



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Detección del Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo
Tipo 16 (HPV-16) en muestras de biopsias de
carcinoma mamario del Hospital Santa Rosa, 2019**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Meyling Lizandra VILCAPOMA DIAZ

ASESOR

Dr. Enrique Walter MAMANI ZAPANA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vilcapoma, M. (2021). *Detección del Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo Tipo 16 (HPV-16) en muestras de biopsias de carcinoma mamario del Hospital Santa Rosa, 2019*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0003-4177-8268
DNI del autor	73883527
Código ORCID del asesor (es)	https://orcid.org/0000-0003-4127-1248
DNI del asesor	02414092
Grupo de investigación	ECOVIRUS
Financiamiento	Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de investigación y posgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (B19102081)
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>El presente estudio se limitó al HSR, laboratorio de Histopatología, ubicado en la Av. Simón Bolívar 8, Distrito de Pueblo Libre 15084 (entidad que nos proporcionó las muestras del año 2019) y a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Virología Clínica y Molecular, situado en la Ciudad Universitaria - UNMSM, Cercado de Lima; donde se ejecutó el procesamiento de las muestras (extracción del ADN, concentración del ADN, calidad del ADN y PCR en Tiempo Real).</p> <p>Coordenadas geográficas:</p> <p>*FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS: Ciudad Universitaria de la Universidad de San Marcos, Lima, Perú Coordenadas: 12°03'35"S 77°04'56"O</p> <p>*HOSPITAL SANTA ROSA Av. Simón Bolívar 8, Pueblo Libre 15084 COORDENADAS: Latitud & longitud:</p>

	-12.07207945, -77.0610369112724
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019
Disciplinas OCDE	https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 17:05 horas del 05 de julio de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/ivv-ntgq-dba>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **MEYLING LIZANDRA VILCAPOMA DIAZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210031246, la titulando expuso su tesis: **“DETECCIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO TIPO 16 (HPV-16) EN MUESTRAS DE BIOPSIAS DE CARCINOMA MAMARIO DEL HOSPITAL SANTA ROSA, 2019”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **MEYLING LIZANDRA VILCAPOMA DIAZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 19:20 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 05 de julio de 2021.



Firmado digitalmente por MAYTA
HUATUCO Egma Marcelina FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.07.2021 18:52:55 -05:00

**Dra. EGMA MAYTA HUATUCO
(PRESIDENTA)**

**Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(ASESOR)**



Firmado digitalmente por ALZAMORA
GONZALES Libertad FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.07.2021 18:58:00 -05:00

**Dra. LIBERTAD ALZAMORA GONZALES
(MIEMBRO)**

**Dr. MARCOS SULCA LÓPEZ
(MIEMBRO)**

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fuente de luz en este largo sendero y por bendecirme con la materialización de este sueño anhelado.

A mis padres Jorge Vilcapoma Guevara y Elia Diaz Araujo por su apoyo incondicional a pesar de la distancia física, por enseñarme que los sueños se hacen realidad a base de esfuerzo y perseverancia.

A mi hermana Lizbeth por confiar en mí y estar en los momentos más importantes de mi vida.

A mi compañero de vida Pedro por darme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente y por alentarme hasta el final.

A mis pequeños Matthew y Carlitos por ser mis motivos más grandes para finalizar con éxito la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A mi asesor de tesis, el Dr. Enrique Mamani Zapana por confiar en mí, por guiarme acertadamente en este arduo proceso, gracias por compartirme sus conocimientos, por sus consejos, por su paciencia, por su amistad, por motivarme a seguir creciendo profesionalmente y por facilitarme todos los equipos necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A la Dra. Egma Mayta por brindarme conocimientos actuales en temas específicos de virus, en la línea de virus carcinogénicos como HPV, HTLV, entre otros y por permitirme utilizar los espacios y equipos del laboratorio de Virología Clínica y Molecular para la ejecución de este proyecto.

Al Hospital Santa Rosa por proveer las muestras de biopsias de carcinoma mamario del periodo enero – abril del 2019 para el desarrollo del presente trabajo. Especialmente al Dr. Nazario Ortiz por ayudarme con toda la parte burocrática y hacer posible el acceso a los materiales biológicos.

Al Dr. Ricardo Iwasaki por proporcionarme muestras del HPV-16 positivo para cáncer de cérvix.

A mis revisores, el Dr. Marcos Sulca y la Dra. Libertad Alzamora por su tiempo, compromiso y apoyo constante para la mejora de este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas por todos sus conocimientos impartidos que forman la base de mi vida profesional.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio de Virología Clínica y Molecular, especialmente a Joe Hermosilla, muchas gracias por tu asesoramiento en la técnica de qPCR.

A Arturo Liñan, gracias por tu apoyo en este proceso de titulación y a mi amiga Arlene, por ser parte de mi vida universitaria y por su ánimo constante para culminar la redacción de mi tesis.

Al Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de investigación (VRI) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el financiamiento otorgado para concretar el proyecto de tesis.

¡Gracias infinitas a todos!

ABREVIATURAS

CaCu	: Cáncer cérvico uterino
CaMa	: Cáncer de mama
CDC	: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
Ct	: Cycle Threshold
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ESMO	: European Society for Medical Oncology
E6	: Oncoproteína E6
E7	: Oncoproteína E7
HPV	: Virus Papiloma Humano
HSR	: Hospital Santa Rosa
IARC	: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IHC	: Inmunohistoquímica
MINSA	: Ministerio de Salud del Perú
NIH	: National Institutes of Health/ Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos
OMS	: Organización Mundial de la Salud
OPS	: Organización Panamericana de la Salud
PE	: Promotor de expresión temprana (Early)
PCR	: Reacción en cadena de la Polimerasa
PL	: Promotor de expresión tardía (Late)
P670	: Promotor 670
P97	: Promotor 97
qPCR	: PCR en Tiempo Real
SEOM	: Sociedad Española de Oncología Médica
UNMSM	: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE IMÁGENES	X
ÍNDICE DE ANEXO	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1. A nivel Internacional.....	5
2.2. A nivel Nacional.....	9
III. MARCO TEÓRICO	10
3.1. Cáncer.....	10
3.2. Cáncer de mama.....	11
3.2.1. Tipos de cáncer de mama.....	11
.....	15
3.3. Grado histológico de CaMa	15
3.4. Factores de riesgo del cáncer de mama	16
3.5. Virus Papiloma Humano	19
3.5.1. Organización del genoma viral	20
3.5.2. Clasificación filogenética del HPV	22
3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR en Tiempo Real).....	24
3.6.1 Sondas de hidrólisis	26
3.7. Inmunohistoquímica (IHQ)	28
3.7.1 Fundamento	29
3.7.2. Cáncer de mama y receptores hormonales.....	29
IV. FORMULACIÓN E HIPÓTESIS	33
4.1. Formulación.....	33
4.2. Hipótesis.....	33
V. OBJETIVOS	34

5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos específicos	34
VI. VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN.....	35
6.1 Variable dependiente	35
6.2 Variables independientes	35
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
7.1. Diseño de investigación.....	36
7.2. Delimitación espacial.....	36
7.3. Población y muestra	36
7.4. Muestra biológica.....	36
7.5. Colección de muestras	37
7.6. Aprobación del proyecto	37
7.7. Experimentación.....	37
7.7.1. Extracción del ADN	37
7.7.2. Concentración y calidad del ADN.....	40
7.7.3. PCR en Tiempo Real	41
7.7.4. Análisis Inmunohistoquímico (IHQ)	43
VIII. RESULTADOS.....	44
8.1. Concentración y calidad de los ADN extraídos de las muestras de CaMa	44
8.2. PCR en Tiempo Real.....	45
8.2.1. PCR en Tiempo Real para los controles positivos	45
8.2.2. PCR en Tiempo Real para las 32 muestras con CaMa del H.S.R.	46
8.2.3. Curvas sigmoideas de las muestras 19-742 ONCO, 19-811 ONCO, 19-722 ONCO y 19-753 ONCO	47
8.2.4. Relación de la ausencia/presencia del HPV-16 y el tipo de CaMa	48
8.2.5. Relación de la ausencia/presencia del HPV-16 y el grado histológico de CaMa ..	50
8.2.6. Relación de la ausencia/presencia del HPV-16 y la edad de las pacientes.....	51
8.2.7. Consolidado de las 32 muestras de CaMa	53
8.2.8. Resultados de la Inmunohistoquímica (IHQ)	56
IX. DISCUSIÓN	58
X. CONCLUSIONES	68
XI. RECOMENDACIONES.....	69
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Tipos y subtipos de carcinoma mamario según el grado de invasión del tumor.</i>	13
Tabla 2. <i>Grado histológico del cáncer de mama.</i>	16
Tabla 3 . <i>Clasificación de los factores de riesgo del cáncer de mama.</i>	17
Tabla 4. <i>Factores de riesgos no modificables y modificables del cáncer de mama. ...</i>	18
Tabla 5. <i>Proteínas estructurales y no estructurales del HPV y sus funciones.</i>	22
Tabla 6. <i>Tipo de Alphapapillomavirus más recurrentes y su riesgo oncológico.</i>	24
Tabla 7. <i>Longitud de onda de absorción y emisión para los diferentes fluoróforos con sus respectivos quencher.</i>	28
Tabla 8. <i>Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.</i>	40
Tabla 9. <i>Primers y sonda TaqMan para la detección de una región del gen E6 del genoma del HPV-16.</i>	41
Tabla 10. <i>Componentes y cantidades de la mezcla optimizada para la qPCR.</i>	42
Tabla 11. <i>Programa de ciclaje óptimos para la PCR en Tiempo Real.</i>	43
Tabla 12. <i>Concentración y calidad de las 32 muestras de ADN obtenidos de los cortes histológicos de CaMa parafinado de pacientes atendidos en el H.S.R.</i>	44
Tabla 13. <i>Consolidado de las 32 muestras con CaMa.</i>	53
Tabla 14. <i>Porcentaje de las variables independientes positivas para HPV-16.</i>	55
Tabla 15. <i>Consolidado de los resultados de la IHQ y qPCR para HPV-16.</i>	57

