el dictado de pasantías y la tutoría de tesis, tanto de pregrado, como de postgrado, de diversas facultades, así como desarrollar diversos protocolos de investigación que favorezcan a la población de los centros públicos de salud:

- a. Detección y genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH), agente causal del cáncer de cuello uterino, así como el diagnóstico molecular de otros microorganismos, dentro de la población que asiste al centro de salud.
- b. Determinación molecular de oncogenes.
- c. Evaluación de marcadores tumorales y subpoblaciones linfocitarias.
- d. Evaluación de niveles de anticuerpos anti- VPH-16/ 18.
- e. Cultivo de líneas celulares HeLa y CasKi.
- f. Desarrollar bases de datos clínicas y epidemiológicas que permitan establecer la morbilidad de nuestros pacientes.

- g. Dar asesoría en los métodos moleculares ejecutados en el laboratorio, a los estudiantes de pregrado y postgrado, de las diversas facultades.
- h. Desarrollar y ejecutar proyectos de investigación que permitan generar datos de relevancia clínica, en el campo del desarrollo y epidemiología del cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama, entre otros.

2. Estructura interna del laboratorio

- a. Este laboratorio presta servicio a los pacientes del Instituto de Oncología y Hematología, provenientes del Hospital Universitario de Caracas, la Organización de Bienestar Estudiantil de la UCV, la Organización de Bienestar Estudiantil de la UBV, entre otros centros públicos del Área Metropolitana de Caracas y otros estados del país.
- b. El responsable del laboratorio estará encargado de supervisar el funcionamiento del mismo, a través del personal técnico de apoyo, y rendirá informes anuales a la dirección del instituto.
- c. El personal técnico de apoyo estará a cargo de la asesoría directa a los estudiantes mediante la supervisión de la ejecución de los protocolos del laboratorio y del uso de los equipos del mismo, proveyendo el entrenamiento y las recomendaciones del cuidado del mismo y lineamientos de uso de cada pieza. Junto con el responsable del laboratorio, se hace cargo de la administración de las adquisiciones y compras, tanto de equipo como de materiales y consumibles.
- d. Ningún estudiante o algún otro profesional del instituto, puede hacer uso del equipo o manejar reactivos sin la supervisión y acuerdo previo con el responsable o el personal técnico. Es indispensable, con el fin de que todos puedan aprovechar el equipo y obtener sus datos, respetar el trabajo de los demás y llevar un control muy cuidadoso de todo lo indicado dentro del laboratorio y en estos lineamientos. En el caso de los estudiantes, los tutores deberán avalar la participación del estudiante y hacerse responsables por su desempeño y presentarlos al responsable del laboratorio o al personal técnico.

e. Las personas que no cumplan con estos lineamientos no podrán ser usuarios del laboratorio en subsecuentes solicitudes, y se suspenderá su proyecto dentro del mismo.

f. Otros miembros del Instituto de Oncología y Hematología que no participen en proyectos del laboratorio, pero que requieran el uso del algún equipo en particular, podrán solicitar el acceso a los responsables, el cual será otorgado si no interfiere con las actividades del mismo.

3. Procedimiento para el acceso al Laboratorio

El personal entrenado o cualquier estudiante que requiera trabajar en el laboratorio para el procesamiento de las muestras, deben proceder de la siguiente forma:

a. Los interesados deben contactar al responsable e informarle acerca del proyecto que se desea desarrollar.

b. Se realiza el entrenamiento previo del personal nuevo en los distintos protocolos que se desarrollan en el laboratorio, los cuales incluyen: extracción de ADN, detección de secuencias virales mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), visualización de los amplificadores en geles de agarosa, reacciones de inmunohistoquímica, cultivo de líneas celulares y cualquier otro protocolo que se estandarice en el mismo.

c. Se provee de un kit de toma de muestras a los pacientes, el cual incluye un hisopo de dacrón, un tubo colector y un formulario para la recolección de datos y la creación de bases de datos.

d. Los pasos de lisis y aislamiento de ADN genómico se llevan a cabo en el área del laboratorio destinada para la extracción de ácidos nucleicos.

e. Los pasos de pre-PCR, amplificación y visualización de la región de ADN seleccionada se realizan en áreas separadas físicamente, cumpliendo con los requerimientos de la distribución de un laboratorio de biología molecular.

4. Uso y manejo de equipo

a. El uso de todo el equipo del laboratorio está dividido en períodos definidos durante las horas hábiles. El usuario debe registrar el periodo en el que desea usar el equipo y

estará sujeto a la duración del mismo. El usuario puede registrar más de un periodo en caso de que la demanda de uso del equipo lo permita. En caso de sobredemanda se agenda con más tiempo el uso del equipo y se da un acceso equilibrado a todos los investigadores. En el caso específico de los termocicladores se da un periodo de 15 minutos de tolerancia a la hora reservada, con el fin de no tomar más tiempo de lo reservado y no utilizar el tiempo del siguiente usuario.

b. El espacio dentro del refrigerador y congelador (-20°C) se especifica de acuerdo al uso que se le esté dando a éstos y únicamente es para almacenar muestras en proceso y reactivos. Los investigadores y sus asociados tienen un espacio temporal en este equipo, según previo acuerdo con el coordinador del laboratorio. Se asignará un espacio para otros usuarios. **Todos los reactivos y materiales personales deben estar en contenedores y debidamente marcados con el nombre del usuario.** El material que no se encuentre marcado se retira después de una advertencia si se conoce al usuario. Al término de los trabajos las muestras ya analizadas se retiran para liberar el espacio de uso común. Si el espacio lo permite se conservan los tubos de ADN genómico en los congeladores.