ÍNDICE DE IMÁGENES

<i>Fig. 1. Incidencia y Mortalidad del cáncer de mama en América Latina y el Caribe.</i>	<i>1</i>
<i>Fig. 2. Tasa de mortalidad ajustada por cáncer de mama en Perú.</i>	<i>2</i>
<i>Fig. 3. Anatomía de la mama femenina.</i>	<i>12</i>
<i>Fig. 4. Células no invasivas (típicas de tumores in situ) y células invasivas (características de tumores infiltrantes).</i>	<i>15</i>
<i>Fig. 5. Estructura del Virus Papiloma Humano.</i>	<i>19</i>
<i>Fig. 6. Esquema de la organización del genoma del HPV-16.</i>	<i>21</i>
<i>Fig. 7. Filogenia del HPV.</i>	<i>23</i>
<i>Fig. 8. Pasos d un ciclo de la PCR.</i>	<i>25</i>
<i>Fig. 9. Esquema general del método específico por medio del uso de las sondas TaqMan.</i>	<i>27</i>
<i>Fig. 10. Receptor HER-2 en la célula.</i>	<i>31</i>
<i>Fig. 11. Resultados de la PCR en Tiempo Real de los controles positivos, muestras de CaCu. Cuyos Ct son 12 para 2 controles positivos y para el resto son 12.89 y 15.01.</i>	<i>46</i>
<i>Fig. 12. Presencia y ausencia del Virus Papiloma Humano tipo 16 en las 32 muestras de CaMa.</i>	<i>47</i>
<i>Fig. 13. Resultados de PCR en Tiempo Real de 4 muestras.</i>	<i>48</i>
<i>Fig. 14. Presencia y ausencia del HPV-16 en cada tipo de CaMa, analizados en las 32 muestras.</i>	<i>49</i>
<i>Fig. 15. Porcentaje de la presencia dle HPV-16 en cada tipo de CaMa, analizados en las 8 muestras positivas.</i>	<i>49</i>
<i>Fig. 16. Presencia y ausencia del HPV-16 en cada grado histológico de CaMa, analizados en las 32 muestras.</i>	<i>50</i>

<i>Fig. 17. Porcentaje de la presencia del HPV-16 en cada grado histológico de CaMa, analizados en las 8 muestras positivas.</i>	<i>51</i>
<i>Fig. 18. Presencia y ausencia del HPV-16 en cada grupo de mujeres (grupo menores de 59 años y mayor o igual a 59 años) con CaMa, analizados en las 32 muestras.....</i>	<i>52</i>
<i>Fig. 19. Porcentaje de la presencia del HPV-16 en cada grupo de edades de mujeres con CaMa menor a 59 años y mayores o igual a 59 años, analizados en las 8 muestras positivas.....</i>	<i>52</i>
<i>Fig. 20. Gráfica comparativa entre las técnicas qPCR e IHQ para HPV-16.....</i>	<i>56</i>

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Documento de aceptación del estudio por parte del Comité de Ética del Hospital Santa Rosa.....	87
Anexo 2. Imágenes de la extracción del ADN del HPV-16.....	88
Anexo 3. Imágenes de la ejecución de la PCR en Tiempo Real.....	90

RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer de mama (CaMa) representa el 16% de todos los cánceres que afectan a las mujeres. En el Perú, es la segunda neoplasia más frecuente que perjudica en mayor medida a las mujeres adultas. Desde 1992 hasta la actualidad, se han reportado en diversas investigaciones la presencia del HPV como un posible factor viral implicado en la transformación de las células de la glándula mamaria. Por ello, el objetivo del presente estudio descriptivo-retrospectivo fue determinar la presencia del Virus Papiloma Humano de alto riesgo tipo 16 (HPV-16) en biopsias de tejido mamario parafinado con diagnóstico clínico de cáncer de mama en pacientes atendidas en el Hospital Santa Rosa durante el 2019. Se analizaron 32 muestras de CaMa embebidas en parafina para detectar el ADN del HPV-16 por medio de la técnica PCR en tiempo real, los *primers* estaban dirigidos a la región altamente conservada del gen viral, E6. Las características clínico-patológicas evaluadas fueron: tipo histológico, grado histológico y la sobreexpresión de C-erbB2 y Ki-67 por inmunohistoquímica. Se demostró inequívocamente la presencia del HPV-16 en 8 (25%) pacientes con CaMa, de las cuales 7 correspondieron al carcinoma ductal infiltrante (87%) y uno al carcinoma intraductal (13%). Asimismo, la mayoría fueron del GIII que representó el 75% (6 casos), y solo 2 casos fueron del GII (25%), de las cuales el 50% (4) fueron mujeres menores a 59 años y el otro 50% mayores o igual a 59 años. Solo 2 muestras manifestaron la sobreexpresión de los marcadores inmunohistoquímicos C-erbB2 y Ki-67, el cual representó el 6.25% del total de los casos. Se concluye que el HPV-16 estuvo presente en 8 de las 32 muestras y en concordancia con otros investigadores se podría relacionar a este virus como un factor desencadenante del CaMa.

Palabras clave: Cáncer de mama, Virus Papiloma Humano tipo 16, biopsia, PCR en Tiempo Real, Inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Globally, breast cancer (CaMa) accounts for 16% of all cancers that affect women. In Peru, it is the second most common neoplasm that affects adult women to a greater extent. From 1992 to the present, the presence of HPV as a possible viral factor involved in the transformation of the cells of the mammary gland has been reported in various investigations. Therefore, the objective of this descriptive-retrospective study was to determine the presence of the high-risk Human Papilloma Virus type 16 (HPV-16) in biopsies of paraffin breast tissue with a clinical diagnosis of breast cancer in patients treated at Hospital Santa Rosa during 2019. 32 samples of CaMa embedded in paraffin were analyzed to detect HPV-16 DNA by means of the real-time PCR technique, the primers were directed to the highly conserved region of the viral gene, E6. The clinic-pathological characteristics evaluated were: histological type, histological grade and overexpression of C-erbB2 and Ki-67 by immunohistochemistry. The presence of HPV-16 was unequivocally demonstrated in 8 (25%) patients with CaMa, of which 7 corresponded to infiltrating ductal carcinoma (87%) and one to intraductal carcinoma (13%). Likewise, the majority were from the GIII that represented 75% (6 cases), and only 2 cases were from the GII (25%), of which 50% (4) were women under 59 years of age and the other 50% older or equal to 59 years. Only 2 samples showed the overexpression of the immunohistochemical markers C-erbB2 and Ki-67, which represented 6.25% of all cases. It is concluded that HPV-16 was present in 8 of the 32 samples and in agreement with other researchers it could be related to this virus as a triggering factor for CaMa.

Keywords: Breast cancer, Human papillomavirus type 16, biopsy, Real Time PCR, Immunohistochemistry.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer de mama representa el 16% de todos los cánceres que afectan a las mujeres (OMS, 2004), siendo el quinto tipo de cáncer que causa mayor número de fallecimientos, aproximadamente 571 000 defunciones (OMS, 2018). En el 2018, América Latina y el Caribe poseyeron las cifras más altas con respecto al número de muertes, alrededor de 52 558 defunciones. El primer país latino con más óbitos es Argentina con 6 380 muertes y Perú se ubica en el noveno lugar con 1 858 decesos (OMS, 2018). Asimismo, el CaMa en América Latina y el Caribe supone el 25.2% de los nuevos casos y el 15.1% de las muertes por CaMa (OPS, 2018). La Organización Panamericana de la Salud (2008) estima que para el año 2030 incremente el número de casos nuevos de cáncer de mama a 572 000 casos y 130 000 defunciones (Fig.1).

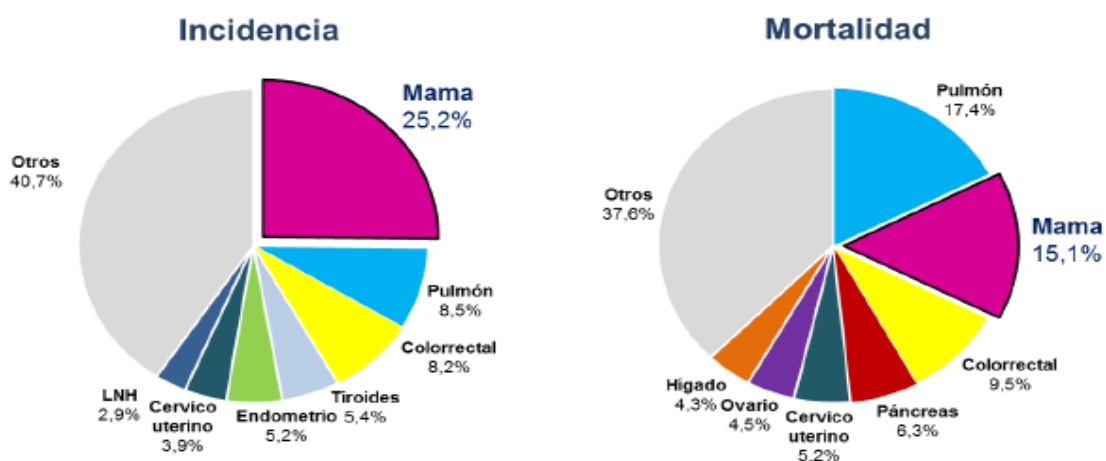


Fig. 1. Incidencia y Mortalidad del cáncer de mama en América Latina y el Caribe.
Fuente: OMS, 2018 y OPS, 2018.

En Perú, el cáncer de mama es la segunda neoplasia más recurrente (Poma, 2017), expresándose esencialmente en las mujeres de 40 a 69 años (MINSa, 2017). Según la situación actual de esta enfermedad realizado por el MINSa en el 2004, del total de casos diagnosticados con CaMa, tanto la incidencia anual estimada y la tasa de mortalidad anual es de 28 y 9.2 casos por cada 100,000 habitantes (IARC, 2015), respectivamente, habiendo más defunciones en Tumbes (15.3%), Piura (13.9%), Lima

(11.9%), Lambayeque (11.9%), La Libertad (11.7%) y Callao (11.3%) (MINSA –CDC, 2014) (Fig.2).

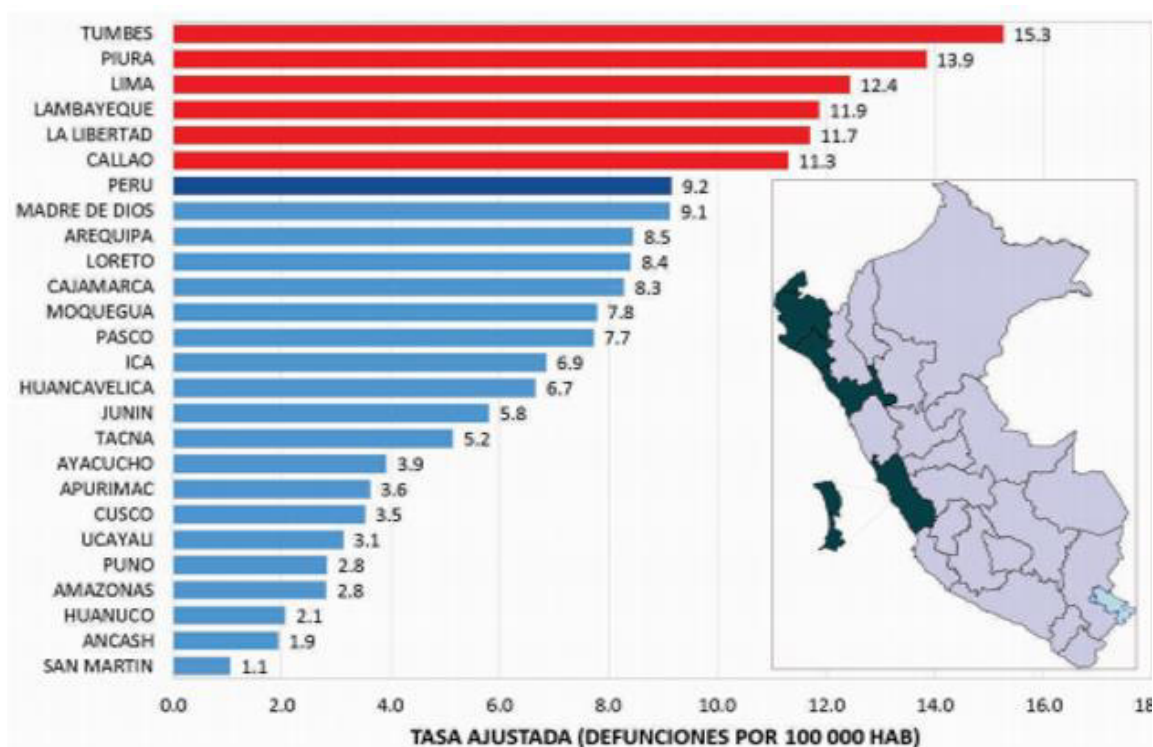


Fig. 2. Tasa de mortalidad ajustada por cáncer de mama en Perú.
 Fuente: MINSA. Cálculo realizado por el Centro de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-2014.

Lamentablemente, en muchos países en vías de desarrollo, las mujeres que padecen esta enfermedad son diagnosticadas en las últimas etapas del cáncer (Abugattas *et al.*, 2015). En comparación con los países desarrollados, cuyos sistemas de salud están bien implementados y les permite efectuar diagnósticos en estadios iniciales (Peñate *et al.*, 2018).

El CaMa está relacionado con diferentes factores de riesgo. Según Aguilar *et al.* (2012) y Fernández *et al.* (2015) los factores implicados son: los factores reproductivos, físicos y genéticos. En la primera división los factores de riesgo son: nuliparidad, no haber amamantado o lactancia menor a 3- 4 meses, menarquía prematura, menopausia retardada y el primer alumbramiento después de la cuarta década de vida (40 años) (Rivera *et al.*, 2019; Herrera y Hernández, 2017). En la segunda división están

encasillados los anticonceptivos orales y tratamientos hormonales. Los factores físicos están relacionados con el tabaquismo, alcoholismo, obesidad y la edad (factor físico más transcendental) (Soca *et al.*, 2016). Entre los factores genéticos, los antecedentes familiares de CaMa y la condición genética del paciente, como las mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2. Solo el 5-10% de CaMa son heredados de los progenitores y el 90% restante tiene también un componente genético, pero es fortuito, es decir, no es causado por una mutación heredada (Torrades, 2003; Prolla *et al.*, 2015).

Hasta ahora es sumamente complejo identificar los factores de riesgo específicos que ocasionan el CaMa, ya que diversos escenarios en la vida de las mujeres influyen sobre el riesgo de padecer esta enfermedad, por lo que es muy tedioso esclarecer por qué ciertas mujeres desarrollan la enfermedad y otras no (Bazán, 2017).

Sin embargo, en estas últimas décadas se está asociando al Virus Papiloma Humano (HPV) con el CaMa. Debido a que en diferentes investigaciones científicas se han ido demostrando que, en un grupo significativo de mujeres con células anómalas en el cérvix, provocado por este virus están más propensas a desarrollar CaMa (Delgado, 2015). Los genotipos del HPV que provocan el cáncer de cérvix son los que están clasificados como de alto riesgo, siendo los más frecuentes el HPV-16 y HPV-18, los cuales ocasionan el 70%-80% de casos de Cáncer cérvico uterino (CaCu) (Fuente y Mira, 2008; Alfaro y Fournier, 2013).

A nivel internacional, el HPV más recurrente es el tipo 16, salvo Argelia e Indonesia donde el HPV-18, es el más usual. En África Occidental, el HPV más reiterado es el tipo 45, en Centroamérica los más frecuentes son los HPV-33, HPV-39 y HPV-59; en América del Sur es el HPV-16 y el segundo tipo del HPV más usual es el tipo 18 (Rivera *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2012).

Por otro lado, se han reportado casos que verifican la presencia del genoma del HPV en mujeres diagnosticadas con CaMa, por lo que estaría revelando que este tipo de virus tiene funciones causales en tumores de mama (Kan *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, en el Perú solo hay un estudio que confirmó la presencia del HPV-16 en tejido tumoral de CaMa (Chumpitaz, 2018). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios sobre la presencia del HPV-16, ya que es el virus más frecuente en casos de carcinoma mamario de mujeres peruanas; esto contribuirá y posibilitará correlacionar futuras investigaciones, como por ejemplo, saber si realmente el ADN del HPV está involucrado en el desarrollo de los tumores mamarios, por qué está presente en los tumores mamarios, qué relación existe entre el virus y la enfermedad y posteriormente permitirá definir si existe una relación directa o indirecta entre el CaCu con el CaMa.

La técnica molecular PCR en Tiempo Real, viene brindando resultados más precisos, a pesar de que se obtenga poca cantidad del ADN viral, la técnica garantiza una alta sensibilidad, alta especificidad y eficiencia (Tamay de Dios *et al.*, 2013). El método que se empleó para detectar los productos amplificados fue el método específico de pruebas basada en hidrólisis (Sondas TaqMan) que sigue el principio “Transferencia de energía de resonancia fluorescente” (FRET) (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2017). Además, es una prueba rápida que posee un sistema cerrado, lo cual reduce la contaminación (Costa, 2004).

En relación con todo lo expuesto, la presente tesis tuvo como objetivo determinar la presencia del Virus papiloma humano tipo 16 (HPV-16) en biopsias de carcinoma mamario de pacientes atendidos en el Hospital Santa Rosa durante el 2019, mediante el uso de la técnica molecular PCR en Tiempo Real.

II. ANTECEDENTES

2.1. A nivel Internacional

Desde 1992, empezaron a tener sospechas de la presencia del HPV en carcinomas mamarios, tal es el caso de Di Lonardo *et al.* (1992). Ellos fueron los primeros en informar la relación entre el HPV-16 y el CaMa. Examinaron cortes histológicos de carcinoma mamario parafinado y ganglios linfáticos axilares por medio de la PCR usando cebadores específicos para los genotipos HPV-11, HPV-16 y HPV-18. Con la ayuda de la PCR, evidenciaron la presencia del material genético del HPV-16 en el 29,4% de los carcinomas de mama y en algunos ganglios linfáticos.

Del mismo modo, Henning *et al.* (1999) realizaron un estudio en mujeres con antecedentes de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado NIC III y carcinoma de mama como segundo cáncer primario. Estas muestras de los pacientes fueron examinados a través de la PCR y detectaron el ADN del HPV-16 en 19 de los 41 casos de mujeres que tenían cáncer de mama. Además, evidenciaron el ADN viral del HPV-16 en 32 de los 38 pacientes con NIC III, representando el 84% de los casos.

Liu *et al.* (2001) aislaron 17 tejidos de carcinoma mamario de pacientes seleccionados al azar. Para la amplificación del ADN del HPV utilizaron cebadores de amplio espectro previamente caracterizados y dirigidos a las regiones E6/E7 o L1. Asimismo, emplearon otros cebadores para amplificar el origen de replicación de ColE1/pBR322 a través de la PCR. El ADN producto de la PCR se analizó por medio de hibridación de transferencia de puntos con sondas de ADN para HPV-16, HPV-18 y HPV-31. Los resultados de la PCR/transferencia de puntos por ambos conjuntos de cebadores para HPV (regiones E6/E7 o L1) identificaron positividad para HPV en 6 de 17 casos de CaMa. Con respecto a los otros cebadores dirigidos al origen de replicación no identificaron positividad.

Widschwendter *et al.* (2004) detectaron mediante la técnica de la PCR el ADN del HPV en CaMa de pacientes con antecedentes de cáncer cervical invasivo. En los resultados se evidenció que todos los carcinomas de cérvix fueron positivos para HPV, el ADN del HPV se presenció en 7 de 11 casos de CaMa y/o tejidos de los ganglios linfáticos axilares; 6 pacientes tenían el mismo tipo del HPV-16 en cáncer de cuello uterino y en el tejido de cáncer de mama /ganglio linfático correspondiente. Esto los llevó a concluir que el ADN del HPV podría transportarse desde el origen de la infección al tejido mamario por medio del torrente sanguíneo y que posiblemente está implicado en el origen del CaMa en algunas pacientes. Asimismo, Damin *et al.* (2004) estudiaron la presencia del HPV en pacientes con CaMa y la correlación de la infección viral con factores pronósticos para el resultado de la enfermedad. Analizaron 101 muestras positivas para carcinoma mamario embebidas en parafina con ayuda de la PCR y secuenciamiento del gen HPV-E6. Emplearon dos conjuntos de cebadores específicos dirigidos a la región E6 de los HPV-16 y HPV-18. Observaron 25 casos positivos para HPV, de esos 25, 14 fueron positivos para HPV-16 y 10 fueron positivos para HPV-18. A su vez evidenciaron presencia de los virus tipo 18 y 16 en un solo tumor.

Kan *et al.* (2005) usaron la PCR para detectar la presencia del ADN del HPV en 50 mujeres australianas con CaMa ductal invasivo, para ello usaron cebadores que podían detectar 140 bp en la región E del HPV de los tipos 16, 18 y 33. De los 50 casos, 24 mujeres fueron positivas para HPV-18, representando el 48% del total de casos, esto le permitió evidenciar la presencia del ADN viral en los tumores de mama.

Gumus *et al.* (2006) realizaron un estudio para definir el papel del HPV en el CaMa. Trabajaron con tejido mamario maligno y normal provenientes de 50 pacientes. Amplificaron el ADN por medio de la técnica de la PCR usando cebadores del HPV. Evidenciaron que 37 muestras de tejido mamario tumoral fueron positivas para HPV-16, representando el 74% del total de casos.

Khan *et al.* (2008) examinaron la presencia, el genotipo, la carga viral del HPV en 124 pacientes japonesas diagnosticadas con carcinoma mamario para indagar el papel etiológico del HPV. Aplicaron la técnica PCR usando los cebadores SPF10 y otros cebadores específicos de la región E6 del HPV-16, para evidenciar la presencia del HPV. Detectaron el genoma del HPV en 26 pacientes, siendo el más recurrente el HPV-16(92%), seguido por el HPV-6 (46%), HPV-18 (12%) y HPV-33 (4%).

Cantú de León *et al.* (2009) determinaron la prevalencia del ADN del HPV en pacientes con lesiones mamarias en el Instituto Nacional de Cancerología de México. Recopilaron 51 casos con carcinoma mamario y lo compararon según la edad y tamaño del tumor, con 43 casos de lesiones mamarias no malignas, amplificaron regiones de ADN del HPV por la técnica de la PCR y estos amplificados fueron secuenciados para confirmar la presencia del HPV. En el grupo de pacientes con carcinoma mamario, 36 (70.5%) fueron negativos y 15 (29.4%) fueron positivos al ADN del HPV, 10 (66.6%) fueron positivos a la presencia del HPV 16, 3 (20%) para el HPV 18, dos casos (13.4%) fueron positivos para ambos.