c. Existe un manual de operación disponible en el laboratorio para cada equipo. En caso de que no se encuentre disponible, se puede solicitar al personal de apoyo del laboratorio. Para un mejor monitoreo, algunos equipos delicados cuentan con libretas de registro, donde obligatoriamente el usuario se anota, haciendo referencia a la fecha y hora en que utilizó el equipo.

d. Si alguna pieza de cristalería o equipo sufre algún desperfecto debe notificarse al responsable o al personal de apoyo para solucionarlo como corresponde. Si el desperfecto resulta de no saber operarlo o por negligencia deberá ser arreglado o repuesto con cargo al usuario.

e. Existen áreas designadas para usos particulares (para preparación de reacciones, proceso de amplificación, manejo de reactivos, etc.). El uso de estas áreas debe ser respetado para evitar contaminación de experimentos y de los mismos usuarios. Los espacios de trabajo en los mesones serán distribuidos de acuerdo al número de usuarios, a la frecuencia de uso y disponibilidad.

f. Las gavetas de almacenamiento se utilizan para guardar cristalería y objetos de uso común (puntas, tubos, guantes, etc.). El espacio restante se distribuye de acuerdo al número de usuarios activos, pero su uso será evaluado semestralmente. Al término de la investigación el espacio debe ser liberado.

5. Uso y manejo de reactivos y químicos

a. Todo material corrosivo, ácidos, bases y solventes deben manejarse en la campana de extracción. Por ningún motivo deben ser aspirados con la boca; siempre debe utilizarse una pipeta con bombilla o propipeta.

b. Se cuenta con hojas impresas con los procedimientos de seguridad para cada sustancia peligrosa utilizada en el laboratorio, con el fin de evitar confusiones tanto de almacenamiento como de manejo y forma de desecharla. En caso de duda o desconocimiento se debe consultar esta información o preguntar al personal de apoyo del laboratorio.

c. Electroforesis en gel: solamente se lleva a cabo la visualización de productos de PCR mediante el reactivo SYBR Safe y se hace bajo las siguientes condiciones: siempre debe manejarse con guantes y el mínimo de tiempo necesario. Los geles que contengan dicha sustancia deben desecharse en el contenedor especial. El buffer utilizado en las cámaras de electroforesis también debe desecharse en el recipiente destinado para tal fin. En el caso de derrame accidental debe limpiarse con extremo cuidado el área afectada, usando para ello guantes y, desechando al terminar el papel utilizado y los guantes en el recipiente para desechos marcado como tal. Existen tres contenedores: para geles, para buffer usado en la cámara, y para papel y guantes. Las pipetas, puntas y cristalería utilizadas serán de uso exclusivo de esta área. No se permite usarlas fuera de esta área ni introducir otras de áreas distintas.

6. Restricciones

a. Las siguientes actividades están estrictamente prohibidas dentro del laboratorio: fumar, beber, comer, almacenar alimentos y bebidas en refrigeradores o anaqueles, así como guardar cualquier tipo de artículo ajeno al laboratorio. Tampoco está permitido recibir visitas o hacer reuniones en este espacio.

b. Para evitar contaminación dentro y fuera del laboratorio **se prohíbe estrictamente salir con la bata y guantes puestos.**

7. Medidas de seguridad

a. La entrada al laboratorio es autorizada por la responsable del laboratorio. El personal de apoyo técnico tiene el derecho de contar con un juego de llaves. Otros usuarios podrán tener un duplicado de las llaves, con previo acuerdo con el responsable del laboratorio, pero esos usuarios no podrán autorizar a terceras personas de acceder al laboratorio o al equipo por su cuenta.

b. Para evitar cualquier tipo de contaminación de los usuarios y equipo, los materiales de desecho son manejados de acuerdo con las indicaciones de bioseguridad. Dependiendo del origen de los desechos estos son depositados en contenedores especiales. Habrá contenedores para líquidos volátiles, muestras orgánicas (desechos de extracción de ADN), desechos de buffers, para desechos de clonación (incluye TODO el material que ha estado en contacto con células de transformación), y desecho de consumibles que no hayan estado en contacto con materiales de clonación o sustancias cancerígenas (guantes, puntas, microtubos, papel, etc.).

c. Existen lugares designados para el botiquín de primeros auxilios y los extinguidores que el usuario deberá identificar desde un principio.

d. En caso de accidentes, emergencias o desperfectos se deberá avisar inmediatamente al responsable o las personas de apoyo técnico.

8. Obligaciones

a. En la medida de las necesidades, todos los usuarios deben cooperar en el llenado de cajas con puntas y a la esterilización de material y equipo.

b. Es obligación de cada usuario mantener limpia el área de trabajo y limpiar el material y cristalería utilizado para evitar contaminación y contacto con sustancias nocivas por un tercero. Se retirarán objetos y materiales que obstruyan el buen funcionamiento del laboratorio.

c. Se elaborará un cronograma de limpieza de sitios particulares del laboratorio de manera compartida (área, equipo y materiales de uso común).

d. Los usuarios se comprometen a hacer buen uso y estar pendientes del buen desempeño del laboratorio, equipo y materiales, así como también mantener un ambiente cordial de trabajo.

9. Sanciones

a. Al usuario que no acate los lineamientos le será restringido el uso del laboratorio y deberá reparar cualquier perjuicio causado.

10. Agradecimientos

a. En cualquier publicación que resulte del trabajo desarrollado en el laboratorio deberán reconocerse las facilidades otorgadas para la realización del mismo.