Pereira *et al.* (2013) desarrollaron un estudio para determinar la prevalencia del HPV en el CaMa. Usaron la PCR para detectar el HPV y los productos se secuenciaron automáticamente. Estudiaron 61 muestras de cáncer de mama y obtuvieron una prevalencia del 26% (16/61), demostrando por primera vez en Argentina presencia del HPV en una proporción de tejidos mamarios con tumores malignos. El análisis de secuencia en un subgrupo de casos indica la prevalencia del HPV-11 de bajo riesgo, seguido del HPV-16 de alto riesgo.

Sin embargo, recién en el año 2015 se dio más importancia la relación del HPV con un mayor riesgo de CaMa. Debido a que Lawson *et al.* (2015) buscaron llenar vacíos sustanciales en la confirmación de la presencia del HPV de alto riesgo en CaMa, también en la evidencia de infecciones por HPV en tejidos mamarios benignos antes del desarrollo del tumor mamario se confirmaron la presencia del HPV en los mismos

pacientes y finalmente se demostró que los HPVs son pasajeros biológicamente activos y no inocuos en el cáncer de mama. Ellos emplearon datos de RNA-seq de The Cancer Genome Atlas (TCGA) para reconocer secuencia de RNA del HPV en los tumores de mama. Del mismo modo, usaron la PCR para identificar HPV en muestras de mujeres australianas con biopsias benignas de tejido mamario que posteriormente desarrollaron CaMa. Por medio de la técnica de inmunohistoquímica (IHC) evaluaron la expresión de la proteína E7 del HPV, esto les permitió analizar si el HPV en el CaMa era biológicamente activo. En 855 casos diagnosticados con CaMa de la base de datos TCGA, determinaron que treinta tipos del HPV fueron de bajo riesgo (3.5%) y 20 (2.3%) de alto riesgo. Los tipos de alto riesgo fueron HPV-18 (48%), HPV-113 (24%), HPV-16 (10%), HPV-52 (10%). Los resultados moleculares mostraron que el HPV tipo 18 era el tipo más común identificado en las muestras de cáncer de mama (55% de las 40 muestras de CaMa) seguido por el HPV-16 (13%). Se identificó el mismo tipo del HPV tanto en el CaMa benigno como en el posterior en 15 pacientes. Las proteínas E7 del HPV se identificaron en el 72% de las muestras de CaMa benignas y el 59% de las muestras de CaMa invasivo.

Ngamkhan *et al.* (2017) investigaron la prevalencia de la infección del HPV en muestras de tejido mamario con tumores malignos positivos para CaMa y lesiones tumorales benignas en tejidos mamaros. Acopiaron 700 muestras de mujeres tailandesas en el periodo 2013-2015. Asimismo, analizaron la correlación estadística entre la infección por HPV, parámetros sociodemográficos e histopatológicos. Las pacientes tenían una edad promedio de 41.76 años para las lesiones tumorales benignas de mama y 52.73 años para las muestras con carcinoma mamario. Por medio de la PCR, de 700 muestras se detectó el ADN del HPV en 25 muestras el cual representó el 3.57% del total. El HPV-16, fue el más concurrente, seguido por el HPV-33 y el HPV-18.

2.2. A nivel Nacional

Hasta la fecha en el Perú solo hay un estudio que determinó la presencia del HPV-16 en carcinomas mamarios. Chumpitaz (2018) analizó muestras de 100 pacientes diagnosticadas con CaMa procedentes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en el 2017, para determinar las presencias de HPV-6, HPV-16 y HPV-18 con la ayuda de la PCR en tiempo real y su asociación entre las características sociodemográficas y clínicas de la población. De los 100 casos, solo 9 fueron positivos para HPV, de los 9 casos positivos 7 fueron HPV-16+ (77.8%) , demostrando ser el más prevalente. A su vez no fue muy significativo ($p \geq 0.05$) en relación con las características mencionadas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Cáncer

Cáncer no es una sola enfermedad; por el contrario, es un grupo de enfermedades complejas. Generalmente se clasifican en función del tejido u órgano y de la célula de origen. Por ejemplo, el cáncer del pulmón empieza en las células del pulmón; el cáncer que empieza en el colon se denomina cáncer de colon (Maza y Padilla, 2004; Pérez *et al.*, 2013; Cáncer; 2015 y Vega *et al.*, 2016). Todos los tipos de cáncer tienen células anómalas que proliferan de manera acelerada, desordenada y sin control, consiguiendo esparcirse a otras partes del cuerpo (tejidos y órganos) por el sistema sanguíneo o por el sistema linfático. De este modo pueden destruir otros tejidos y/u órganos formando metástasis (Maza y Padilla, 2004; Loredó, 2007 y American Cancer Society, 2019).

El cáncer es consecuencia de alteraciones genéticas debido a las mutaciones o cambios anómalos en los genes que se localizan en el núcleo de las células, cuya función en condiciones normales es controlar el crecimiento celular, la división celular y conservar las células sanas (Breastcancer; 2018).

Estos cambios genéticos pueden heredarse. Asimismo, pueden darse por alteraciones en el ADN en el momento de la división celular o por cambios epigenéticos esto se debe al daño que se produce por la interacción entre los genes y factores ambientales (la exposición a diversos carcinógenos como el tabaco, radiación UV, etc.). Por lo tanto, la célula modificada produce más células iguales y consigue formar un bulto o masas celulares que se designan tumor. Un tumor puede ser benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) (Berger *et al.*, 2009; Cancer, 2015; Breastcancer; 2018).

Las células de los tumores benignos son semejantes a las células de las cuales se originan; su crecimiento es descontrolado y más lento, su capacidad de invasión es limitada y no producen metástasis en otros órganos diferentes. Por otro lado, las células

malignas frecuentemente son muy distintas a las células de las cuales se originan, capaces de invadir a nivel local y puede producir metástasis a distancia (Pérez *et al.*, 2013).

No se ha podido establecer la etiología del cáncer, ya que no hay una sola causa, sino múltiples factores cuyos efectos actúan de forma sinérgica y predisponen al cáncer en el ser humano. Estos factores de riesgo pueden ser exógenos (80% a 90%) o endógenos (10% a 20%) (Vega *et al.*, 2017).

3.2. Cáncer de mama

El CaMa es una neoplasia maligna y heterogénea cuyo proceso oncológico inicia en las células del tejido mamario. Las células normales de la mama no originan directamente el cáncer, lo que realmente ocurre es que pasan por diferentes etapas de forma progresiva hasta que finalmente se transforma en un tumor maligno; el tiempo que tarda en generarse es variable y depende esencialmente del grado de agresividad de cada tumor (SEOM, 2011; González y Ugalde, 2012; Pérez *et al.*, 2013).

3.2.1. Tipos de cáncer de mama

El CaMa puede originarse en diferentes áreas del seno y su tipo depende de qué tipo de células de la mamas se han degenerado y convertido en cancerosas (CDC, 2018).

La mama está conformada por tres partes principales: los lóbulos (constituido por lobulillos que producen la leche), conductos galactóforos (conductos que transportan la leche desde los lóbulos al pezón) y tejido conectivo (tejido graso y fibroso que sujeta la mama) (SEOM, 2020; Wisbaum, 2018) (Fig.3.)

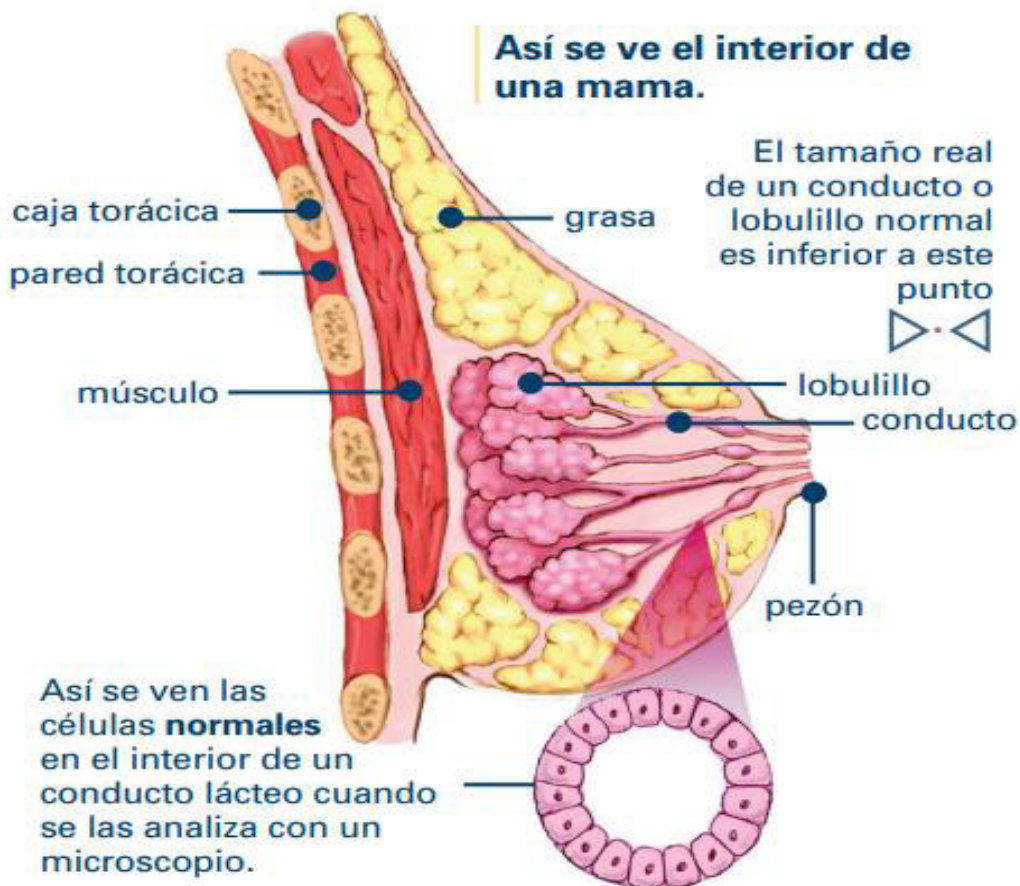


Fig. 3. Anatomía de la mama femenina.

Se observan los lóbulos (conformada por lobulillos), conductos galactóforos y el tejido conectivo (tejido graso y fibroso). De igual modo, se aprecia una extensión de las células normales en el interior del conducto lácteo. Fuente: Breastcancer, 2020.

Usualmente, el CaMa se origina en las células de los lobulillos o en los conductos galactóforos y es menos recurrente, en los tejidos grasos y fibrosos de la mama (Breastcancer, 2018).

Existen varias clasificaciones de los tipos del CaMa, entre ellas está el grado de invasión del tumor (*in situ* e infiltrante), el sitio donde inicia el tumor y el aspecto de las células que lo forman (lobular, ductal, medular, tubular e inflamatorio) y las características biológicas y genéticas de las células, el estado de los receptores hormonales y presencia del receptor HER-2 (basal-epitelial, HER-2, luminal A, luminal B y C) (SEOM, 2011).

3.2.1.1. Clasificación según el grado de invasión del tumor

Solo nos centraremos en la clasificación histopatológica o también llamada según el grado de invasión del tumor, ya que es la más clásica y la más usada para el diagnóstico. Se divide en CaMa no invasivo o *in situ* y CaMa invasivo o infiltrante y estos a su vez tienen subtipos como se muestra en la Tabla 1 (Pérez *et al.*, 2013; American Cancer Society, 2019).

Tabla 1. Tipos y subtipos de carcinoma mamario según el grado de invasión del tumor.

Tipos	Subtipos	
Carcinoma <i>in situ</i> (15-30%)	Carcinoma ductal <i>in situ</i> (80%)	Subtipo más común del CaMa no invasivo, inicia en el interior de los conductos lácteos y no se propaga fuera de él.
	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (20%)	La proliferación de las células se da en los lobulillos, no es considerado cáncer como tal, pero sirve como señal de advertencia que indica un mayor riesgo de padecer a futuro cáncer invasivo.
Carcinoma invasor (70-85%)	Carcinoma ductal infiltrante (79%)	Es el subtipo más común de cáncer de mama infiltrante. Inicia en el conducto galactóforo y se disemina al tejido normal circundante en el interior de la mama.
	Carcinoma lobulillar infiltrante (10%)	Comienza dentro del lobulillo, pero se expande hacia el tejido normal circundante dentro de la mama
	Carcinoma tubular infiltrante (6%)	Cáncer que empieza dentro del conducto lácteo y se propaga fuera de él. Habitualmente, el tumor es pequeño y de bajo grado; es decir, tienen un crecimiento lento y su aspecto es similar a las células normales.

Continuación de la Tabla 1.

Carcinoma invasor (70-85%)	Carcinoma cribiforme infiltrante (6%)	Células cancerosas invaden el estroma (tejidos conjuntivos de la mama) y son de bajo grado.
	Carcinoma coloide (mucinoso) infiltrante (2%)	Cáncer que comienza dentro del conducto lácteo y se disemina fuera de él. El tumor se forma a partir de células anómalas que “flotan” en acumulaciones de mucina, uno de los principales componentes de la sustancia viscosa y escurridiza conocida como moco.
	Carcinoma medula infiltrante (2%)	Inicia dentro del conducto lácteo y se propaga fuera de él. Se denomina carcinoma “medular” porque el tumor es una masa suave y pulposa que se parece a una parte del cerebro conocida como bulbo raquídeo o médula. Afecta más a mujeres que tienen una mutación del gen <i>BRCA1</i>
	Carcinoma papilar infiltrante (1%)	generalmente tiene un borde bien definido y está formado por prolongaciones pequeñas en forma de dedos y es de grado 2 (grado moderado)

Fuente: Información adaptada de Mitchell et al., 2017 y Breastcancer, 2018

Los tumores *in situ*, poseen células anormales no invasivas (Fig.4) que permanecen en los lobulillos o conductos galactóforos de la mama; es decir, no invaden ni se multiplican en tejidos normales dentro o fuera de la mama. (Breastcancer, 2020). Si no se trata, es posible que el carcinoma ductal *in situ* se convierta en cáncer invasivo. Aproximadamente el 15%-30% de los cánceres son *in situ* y el subtipo más habitual es el carcinoma ductal *in situ* en un 80% (Cotran et al., 1999; Mitchell et al., 2017).

Los tumores infiltrantes, poseen células anómalas invasivas (Fig.4) que se extienden más allá de los lobulillos o conductos galactóforos, se multiplican en los tejidos normales y sanos. A veces, las células cancerosas se expanden a otras partes del cuerpo por el sistema linfático o sanguíneo provocando metástasis. (Breastcancer, 2020). Alrededor del 70% a 85% de los CaMa son de este tipo. El subtipo más recurrente es el carcinoma

ductal invasivo que oscila entre el 78% a 80%, el segundo más usual es el carcinoma lobulillar infiltrante (5%-10%) y los subtipos restantes son los menos frecuentes (Cotran *et al.*, 1999; Huicochea *et al.*, 2009).

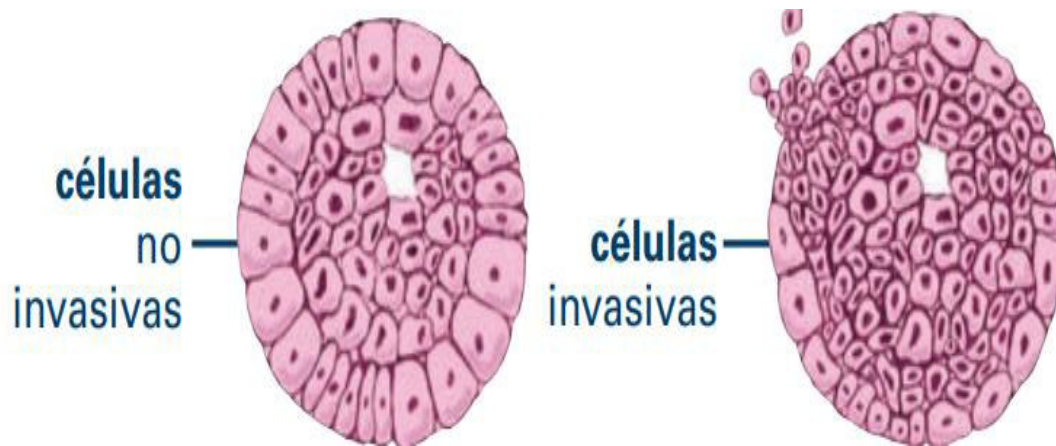


Fig. 4. Células no invasivas (típicas de tumores *in situ*) y células invasivas (características de tumores infiltrantes).
Fuente: Breastcancer, 2020.

3.3. Grado histológico de CaMa

Establecer el grado del CaMa que padece una paciente es un factor pronóstico fundamental, ya que proporciona la información de la rapidez con la que posiblemente crecerá el tumor y la propagación de este. Principalmente se basa en la forma como se observan las células tumorales en relación con las células de mama normales y la comparación de un tejido normal y el tejido de un tumor observado en el microscopio del laboratorio (NIH,2013; American Cancer Society,2019).

El grado histológico es un valor entre uno y tres, los cuales indican la agresividad de las células y tejidos del tumor. A medida que el grado es mayor, más agresivo es el tumor. Por lo tanto, es más probable la propagación de este (ESMO, 2018).

Tabla 2. Grado histológico del cáncer de mama.

Grado histológico del tumor	Concepto
Grado I (grado bajo o bien diferenciado)	Las células del cáncer de mama grado I y los tejidos del tumor se ven un poco diferentes o se asemejan a las células y tejidos normales. Generalmente tienen una extensión y crecimiento lento.
Grado II (grado intermedio/moderado o moderadamente diferenciado)	Las células del CaMa grado II y los tejidos del tumor no se ven como las células y tejidos normales. Su crecimiento es un poco más rápido que estas.
Grado III (grado alto o poco diferenciado)	Las células del CaMa grado III y los tejidos del tumor se ven muy diferentes de las células normales ya los tejidos normales. Su crecimiento es más rápido.

Fuente: Información adaptada de American Cancer Society, 2019 y Breastcancer, 2020

3.4. Factores de riesgo del cáncer de mama

El factor de riesgo está relacionado con todo aquello que incrementa la probabilidad de padecer una enfermedad, en este caso como el cáncer (American Cancer Society, 2020).

Hasta la fecha, ha sido complicado identificar los factores de riesgo específicos (Bazán, 2017), ya que se ha asociado al CaMa con diversos factores, de los cuales ninguno se define necesariamente como una relación causa-efecto (Castillo y Ávila, 2010). Ciertas personas que tienen varios factores de riesgo no desarrollan el CaMa y algunas que no están expuestas al riesgo si lo desarrollan (Bullón *et al.*, 2018). Solo el 12% de los pacientes con CaMa poseen un factor de riesgo identificable (Fiorica, 2001).

El CaMa prima más en mujeres que en varones dado que las mujeres tienen las mamas más desarrolladas y es más funcional que en el sexo masculino. En ellos representa menos del 1% de todos los tumores de mama (Prada y Ríos, 2014; Sifuentes *et al.*, 2015).

Según Aguilar *et al.*, (2012) y Fernández *et al.*, (2015) los factores implicados con el CaMa se encasillan en tres categorías, los cuales son: factores genéticos, factores reproductivos y factores físicos. (Tabla 3) y según CDC (2018) y American Cancer Society (2020) estos factores también se pueden clasificar en factores modificables y no modificables (Tabla 4).

Tabla 3 . Clasificación de los factores de riesgo del cáncer de mama.

Factores	
Factores genéticos	<i>Está relacionado con la mutación de cierto gen (BRCA1 localizado en el gen 17, BRCA2 localizado en el gen 13) y se ha demostrado que se transmite de forma hereditaria entre un 5% y 10% de los casos. Asimismo, predispone a padecer CaMa por una mutación.</i>
Factores reproductivos	<i>Nuliparidad, no haber amamantado, menarquía precoz, menopausia retardada y el primer alumbramiento después de la cuarta década de vida (40 años), anticonceptivos orales y tratamientos hormonales.</i>
Factores físicos	<i>Sexo, edad, raza, tejido mamario denso y estilo de vida como el tabaquismo, alcoholismo, vida sedentaria y obesidad, alimentación.</i>

*Fuente: Información adaptada de Aguilar *et al.*, 2012 y Fernández *et al.*, 2015.*

Tabla 4. Factores de riesgos no modificables y modificables del cáncer de mama.

Factores		
No modificable	Mutaciones genéticas	Mutación en los genes BCRA1 y BRCA2. BRCA1 mutado induce a la aparición de cáncer de mama en 50% a los 50 años y 87% a los 70 años. Asimismo, 40%-50% de las mujeres desarrollarán un cáncer de cérvix. Asociado a cáncer de mama y ovario están presentes en 45% de los casos familiares de cáncer de mama. BRCA2 mutado predispone una probabilidad de 85% de desarrollar un cáncer de mama en la vida, y 10%-20% de cáncer de cuello uterino. (Uribe,2009)
	Antecedente familiar	El riesgo es mayor si la mamá, hermana o una hija por el lado paterno o materno han tenido esta neoplasia.
	Sexo	Ser del sexo femenino es el mayor factor de riesgo para que se forme cáncer de mama y es muy poco recurrente en el varón, con una incidencia aproximada de 1 caso por cada 100 que aparecen en mujeres
	Edad	La predisposición para enfermarse aumenta con la edad, en especial después de los 50 años (Tabla 3)
	Raza y origen étnico	El cáncer de mama es más frecuente en mujeres afroamericanas con menos de 50 años con respecto a las mujeres blancas.
	Edad de la menarquía	Inicio de la menstruación antes de los 12 años
	Menopausia tardía	Mujeres con más ciclos menstruales que experimentaron tarde la menopausia (después de los 55 años) tienen un riesgo ligeramente mayor de padecer CaMa. Esto podría deberse a una exposición más prolongada a las hormonas estrógeno y progesterona durante la vida.
	Mamas densas	El tumor de mama casi siempre se desarrolla en el tejido denso de la mama no en el tejido graso, y la gran mayoría de casos de CaMa se encuentran en mujeres con mamas densas.
Modificable	Pariedad y edad del primer embarazo	Mujeres que no han tenido hijos poseen más riesgo de tener cáncer de mama y el riesgo disminuye si el embarazo fue antes de los 30 años
	Lactancia materna	La relación del cáncer de mama y la lactancia es polémico. No obstante, estudios demuestran que la lactancia durante un periodo superior a 12 meses tiene un efecto protector importante.
	Estilo de vida	Como alcohol, tabaquismo, obesidad, tratamientos hormonales, anticonceptivos orales, alimentación, actividad física, estrés

Fuente: Información adaptada de CDC, 2018 y American Cancer Society 2020.