16. ¿Trabaja usted actualmente? SI NO

17. Su Profesión u Oficio

18. ¿Participa en alguna Misión gubernamental? SI NO Saltar a la 23

19.- Misiones educativas

1	Robinson 1
2	Robinson 2
3	Ribas
4	Sucre
5	Vuelvan Caras
6	Che Guevara

20. Forma de participación:

1. Estudiante

2. Facilitador

21. Misiones en Salud

1	Berrio Adentro
2	Milagro
3	José G. Hernández

22. Otras Misiones

1	Madres del Barrio
2	Hábitat
3	Mercal
4	Zamora
5	
6	

1 Universitario, empresario, ejecutivo,
 2 Técnico, comerciante, productor, perito, artista
 3 Empleado, pequeño comerciante o productor
 4 Obrero especializado, chofer, pintor, agricultor,
 5 Obrero no especializado, jornalero, serv. doméstico
 6 Trabajador(a) sexual
 7 Otra

TRAYECTORIA Y ANTECEDENTES FAMILIARES

23. ¿Sabe si su mamá tuvo abortos? SI NO 24. ¿Cuántos?

25. ¿Cuántos hijos tuvo su mamá?

26. ¿Cuántos hermanos son menores que Ud.?

27. ¿Edad de su mamá cuando Ud. Nació? años

28. ¿A quienes considera responsables de su crianza? Padre Madre Ambos

Abuelo(a) Tío(a) Hermano(a) Otro

29. ¿Cuántas personas vivían en el hogar en el cual Ud. Se crió?

30. ¿Cuántos cuantos tenían para dormir?

31. ¿Conoce de antecedentes familiares de Cáncer en su familia? SI NO

32. Si la respuesta es afirmativa, indique en que lugares (selección múltiple)

1	Cuello del Utero
2	mama
3	Torax
4	Abdomen
5	Higado/Bazo
6	Cabeza-Cuello
7	Hemáticos
8	Ovario
9	Oseo
10	Cerebral
11	Próstata
12	Penis
13	Anal
14	No sabe

TRAYECTORIA Y ANTECEDENTES PERSONALES

33. ¿Ha tenido Ud. mas de una pareja sexual a la vez en algún momento de su vida? SI NO

34. N° de parejas sexuales que ha tenido en el pasado

35. N° de parejas sexuales actualmente

36. ¿A padecido algún tipo de cáncer? (selección múltiple)

SI NO

1	Cuello del Utero
2	mama
3	Torax
4	Abdomen
5	Higado/Bazo
6	Cabeza-Cuello
7	Hemáticos
8	Ovario
9	Oseo
10	Cerebral
11	Próstata
12	Penis
13	Anal
14	No sabe

37. Enfermedades que ha padecido a lo largo de su vida: (selección múltiple)

1	Hipertensión/ Cardiovasculares
2	Diabetes
3	Enf. Pulmonar crónica
4	Artritis
5	Lupus
6	Esclerosis
7	Alergias
8	Otras
9	Ninguna

Infecciones de Transmisión Sexual (ITS)

38. ¿Conoce Ud. las infecciones de transmisión sexual?

SI NO Saltar a la 45

39. ¿Cuáles infecciones de transmisión sexual conoce Ud.?

1	
2	
3	
4	
5	
6	

40. ¿Padece o ha padecido alguna de las siguientes ITS? (selección múltiple)

1. Sífilis	<input type="checkbox"/>
2. Gonorrea	<input type="checkbox"/>
3. VPH	<input type="checkbox"/>
4. HIV/SIDA	<input type="checkbox"/>
5. Chancro	<input type="checkbox"/>
6. Herpes simple	<input type="checkbox"/>
7. Chlamydia	<input type="checkbox"/>
8. Vaginitis	<input type="checkbox"/>
9. Ninguna	<input type="checkbox"/>

41. ¿Sabe como evitar las infecciones de transmisión sexual?

SI ¿Cómo? _____ NO Saltar a la 45

42. ¿Sabe adónde acudir si sospecha que tiene una infección de transmisión sexual?

SI NO Saltar a la 45

43. ¿A quién acudiría?

1. Padres	<input type="checkbox"/>
2. Amigos	<input type="checkbox"/>
3. Médicos	<input type="checkbox"/>
4. Familiares	<input type="checkbox"/>
5. Otro ¿Cuál?	<input type="checkbox"/>

44. ¿Por qué vía ha recibido información sobre ITS? (selección múltiple)

1. TV	<input type="checkbox"/>
2. Prensa	<input type="checkbox"/>
3. Radio	<input type="checkbox"/>
4. Amigos	<input type="checkbox"/>
5. Padres	<input type="checkbox"/>
6. Familiares	<input type="checkbox"/>
7. Revistas	<input type="checkbox"/>
8. En clase	<input type="checkbox"/>
9. Profesores	<input type="checkbox"/>
10. Internet	<input type="checkbox"/>

45. ¿Ha recibido información sobre salud sexual y reproductiva?

SI NO

Solo para Mujeres

46. ¿A qué edad tuvo su 1ra. menstruación? años

47. ¿Ha estado embarazada? SI NO Saltar a la 63

48. ¿Cuántos embarazos ha tenido?

49. ¿Cuántos partos ha tenido?

50. ¿Cuántos hijos ha tenido?