3.5. Virus Papiloma Humano

Los Virus Papiloma Humano forman parte de la familia *Papillomaviridae*. Típicamente son virus pequeños sin envoltura, cuyo contenido genético es un ADN circular bicatenario covalentemente cerrado de 8000 bp y se encuentra asociado con diversas histonas del hospedero (H2a, H2b, H3 y H4) formando un complejo análogo a la cromatina del huésped. Por lo general, tienen un diámetro de 52 y 55 nm (Rivera *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013; Beltrán, 2014 y Ramírez *et al.*, 2019).

Su cápside icosaédrica está constituida por 72 capsómeros metaméricos de las proteínas L1 y L2. (Santos *et al.*, 2015). L1 es la proteína principal, representa el 95% de la cápside y se encarga de identificar los receptores sobre la célula huésped. L2 es la proteína secundaria (5% de la cápside) y se asocia íntimamente a los capsómeros conformado por la L1. (Finnen *et al.*, 2003) L2 participa en la unión e ingreso del virión a la célula, también de su traslado al núcleo, liberación del material genético viral y el ensamble de los viriones (Kajitani *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013) (Fig. 5).

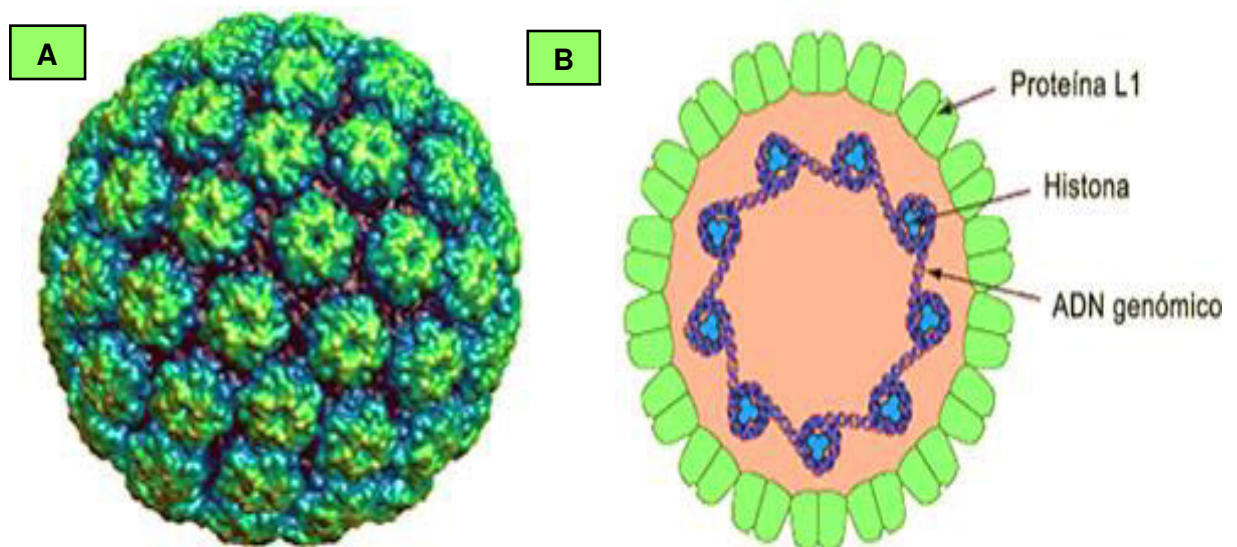


Fig. 5. Estructura del Virus Papiloma Humano.
A) Ilustración en 3D del HPV diseñados por medios informáticos. B) Esquema de la cápside del HPV, donde se visualiza la proteína más abundante L1, y el DNA viral empaquetado con las histonas celulares. Fuente: ViralZone, 2010; Santos *et al.*, 2015.

3.5.1. Organización del genoma viral

La organización del material genético del HPV reside en una región codificante y una región no codificante. La región codificante representa el 90% del genoma viral (50% la región temprana y 40% la región tardía) y la región no codificante representa el 10% (Mateos *et al.*, 2016).

La región codificante posee alrededor de 8 a 10 regiones de lectura abierta u ORF (*Open Reading Frame*) expresados por medio de RNAm policistrónicos y situados en una sola hebra del ADN viral (De la Fuente *et al.*; 2010). Al mismo tiempo, esta región se agrupa en dos regiones de expresión, temprana y tardía. La primera región abarca genes de expresiones tempranas (E, *early*) codificadas por 6 u 8 ORFs, los cuales están encargados de sintetizar proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las dos últimas son consideradas proteínas oncogénicas debido a que juegan un rol importante, hacen que la célula se transforme, inmortalice y en consecuencia pueda aparecer el cáncer (Grillo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2015). La otra región incluye genes de expresión tardía (L, *late*), codificadas por 2 ORFs y dan origen a las proteínas estructurales L1 y L2 (López y Ancízar, 2006). Las funciones de estas proteínas estructurales y no estructurales se pueden visualizar en la Tabla 5.

La región no codificante (NCCR), región reguladora aguas arriba (URR) o también llamada LCR (Long Control Región) contiene el origen de la replicación, una secuencia intensificadora que controla la transcripción de los genes virales y una región promotora constituida por P97 o Promotor Early (PE) y P670 o Promotor Late (PL); que regulan la expresión de genes tempranos y la expresión de genes tardíos en HPV16; respectivamente (De la Fuente *et al.*; 2010; Santos *et al.*, 2015 y Schiffman *et al.*, 2016) (Fig.6).

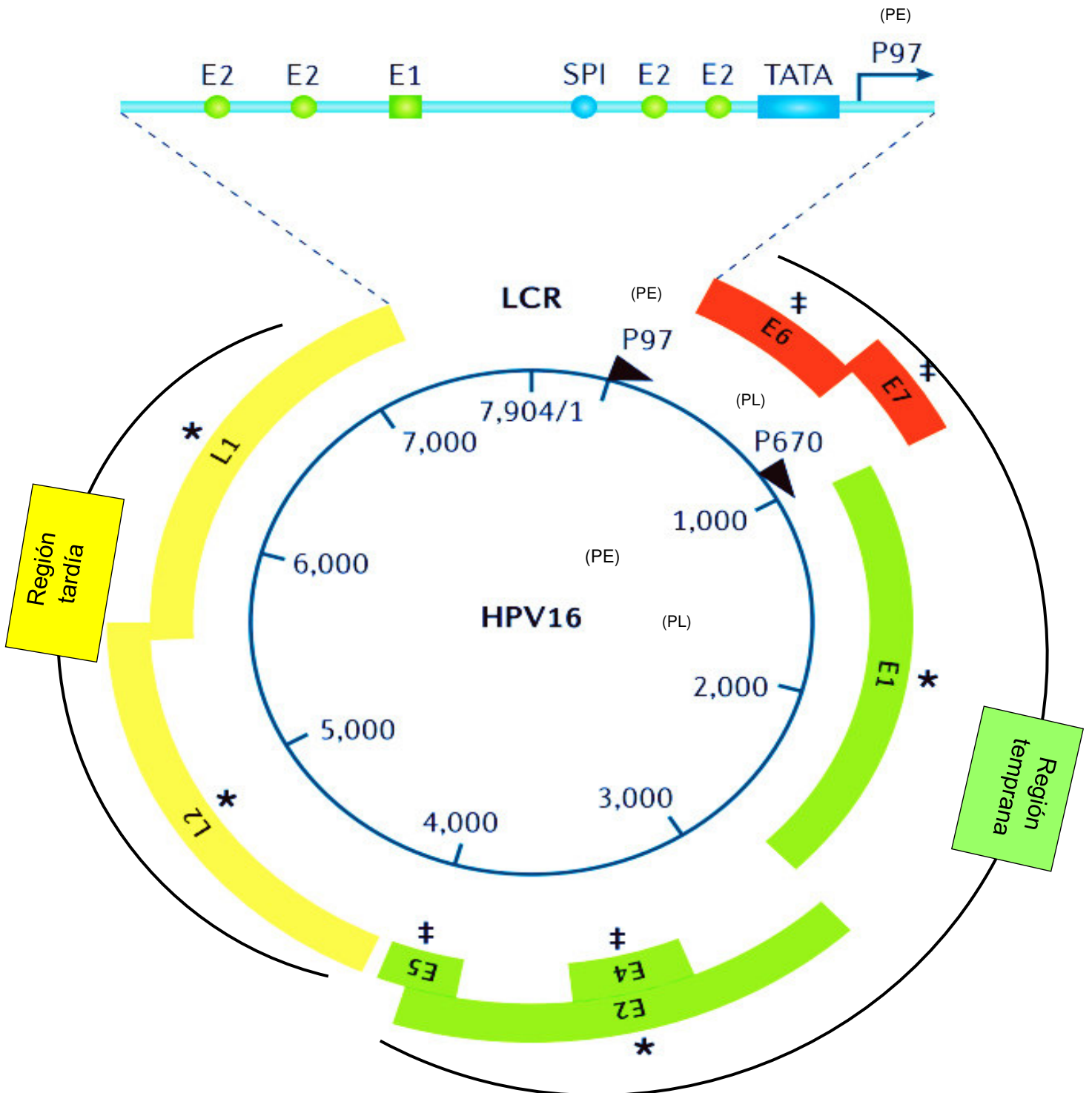


Fig. 6. Esquema de la organización del genoma del HPV-16.

Se señalan las proteínas estructurales L1 y L2 (amarillo). Las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5 (verde), E6 y E7 (rojo, proteínas oncogénicas). Además, se observan los promotores P97 (PE) y P670 (PL); que regulan genes de expresión temprana y genes de expresión tardía, respectivamente. Asimismo, se observa la LCR con diferentes elementos de la respuesta a factores de la transcripción viral y celular. Fuente: Extraído y modificado de Schiffman et al., 2016.

Tabla 5. Proteínas estructurales y no estructurales del HPV y sus funciones.