51. ¿A qué edad quedó embarazada por primera vez? años

Solo para Hombres

55. ¿Ha procreado Ud. Embarazos? SI NO Saltar a la 63

56. ¿Cuántos hijos? SI NO Saltar a la 63

57. ¿Alguno de esos embarazos ha terminado en aborto? SI NO Saltar a la 60

58. ¿Cuántos abortos? SI NO Saltar a la 60

59. ¿Estuvo de acuerdo con que se practicaran esos abortos? SI NO No le consultaron

60. ¿Tiene hijos? SI NO Saltar a la 63

61. ¿Cuántos?

62. ¿Qué edad tenía Ud. Cuando nació su primer hijo? años

63. ¿Está de acuerdo con las relaciones sexuales pre-matrimoniales? SI NO

64. ¿Está de acuerdo con las relaciones sexuales extra-matrimoniales? SI NO

65. ¿Cómo se define Ud. Sexualmente en este momento?

1. Heterosexual	<input type="checkbox"/>
2. Homosexual	<input type="checkbox"/>
3. Bisexual	<input type="checkbox"/>
4. Transsexual	<input type="checkbox"/>
5. Otro indique:	<input type="text"/>

66. ¿Conoce Ud. Métodos anticonceptivos? SI NO Saltar a la 72

67. ¿Cuáles métodos anticonceptivos conoce?

68. ¿Utiliza Ud. Métodos anticonceptivos, cuales? (selección múltiple)

Método	Actual	Utilizó
1. Dispositivo intrauterino	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Diafragma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Espármicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Método del ritmo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Coito interrumpido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Inyección hormonal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Píldora anticonceptiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Abstinencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Ninguno	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

69. ¿Conoce Ud. Métodos de prevención de ITS? SI NO Saltar a la 72

70. ¿Cuáles métodos de prevención de ITS conoce?

Método	Actual	Utilizó
1. Condón masculino	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Condón femenino	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Diafragma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Gales Microbiodas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Barrera oral	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Abstinencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Otro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Ninguno	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

HABITOS

72. ¿Ud. Fuma o ha fumado cigarrillos?	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
73. N° de cigarrillos diarios que fuma o fumaba	<input type="text"/>	<input type="text"/>
74. ¿Por cuantos años ha fumado?	<input type="text"/>	<input type="text"/>
75. ¿Consume o ha consumido alcohol?	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
76. ¿Cuantos días a la semana consume o consumió?	<input type="text"/>	<input type="text"/>
77. ¿Por cuantos años ha consumido?	<input type="text"/>	<input type="text"/>
78. ¿Ud. Consume o ha consumido café?	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
79. ¿Cuántas tazas consume al día?	<input type="text"/>	<input type="text"/>
80. ¿Por cuantos años ha consumido?	<input type="text"/>	<input type="text"/>

81. ¿Ud. Consume o ha consumido drogas?

SI NO

82. Si la respuesta es afirmativa

Forma de consumo	1	2	3	4	5
Fumada	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Inhalada	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Inyectada	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Tomada	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Otra forma	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>



84. ¿Cuáles son las razones o causas por las cuales Ud. asiste a este centro de salud?

1	Prevención
2	Control médico
3	Sospecha de algún trastorno
4	Recomendación médica
5	Tratamiento
6	Sugerencia de familiar o amigo
7	Otra razón ¿Cuál?

Observaciones:

Encuestador: _____

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aboukassim T, Yasmeeen A, Akil N, Batist G, Al Moustafa A. Incidence of Epstein-Barr virus in Syrian women with breast cancer: A tissue microarray study. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; **11(4)**: 951-955.
2. Aguayo F, Khan N, Koriyama C, González C, Ampuero S, Padilla O, et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from Chile. *Infect. Agents. Cancer.* 2011; **6**:7.
3. Aguilar M, González E, García P, Álvarez J, Padilla C. Obesidad y niveles séricos de estrógenos; importancia en el desarrollo precoz del cáncer de mama. *Nutr. Hosp.* 2012; **27(4)**: 1156-1159.
4. Akil N, Yasmeeen A, Kassab A, GhabreuL, Darnel A, Moustafa A. 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.* 2008; **99**: 404 – 407.
5. Alfonzo B, Lozada E, Correnti M, Cavazza M, Michelli E, Salma N. Detección del virus papiloma humano en muestras cervicales de una población de estudiantes de la Universidad Central de Venezuela. *Rev. Fac. Med.* 2003; **26(2)**:120-126.
6. Álvarez M, Chiarello A, Espinal E, Reigosa A, Marrero M. Detección y tipificación del virus papiloma humano (VPH) en un grupo de pacientes con sospecha clínica y l0 anatomo-patológica de infección por VPH. Universidad de Carabobo. 2000; **4(2)**.
7. American Academy of Family Phisicians (AAFP). Cáncer. [Internet]. Estados unidos: Editorial staff. Junio 2002. [Última actualización: febrero, 2014; Consulta: septiembre, 2014]. Disponible en: <http://familydoctor.org/familydoctor/en/diseases-conditions/cancer.html>.
8. Andújar M. Virus y cáncer. [Internet]. *Biocancer.* 2004; 1 [Consulta: septiembre, 2014]. Disponible en: http://www.biocancer.com/?q=system/files/Virus_y_cancer.pdf.