Regiones de lectura abierta (ORF) del genoma del HPV		
Proteínas virales	Función	
Proteínas no estructurales	E1	Acción helicasa. Esencial para la replicación viral y control de la transcripción.
	E2	Factor que regula la transcripción viral, segregación genómica y encapsulación.
	E4	Interacción con el citoesqueleto de la célula hospedera para el ensamblaje viral. También, se encarga de regular la expresión de genes tardíos, controlar la maduración viral y la salida de los viriones.
	E5	Estimula la actividad transformante de E6 y E7, interactúa con los receptores de crecimiento, promueve la fusión celular generando aneuploidía e inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmunitaria.
	E6	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo la apoptosis; induce a inestabilidad genómica del hospedero, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa
	E7	Se une y provoca la degradación de la proteína supresora de tumores pRB; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria
Proteínas estructurales	L1	Es la principal proteína de la cápside, cuya función es reconocer los receptores sobre la célula huésped. Es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes
	L2	Es la proteína secundaria que se encarga de reclutar el genoma viral para organizarlo en la cápside. Además, participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones.

Fuente: Extraído y modificado de Grillo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2015.

3.5.2. Clasificación filogenética del HPV

El análisis filogenético se basa en la región de lectura abierta (ORF) que codifica para la proteína de la cápside L1, debido a que es el gen más conservado del Virus Papiloma Humano y se ha empleado como el patrón para clasificar los tipos del HPV (De Villiers *et al.*, 2004). Diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad; distintas especies, entre 60% y 70% de identidad y los tipos comparten entre el 71% y 89% de identidad (De Villiers *et al.*, 2004; Calleja *et al.*, 2005; Bernard *et al.*, 2006; Kroupis *et al.*, 2011 y Ramírez *et al.*, 2019).

Los HPV se dividen en 5 géneros, que se clasifican con una letra griega como prefijo seguida de un número que indica la especie. Los 5 géneros son Alpha, Beta, Gamma,

Tabla 6. Tipo de Alphapapillomavirus más recurrentes y su riesgo oncológico.

Género	Riesgo	Tipo
Alphapapillomavirus	HPV-AR	HPV -16, HPV-18, HPV- 26, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-34, HPV-35, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-66, HPV-67, HPV-68, HPV-69, HPV-70 y HPV-82,
	HPV-BR	HPV- 2, HPV-6, HPV-7, HPV-11, HPV-13, HPV-27, HPV-32, HPV- 40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-57, HPV- 74 y HPV- 81

Fuente: Elaboración propia Información extraída de De Villiers et al., 2004; Kajitani et al., 2012; Ramírez et al., 2019.

Los HPV-AR, son oncogénicos, se transmiten principalmente por relaciones sexuales y están relacionados con el desarrollo de lesiones potencialmente malignas y con el cáncer de cérvix, pene, ano y con otros tumores orofaríngeos. Los HPV-BR, no producen cáncer, solo provocan lesiones benignas como verrugas genitales y condilomas (Kajitani *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2019).

3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR en Tiempo Real)

La PCR en Tiempo Real (en inglés *Real Time PCR*) fue descrita y desarrollada por Higuchi y colaboradores en el año 1992 (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Esta técnica molecular es una variación de la PCR punto final o también conocida como PCR convencional que fue desarrollado por Kary Mullis en el año 1983 (Saiki *et al.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987, Aguilera *et al.*, 2014).

La PCR en Tiempo Real logra amplificar y detectar simultáneamente las secuencias específicas de ácidos nucleicos por medio de reporteros fluorescentes en cada ciclo de la reacción (un ciclo consta de una etapa de denaturación, hibridación y una extensión

cuyas temperaturas son 95 °C, 50-60 °C y 72 °C, respectivamente) (Fig.8). Además, permite cuantificar la cantidad de productos amplificados mediante los valores de la Ct (*Thershold cycle* o ciclo umbral) por ello también la denominan qPCR si empleamos ADN genómico y RT-qPCR si primero se adquiere ADNc. (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Elgue y Vásquez, 2015) Esta técnica molecular puede detectar y cuantificar pequeñas cantidades del ADN blanco, por lo que esta técnica garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

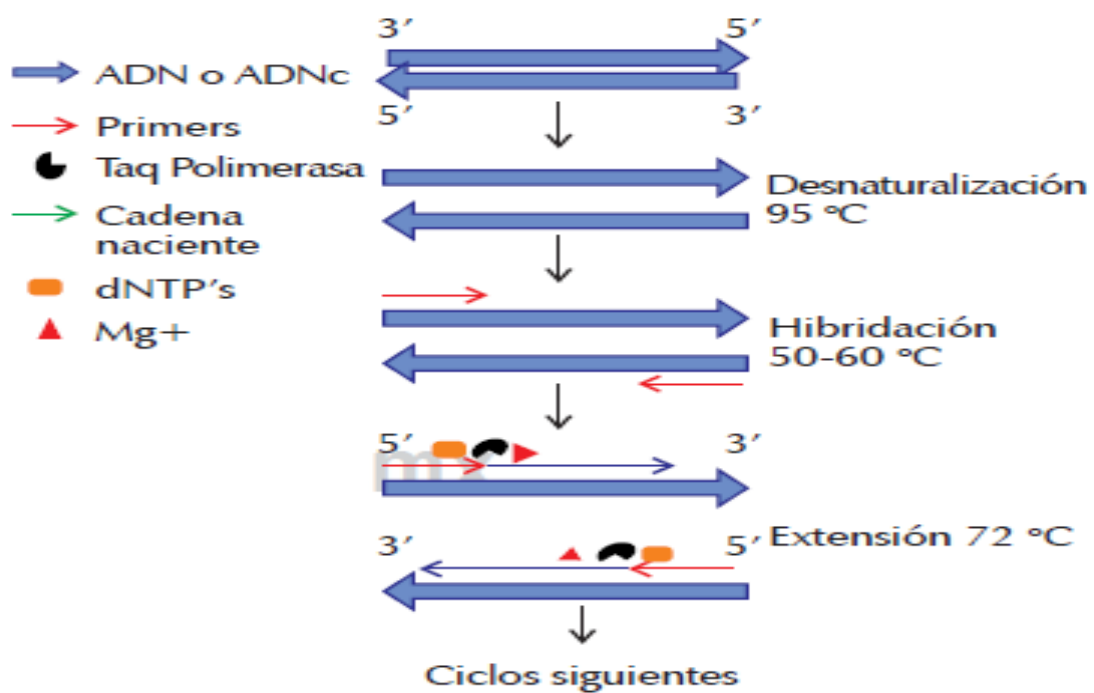


Fig. 8. Pasos d un ciclo de la PCR.
 El cual consta de una desnaturalización, hibridación y una extensión con sus respectivas temperaturas como se muestra en la imagen. Fuente: Tamay de Dios *et al.*, 2013.

Para efectuar la PCR en Tiempo Real es necesario contar con un termociclador que posea una unidad capaz de detectar la fluorescencia emitida por los fluoróforos para monitorizar las amplificaciones. Al igual que un Hardware y Software para la captura y el análisis de datos, respectivamente (Aguilera *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se empleó un sistema basado en reporteros fluorescentes. Asimismo, se detectó los productos amplificados por medio de un método específico

que sigue el principio FRET que significa Transferencia de energía de resonancia fluorescente. Principalmente consiste en transferir energía desde un reportero o donador fluorescente a un *quencher*, apagador o aceptor mientras no se une a su secuencia blanco. Para ello se utilizó sonda de hidrólisis, conocidas como TaqMan. Esta técnica es muy confiable, puesto que mientras no se una la sonda a su blanco diana, no ocurrirá la amplificación y por lo tanto no habrá señal de fluorescencia (Zheng *et al.*, 2003; Arya *et al.*, 2005 y Tamay de Dios *et al.*, 2013).

3.6.1 Sondas de hidrólisis

Son oligonucleótidos monocatenarios específicos que están marcados con un fluoróforo donador en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. (Fig.9) Mientras la sonda de doble etiqueta está intacta, la fluorescencia que emite el donador es absorbida por el inhibidor o *quencher*. Esto sucede porque el espectro de emisión del donador se ha solapado con el espectro de absorción del *quencher* (Rodríguez y Rodríguez, 2006; Elgue y Vásquez, 2015). En la tabla 7 se observa los fluoróforos más utilizados con sus respectivos espectros de excitación y emisión.

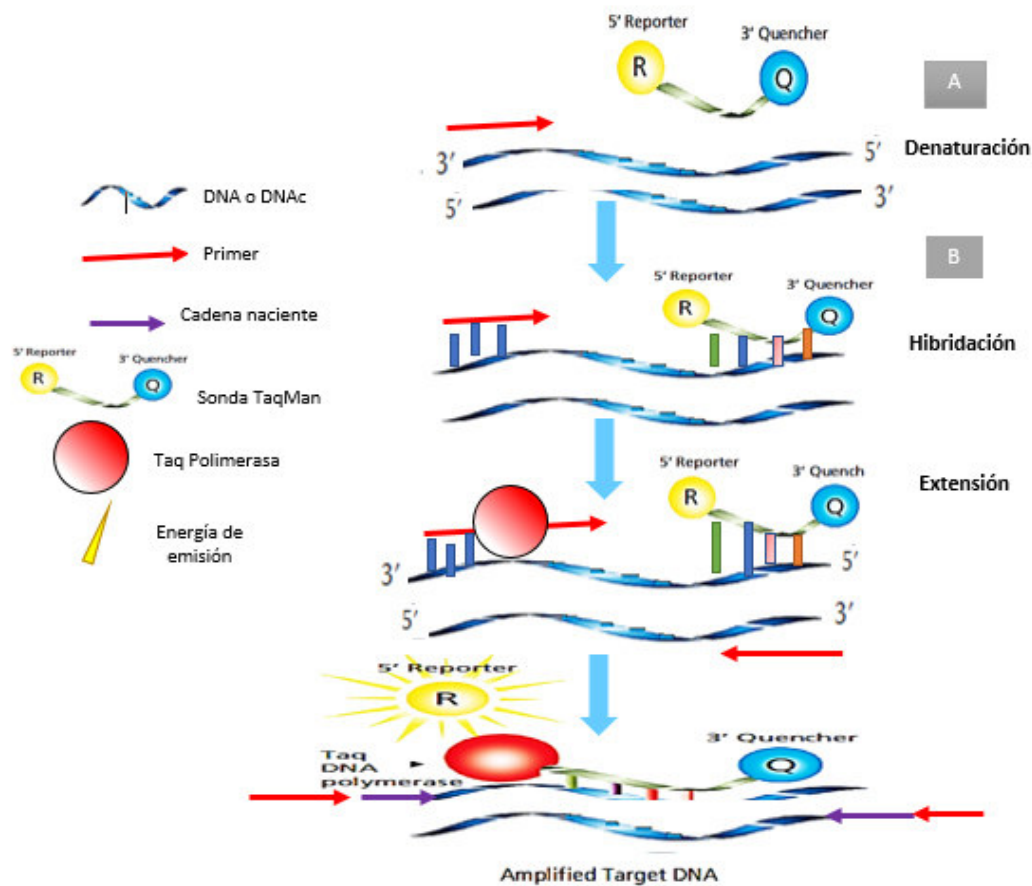


Fig. 9. Esquema general del método específico por medio del uso de las sondas TaqMan.