9. Antonsson A, Spurr T, Chen A, Francis G, McMillan N, Saunders N, et al. High Prevalence of Human Papillomaviruses in Fresh Frozen Breast Cancer Samples. *J. Med. Virol.* 2011; **83**: 2157–2163.
10. Arbach H, Viglasky V, Lefeu F, Guinebretiere J, Ramirez V, Bride N, et al. Epstein-Barr Virus (EBV) Genome and Expression in Breast Cancer Tissue: Effect of EBV Infection of Breast Cancer Cells on Resistance to Paclitaxel (Taxol). *J. Virol.* 2006; **80(2)**: 845–853.
11. Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V, y colaboradores. Oncoguía: Cáncer de mama. *Rev. Inst. Nac. Cancerol.* 2011; **6**: 77 – 86.
12. Bascones A, Pousa X. Herpesvirus. *Av. Odonto. estomatol.* 2011; **27 (1)**: 11-24.
13. Bland K. La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. Tercera edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007.
14. Bonnet M, Guinebretiere J, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, Joab I. Detection of Epstein-Barr Virus in Invasive Breast Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; **91(16)**: 1376-1381.
15. Bodaghi S, Wood L, Roby G, Ryder C, Steinberg S, Zheng Z. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43(11)**: 5428–5434.
16. Brink A, van de Brule A, van Diest P, Meijer C. Detection of Epstein - Barr virus invasive breast cancers. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2000; **92(8)**: 655-656.
17. Calle E, Heath C, McMahon H, Coates R, Liff J, Franceschi S, et al. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* 1996; **347**: 1713-27.
18. Cantú de León D, Pérez D, Nemcova J, Myskyskova I, Turcios E, Villavicencio V, et al. Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer.* 2009; **9**:26.
19. Chang P, Wang T, Yao Q, Lv Y, Zhang J, Guo W, et al. Absence of human papillomavirus in patients with breast cancer in north-west China. *Med. Oncol.* 2012; **29**: 521–525.

20. Cheang M, Chia S, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; **101**: 736-750.
21. Chouhy D, Bolatti E, Piccirilli G, Sánchez A, Fernandez R, Giri A. Identification of HPV-156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments. *JGV Papers in Press.* 2012.
22. Chu J, Chen C, Chang K. In situ detection of Epstein–Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett.* 1998; **124**: 53–57.
23. Chu P, Chang K, Chen Y, Chen W, Weiss L. No significant association of Epstein - Barr virus infection with invasive breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2001; **159(2)**: 571-578.
24. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001; **344 (4)**: 276-285.
25. Coleman M, Quaresma M, Berrino F, Lutz J, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008; **9**: 730–756.
26. Contreras L, Correnti M, Avila M, Guerrero A, León A. Virus Papiloma Humano (VPH) en contexto ecológico venezolano. (I): diagnóstico citológico y molecular. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.* 2008; **12(3)**: 39-44.
27. Cooper G. The cell: A molecular approach. Segunda edición. Boston: Sinauer Associates; 2000.
28. Corbex M, Bouzbid S, Traverse-Glehen A, Aouras H, McKay-Chopin S, Carreira C, et al. Prevalence of Papillomaviruses, Polyomaviruses, and Herpesviruses in Triple-Negative and Inflammatory Breast Tumors from Algeria Compared with Other Types of Breast Cancer Tumors. *Plos One.* 2014.; **9(12)**: 1-15.
29. De Guglielmo Z, Ávila M, Correnti M, Veitia D, Cavazza M. Evaluación, mediante RCP, de la infección por el virus de papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2008; **68(4)**: 240-247.

30. De Guglielmo Z, Rodríguez A, Ávila M, Veitía D, Fernandes A, Correnti M. Virus de papiloma humano y factores de riesgo: en el desarrollo de cáncer cérvico uterino. *Rev Venez Oncol*. 2010; **22(1)**:32-38.
31. De Villiers E, Sandstrom R, zurHausen H, Buck C. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res*. 2005; **7**:1-11.
32. Dikshit R, Yeole B, Nagrani R, Dhillon P, Badwe R, Bray F. Increase in breast cancer incidence among older women in Mumbai: 30-Year trends and predictions to 2025. *Cancer Epidemiol*. 2012; **36**: 215–220.
33. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante M. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*. 1992; **21**: 95-100.
34. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo I, Stoler M, Broker T, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; **30**: 55–70.
35. Duarte J, Bustamante M, Wolp R, Goncalves H, Marinho T, Gialho G, et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2011; **58(2)**:178-187.
36. Dumitrescu R, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?. *J. Cell. Mol. Med*. 2005; **9(1)**: 208-221.
37. Else E, Swoyer R, Zhang Y, Taddeo F, Bryan J, Lawson J, et al. Comparison of Real-Time Multiplex Human Papillomavirus (HPV) PCR Assays with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Assay. *J. Clin. Microbiol*. 2011; **49**: 1907–1912.
38. Epstein M, Henle G, Achong B, Barr Y. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*. 1965; **121**:761–770.
39. Fadavi P, Rostamian M, Arashkia A, Shafaghi B, Mahmoudzadeh H. Epstein-Barr virus may not be associated with breast cancer in Iranian patients. *OncolDiscov*. 2013; **1(3)**:10.
40. Fawzy S, Sallam M, Mohammad N. Detection of Epstein–Barr virus in breast carcinoma in Egyptian women. *Clin. Biochem*. 2008; **41**: 486–492.

41. Fernandes A, Pesci-Feltri A, García I, Guida V, Salazar J, Rodríguez C, y colaboradores. Evaluación de la infección por Virus de Papiloma Humano en pacientes con cáncer de mama. *RevVenezOncol*. 2015a; **27(1)**:22-29.
42. Fernandes A, Bianchi G, Pesci-Feltri A, Pérez M, Correnti M. Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. *Ecancer*. 2015b, **9**:548.
43. Fidel L, Ferres M, Spencer E. *Virología Clínica*. Primera edición. Chile: Editorial Mediterráneo; 2012.
44. Fina F, Romain S, Oufik L'H, Palmari J, Ben Ayed F, Benharkat S, et al. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br. J. Cancer*. 2001; **84(6)**: 783-790.
45. Forman D, Bray F, Brewster D, Gombe C, Kohler B, Piñeros M. Cancer Incidence in five Continents. *IARC Sci. Publ.* Nº 164 [Internet]. France; 2014. [Consulta: marzo 2015]; Volumen X. Disponible: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/epi/sp164/CI5volX_Full.pdf.
46. Frazer I. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat. Rev. Immunol*. 2004; **4**:46-54.
47. Fu L, Wang D, Shah W, Wang Y, Zhang G, He J. Association of Human Papillomavirus Type 58 With Breast Cancer in Shaanxi Province of China. *J. Med. Virol*. 2015. 1-7.
48. García S, Sánchez A, Doreste J, Serra L. Alcohol y tabaco: Factores de riesgo de cáncer. [Internet]. *Biocancer Research J*. 2004; **1**. Editor: Domingo Navarro Bosch. [Última actualización: 2010; Consulta: septiembre, 2014]. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/208/alcohol-y-tabaco-factores-de-riesgo-de-cancer>.
49. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from Human Papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010; **40(1)**: 1-13.
50. Glaser S, Ambinder R, DiGiuseppe J, Horn-Ross P, Hsu J. Absence of Epstein-Barr Virus EBER-1 transcripts in an epidemiologically diverse group of breast cancers. *Int. J. Cancer*. 1998; **75**: 555-558.

51. Glenn W, Heng B, Delprado W, Lacopetta B. Epstein-Barr Virus, Human Papillomavirus and Mouse Mammary Tumor virus as multiple viruses in breast cancer. *Plos one*. 2012; **7(11)**: 10.
52. GLOBOCAN Cancer (IARC). Fact Sheets: Breast Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2015. [Consulta: abril, 2015]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breastnew.asp>.
53. Goldhirsch A, Wood W, Coates A, Gelber R, Thurlimann B, Senn H. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011; **22**: 1736–1747.
54. Hachana M, Ziadi S, Amara K, Toumi I, Korbi S, Trimeche M. No evidence of Human papillomavirus DNA in breast carcinoma in Tunisian patients. *The Breast*. 2010: 541-544.
55. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; **100**: 57–70.
56. Hedau S, Kumar u, Hussain S, Shukla S, Pande S, Jain N, et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: No evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer*. 2011; **11**:27.
57. Henning E, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland J. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res. Treat.* 1999; **53**: 121–135.
58. Hernández D, Borgas R, Marquez G, Betancourt L. Factores de riesgo conocidos para cáncer de mama. *Rev. Venez. Oncol.* 2010; **22(1)**:16-31.
59. Hernández D, Borgas R, Betancourt L. Cáncer de mama en mujeres de edad media evaluación de los factores de riesgo. *Rev. venez. oncol.* 2011; **23(4)**: 238-245.
60. Herrera R, Vela T, Carrillo A, Lizano M, Amador A, Oñate L, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. *BMC Cancer*. 2013; **13**:445.
61. Herrera-Goepfert R, Vela T, Carrillo A, Lizano M, Amador A, Oñate L, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. *BMC Cancer*. 2013; **13**:445.

62. Hómez B. Hormonas en la mama: de la fisiología a la enfermedad. Revisión. *Rev Venez Endocrinol Metab.* 2008; **6(2)**: 9-14.
63. Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete M, Fonfach C. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuad. Cir.* 2011; **25**: 67-74.
64. Joshi D, Quadri M, Gangane N, Joshi R, Gangane N. Association of Epstein-Barr Virus infection (EBV) with Breast Cancer in rural Indian women. *Ploss one.* 2009. **4(12)**:8.
65. Junker A, Thomas E, Radcliffe A, Forsyth R, Davidson G, Rymo L. Epstein-Barr Virus Shedding in Breast Milk. *Am. J. Med. Sci.* 1991.
66. Kadivar M, Monabati A, Joulace A, Hosseini N. Epstein-Barr Virus and breast cancer: lack of evidence for an association in Iranian women. *Pathol. Oncol. Res.* 2011; **17**:489-492.
67. Kang M, Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* 2015; **47**: 2-16.
68. Khan N, Castillo A and Koriyama C et al. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br. J. Cancer.* 2008; **99**: 408-414.
69. Kleter B, van Doorn L, Schegget J, Scharauwen L, van Krimpen K, Burger M, et al. Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses. *AJP* .1998. **153(6)**: 1731-1739.
70. Labrecque L, Bames D, Fentiman I. Epstein - Barr virus in Epithelial Cell Tumors: A Breast Cancer Study. *Cancer Res.* 1995; **55**:39-45.
71. Lacey J, Kreimer A, Buys S, Marcus P, Chang S, Leitzmann M. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer.* 2009; **9**: 84-91.
72. Lacruz C, Di Martino B, Álvarez E. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (HPV) en las lesiones escamosas del cérvix uterino. *Rev. Esp. Patol.* 2003; **36 (1)**: 79-84.
73. Laherty C, Hu H, Opiari A, Wang F, Dixit V. The Epstein - Barr virus LMP1 Gene Product Induces A 20 Zinc Finger Protein Expression by Activating Nuclear Factor KB. *J. Biol. Chem.* 1992; **267(34)**: 24157-24160.

74. Lawson J, Glenn W, Salmons B, Ye Y, Heng B, Moddy P, et al. Mouse Mammary Tumor Virus-like Sequences in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 2010; **70(9)**: 3576-3585.
75. Li T, Lu Z, Guo M, Wu Q, Chen K, Xing H. p53 Codon 72 Polymorphism (C/G) and the Risk of Human Papillomavirus Associated Carcinomas in China. *Cancer.* 2002; **95(12)**: 2571-2576.
76. Lin J, Tsai C, Chu J, Chen J, Takada K, Shew J. Dysregulation of HER2/HER3 Signaling Axis in Epstein-Barr Virus-Infected Breast Carcinoma Cells. *J. Virol.* 2007; **81(11)**:5705–5713.
77. Lindel K, Forster A, Altermatt H, Greiner R, Gruber G. Breastcancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *The breast.* 2007; **16(2)**: 172-177.
78. Longnecker M, Bernstein L, Paganini-Hill A. Cancer epidemiology, biomarkers and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; **5**:961-965.
79. López J, Aristizábal F. Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 2006; **35 (1)**: 5-32.
80. Lorenzetti M, De Matteo E, Gass H, Martinez P, Lara J, Gonzalez P, et al. Characterization of Epstein Barr Virus Latency Pattern in Argentine Breast Carcinoma. *. Plos One.* 2010; **5(10)**: 1- 7.
81. Mant C, Hodgson S, Hobday R, D'Arrigo C, Cason J. A viral etiology for breast cancer: time to re-examine the postulate. *Intervirol.* 2004; **47**: 2-13.
82. Manzouri L, Salehi R, Shariatpanahi S, Rezaie P. Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005-2009 in Isfahan. *Adv. Biomed. Res.* 2014; **3**: 75.
83. Márquez M, Lacruz J, López F, Borges R. Sobrevida en pacientes con cáncer de mama triple negativo. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2012;**72(3)**:152-160.
84. Marrão G, Habib M, Paiva A, Bicout D, Fallecker C, Franco S, et al. Epstein-Barr virus infection and clinical outcome in breast cancer patients correlate with immunecell TNF- α /IFN- γ response. *BMC Cancer.* 2014; **14**:665.
85. Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonner P, Martín P. Outcome of Epstein-Barr virus-associated primary breast cancer. *Mol.Clin.Oncol.* 2015; **3**: 295-298.

86. Michelli E, Tellez L, Mendoza J, Noguera M, Milano M, Vera R, Callejas N. Amplification of human papillomavirus early genes for detection of nine genotypes in Venezuelan women. *Invest. Clin.* 2013; **54(4)**: 1-11.
87. Miller W, Earp H, Raab N. The Epstein - Barr virus Latent Membrane Protein 1 Induces Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Virol.* 1995; **69(7)**: 4390-4398.
88. Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Anuario de Mortalidad 2011 de Venezuela. [Internet] Caracas, Venezuela: enero 2014 [Consulta: septiembre, 2014]. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915.
89. Morales A, Fuentes E. Human Viruses and Cancer. *Viruses.* 2014; **6**: 4047-4079.
90. Mou X, Chen L, Liu F, Shen Y, Wan H, Li Y, et al. Low Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Chinese Patients with Breast Cancer. *J. Int. Med. Res.* 2011; **39**: 1636 - 1644.
91. Muñoz M, Mendoza J, Tellez L, Noguera M, Moret O, López M, y col. Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cérvix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev. Biomed.* 2003; **14**:61-68.
92. Navarro D. Virus del papiloma humano. [Internet]. *Biocancer Res. J.* 2004; 1. [Última actualización: 2010, Consulta: Abril, 2014]. Disponible: <http://www.biocancer.com/journal/995/42-estructura-genica>.
93. Navas M. 2008. Virus Oncogénicos Págs. 123-147 en: Silvio Urcuquiy Jorge Ossa (eds.), Principios de Virología. Biogénesis, Cuarta edición, Colombia.
94. Nidal M. Association of Epstein-Barr virus infection and breast carcinoma. *Arch Med Sci.* 2013; **9(4)**: 745-751.
95. Odumade O, Hogquist K, Balfour H. Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein - Barr virus Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011: 193-209.
96. Organización Mundial de la Salud (OMS) [Internet] Global Health Observatory: Cáncer mortality and morbidity; [Consulta: septiembre, 2014] Disponible en: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/.

97. Parkin D. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer*. 2006; 118: 3030–3044.
98. Pathmanathan R, Prasad U, Chandrika G, Sadler R, Flynn K, RaabTraub N. Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia. *Am J Pathol*. 1995; **146**: 1355–67.
99. Peralta O. Cáncer de Mama. Epidemiología y factores de riesgo. *Cuad. Méd. Soc.* 2007; **47 (1)**: 18-30.
100. Pérez G. Virus Epstein-Barr. [Internet]. 2014 [Consulta: enero 2015]. Disponible en: http://www.enfermedadeldesobeso.com/virus_de_epstein-barr.
101. Piana A, Sotgiu G, Muroli M, Cossu-Rocca P, Castiglia P, De Miglio M. HPV infection and triple-negative breast cancers: an Italian case-control study. *Virology*. 2014, **11**:190.
102. Picconi María. Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. *Medicina*. 2013; **73(6)**: 585-596.
103. Porter P. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Publica Mex.* 2009; **51 (2)**:141-146.
104. Preciado M, Chabay P, Actis A, Gass H. Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Argentina. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005; **129**: 371-381.
105. Puig L, Menéndez A, Cortes X, Bosch F, Torné A, Castellsagué X, y colaboradores. La infección por Papilomavirus. Documentos Consenso S.E.G.O. 2002.
106. Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Hernández D, Rodríguez A, Puig J. Detección molecular de VPH por PCR-RFLP en muestras del área anogenital de hombres del estado Mérida, Venezuela. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2013; **73(4)**: 1-7.
107. Reigosa A, Álvarez M, De Vasconcelo M, Cristina R, Salas W, Rebolledo V y col. Diagnóstico del virus Papiloma Humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica. *Rev. Fac. Cienc. Salud. Universidad de Carabobo*. 2004; **8(1)**.

108. Richardson A, Currie M, Robinson B, Morrin H, Phung Y, Pearson J, et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Breast Cancer. *Plos one*. 2015; **10(2)**: 1-14.
109. Rickinson A. Co-infections, inflammation and oncogenesis: Future directions for EBV research. *Semin. Cancer Biol*. 2014: 1-17.
110. Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2006; **71(2)**: 135-140.
111. Rivero E. Detección del virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez*. 2007; **67(1)**: 1-7.
112. Ronald T, Janet S. The history of tumor virology. *Cancer Res*. 2008; **68(19)**: 7693-7706.
113. Rous P. Transmisión de un crecimiento maligno mediante un filtrado libre de células. *J. Am. Med. Assoc*. 1911; **56**:198. Traducción autorizada de Jorge E Ossa. L.
114. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Annals Oncol*. 2001; **12(I)**: S3-S8.
115. Ruiz A y Latajert M. Anatomía Humana. Cuarta Edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2008.
116. Sánchez J, Cortiñas P, Loureiro C, Helene F, Medina F, Capote L, et al. Human papillomavirus in invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 in Venezuela: A cross-sectional study. *Cáncer Epidemiol*. 2012; **36**:284-287.
117. Sandhu R, Parker J, Jones W, Livasy C, Coleman W. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Lab. Med*. 2010; **41(6)**:364-372.
118. Sanoja L. Detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de polimerasa, en muestras cervicales de estudiantes. *Comunidad y Salud*. 2013; **11(2)**: 1-10.

119. Scoccianti C, Lauby-Secretan B, Bello P, Chajes V, Romieu I. Female Breast Cancer and Alcohol Consumption. *Am J Prev Med* 2014; **46(31)**: 16-25.
120. Shope R, Hurst E. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med.* 1933; **58**:607-624.
121. Shors T. Virus: estudio molecular con orientación clínica. Primera edición. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. [Consulta: octubre 2014]. Disponible en: <https://books.google.co.ve/books?id=T7Q1CBUlq0cC&pg=PA263&dq=estructura+de+papilomavirus&hl=es19&sa=X&ei=017LVPTuH9HasATxmYHIBQ&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=estructura%20de%20papilomavirus&f=false>.
122. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron J, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS.*2003; **100(14)**: 8418-8423.
123. Speck P, Longnecker R. Infection of Breast Epithelial Cells With Epstein-Barr Virus Via Cell-to-Cell Contact. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; **92(22)**: 1849-1851.
124. Straus S, Cohen J, Tosato G, Meier J. Epstein-Barr Virus Infections: Biology, Pathogenesis, and Management. *Ann Intern Med.* 1993; **118(1)**:45-58.
125. Tao Q, Young L, Woodman C, Murray P. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers - Genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front. Biosci.* 2006; **11**: 2672-2713.
126. Tavassoli F, Devilee P. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press: Lyon*, 2003.
127. Temin H. The DNA Provirus Hypothesis: The establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis. *Science.* 1976; **192**: 1075-1080.
128. Thorley D, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N Engl J Med.* 2004; **350**:1328-37.
129. Tugizov S, Berline J, Palefsky J. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nature Medice.* 2003; **9(3)**: 307-314.

130. Uribe J, Hernández C, Menolascino F, Rodriguez J, Istúriz L, Márquez M y col. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Rev. Venez. Oncol.* 2010;**22(2)**:109-116.
131. Van Dongen J, Langerak A, Brüggemann M, Evans P, Hummel M, Lavender F, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003; **17**: 2257–2317.
132. Vernet M, Mena M, Alemany L, Bravo I, De SanJosé S, Nicolau P, et al. Human Papillomavirus and Breast Cancer: No Evidence of Association in a Spanish Set of Cases. *Anticancer Res.* 2015;**35**: 851-856.
133. Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *Clin. Diagn. Virol.* 2004; **31**: 292–297.
134. Wolf H, Haus M, Wilmes E. Persistence of Epstein - Barr virus in the Parotid Gland. *J. Virol.* 1984: 795-798.
135. Wrede D, Luqmani Y, Coombes R, Vousden K. Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 1992; **65**: 891-894.
136. Xue S, Lampert I, Haldane J, Bridger J and Griffin B. Epstein–Barr virus gene expression in human breast cancer: protagonist or passenger?. *Br. J. Cancer.* 2003; **89**: 113 – 119.
137. Yahia Z, Adam A, Elgizouli M, Hussein A, Masri M, Kamal Mayada, et al. Epstein-Barr virus: a prime candidate of breast cancer aetiology in Sudanese patients. 2014; **9**:9.
138. Yasmeen A, Bismar T, Dekhil H, Ricciardi R, Kassab A, Gambacorti-Passerini C, et al. ErbB-2 receptor cooperates with E6/E7 oncoproteins of HPV type 16 in breast tumorigenesis. *Cell Cycle.* 2007; **6**: 2939 –2943.
139. Young L, Murray P. Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene.* 2003; **22**: 5108–5121.
140. Zheng Z, Baker C. Papillomavirus genome structure, expression, and Post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006; **11**: 2286–2302.

141. zurHausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm G. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*. 1974; **13**:650–6.
142. zurHausen. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virology*. 2009: 1–10.