A) Oligonucleótido monocatenario específico marcado con un fluoróforo donador en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3' B) El Cebador o primer es alargado por la Taq polimerasa y la sonda TaqMan está unida a la hebra del DNA que es su cadena complementaria. La hidrólisis libera al donador del híbrido sonda/DNA target, causando un aumento en la fluorescencia. Fuente: Ilustración modificada y extraída de *Bionucleics*, Sigma Life Science Custom Products (2014), Primers and Fluorescent Probes. Recuperado de https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Brochure/fluorescent_dna_probes.pdf

Durante la fase de hibridación, la sonda sufre cambios conformacionales en el reportero y en el *quencher*, por lo tanto, se encuentra hibridada con el ADN molde (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Después de esta fase y durante la fase de extensión se da la amplificación del templado, el cual permite que la Taq polimerasa realice su actividad exonucleasa 5'-3' y rompa la unión del donador y apagador; es decir, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, ocasionando la liberación del fluoróforo donador, y estos al estar separados, se emite la fluorescencia y este es captado por el detector del termociclador (Fig.9). Cabe recalcar que la enzima se extiende desde un cebador corriente arriba a la región de la

sonda (Arya *et al.*, 2005). La señal medida en el final de la extensión es directamente proporcional a la cantidad de ADN o producto específico amplificado (Navarro *et al.*, 2015).

Tabla 7. Longitud de onda de absorción y emisión para los diferentes fluoróforos con sus respectivos quencher.

5' FLUOROPHORE	Abs [nm]	Em [nm]	3' QUENCHER
FAM [FAM]	495	520	TAM, BHQ1, DAB, Eclip
TET [TET]	521	536	TAM, BHQ1
JOE [JOE]	520	548	TAM, BHQ1, BHQ2
Yakima Yellow [YAKYE]	530	549	BHQ1, Eclip
HEX [HEX]	535	556	TAM, BHQ1, BHQ2, Eclip
Cyanine3 [CY3]	552	570	BHQ1, BHQ2, BBQ650
ATTO 550 [ATTO550]	554	576	TAM, BHQ2
TAMRA [TAM]	544	576	BHQ2
ROX [ROX]	575	602	TAM, BHQ2, BBQ650
Texas Red [TxRed]	583	603	BHQ2, BBQ650
Cyanine3.5 [CY35]	588	604	BHQ2
LightCycler 610 [LC610]	590	610	BHQ2
LightCycler 640 [LC640]	625	640	BHQ2, BBQ650
ATTO 647N [ATTO647N]	644	669	BHQ2, BHQ3, BBQ650
Cyanine5 [CY5]	649	670	BHQ2, BHQ3, BBQ650
Cyanine5.5 [CY55]	675	694	BHQ2, BHQ3, BBQ650
ATTO 680 [ATTO680]	680	700	BHQ3, BBQ650

Table of available dye-quencher combinations.

Fuente: Tabla extraída de Eurofins Genomics. qPCR Probes .Recuperado de https://www.eurofinsgenomics.eu/media/1034728/qpcrprobe_brochure_dinlang_web.pdf

3.7. Inmunohistoquímica (IHQ)

Es una técnica de inmunotinción que detecta *in situ* componentes celulares y extracelulares (antígenos) presentes en los tejidos por medio de reacciones antígeno-anticuerpo que se visualiza mediante microscopía óptica o electrónica (Lacave y García,2014).

3.7.1 Fundamento

Permite la visualización de antígenos presentes en los tejidos por medio del uso de un anticuerpo secundario que hará contacto directo con el anticuerpo primario (se une al antígeno) mediante un complejo enzimático y un sustrato cromógeno, capaces de lograr una activación enzimática a nivel de este último que finalmente producirá una reacción visible (color café) en el lugar donde está presente el antígeno (Zertuche *et al.*,2013).

Esta técnica es muy empleada por su gran especificidad y alta afinidad que poseen los anticuerpos sobre los antígenos. Se puede ejecutar sobre tejidos en fresco, fijados en formol, en material de coágulos citológicos e incluidos en parafina, permitiendo la evaluación paralela de la morfología (Jorge *et al.*, 2007; De Dios y Acosta, 2018).

La inmunohistoquímica es una técnica fundamental que ha contribuido en el diagnóstico histopatológico (Ortiz, 2018) de las enfermedades, primordialmente de las neoplásicas. Esta inmunotinción emplea muchos biomarcadores capaces de detectar tejidos tumorales benignos y malignos en las diversas muestras histológicas. Esta sobreexpresión de antígenos (proteínas) a detectar puede ser de los biomarcadores C-erbB2, Ki-67, p16INK4a, entre otros (Zertuche *et al.*, 2013).

3.7.2. Cáncer de mama y receptores hormonales

Los tipos de CaMa se divide en tres según la sobreexpresión de los receptores hormonales, los cuales son: los receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2-neu), también conocido como C-erbB2 (Maschio *et al.*,2014; Del Rocío Góngora *et al.*,2016).

La proliferación celular ha tenido un papel transcendental en la clasificación tumoral y por consiguiente forma parte de los factores pronósticos y predictivos. Es relacionada dentro del grado histológico, al tener en cuenta las mitosis celulares del tumor.

Igualmente, sirve para la caracterización a nivel de fenotipo; para diferenciar los subtipos genéticos del cáncer de mama (Panal *et al.*, 2014).

La expresión de HER-2 se ha relacionado con la proliferación de Ki-67. Además se ha vinculado a estos marcadores inmunohistoquímicos con el grado tumoral y con los pronósticos más graves en las pacientes con CaMa (Chiang *et al.*, 2009; Seshie *et al.*, 2015; Del Rocío Góngora *et al.*, 2016).

3.7.2.1. HER-2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), también conocido como C-erB2, ErB-2 o Her2/neu

Es una proteína receptora transmembrana que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER), localizado en el cromosoma 17, presente en las células de los tejidos normales y en la mayoría de los tumores (Quirós *et al.*, 2015) El gen HER-2 es un protooncogén que codifica proteínas HER-2, que en estados normales participan en la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación y la supervivencia celular. (Bayrak *et al.*, 2013; Quirós *et al.*, 2015) HER-2, también es conocida como oncoproteína HER-2, ErB-2, C-erB2 o H er2/neu, por contribuir en la producción y progresión del cáncer (Breastcancer, 2019; SEOM, 2020)

3.7.2.1.1. HER-2 y las células mamarias

Las proteínas HER-2 se encuentran en la superficie de las células de la mama (células de los lobulillos, en los conductos galactóforos y las células de los tejidos grasos y fibrosos de la mama), tanto en las células normales como en las células cancerosas. Las células sanas normalmente contienen dos copias del gen HER-2 pero cuando hay copias adicionales de HER-2 (hasta 100 veces más), el gen se amplifica (produce muchas copias de sí mismo) generando una producción desmedida del gen HER-2 de manera que origina muchos receptores HER-2 (Tai *et al.*, 2010; Breastcancer, 2019; SEOM, 2020,). (Fig.10)

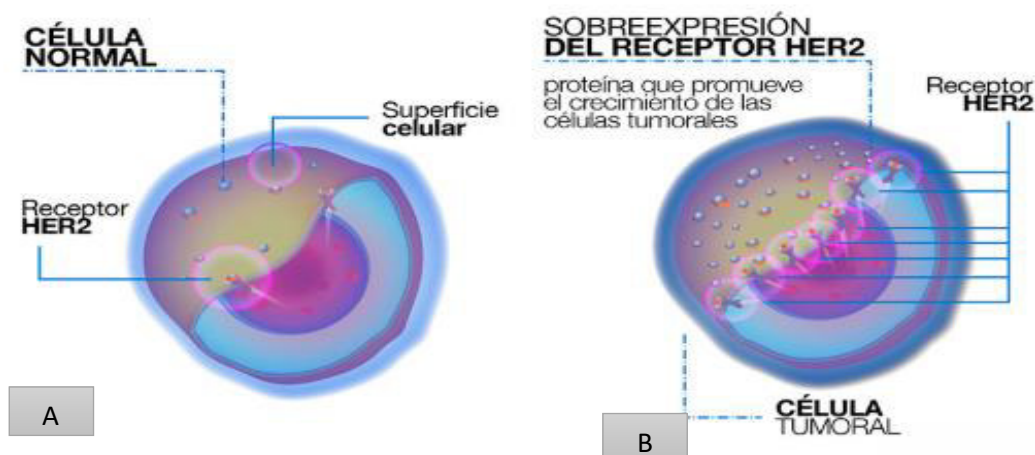


Fig. 10. Receptor HER-2 en la célula.
 (A) Expresión del receptor HER-2 en una célula normal. (B) Sobreexpresión del receptor HER-2 en una célula tumoral. Fuente: (11 mayo 2020) <https://www.amgen.es/es-es/enfermedades-tratadas/cancer-de-mama/proteina-her2-positiva/>

De esta manera se visualiza la sobreexpresión de esta proteína y por consiguiente provoca una desactivación de los puestos de control, permitiendo que las células de la mama se dividan, se multipliquen y crezcan a mayor velocidad que las células normales. (He *et al.*, 2009; Breastcancer, 2019; NIH, 2020; SEOM, 2020).

HER-2, se sobreexpresa hasta en un 30% en los cánceres de mama (Tan y Yu, 2013; Quirós *et al.*, 2015). Esta sobreexpresión ha sido asociada al CaMa avanzado, lo que le atribuye un valor pronóstico en los tejidos tumorales y se asocia con tumores más agresivos y un peor pronóstico (Cho *et al.*, 2003; Breastcancer, 2019; SEOM, 2020).

3.7.2.2. Ki-67

Es una proteína nuclear que se encarga de regular la proliferación celular. Está de forma constante en todas las fases del ciclo celular; no obstante, su presencia en la fase G1 puede variar; mientras que en G0 (estado de no proliferación) se degrada rápidamente. La expresión de la proliferación celular se da tanto tejido normal como

en el maligno alcanzando niveles máximos de expresión durante la mitosis (Poblete, 2001; Delgado, 2015; Mannell, 2016).

Este marcador es muy empleado en los ensayos inmunohistoquímicos para determinar la proliferación de las células (Bullwinkel *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2019) cuya expresión en los tumores mamarios se ha relacionado con los pronósticos más graves (Panal *et al.*, 2014, SEOM, 2020).

IV. FORMULACIÓN E HIPÓTESIS

4.1. Formulación

¿Está presente el Virus Papiloma Humano de alto riesgo tipo 16 (HPV-16) en biopsias de carcinoma mamario obtenidos de pacientes atendidos en el Hospital Santa Rosa?

4.2. Hipótesis

H1: El virus Papiloma Humano tipo 16 se encuentra presente en las biopsias obtenidas de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario atendidas en el Hospital Santa Rosa.

H0: No se detecta la presencia del virus Papiloma Humano tipo 16 en las biopsias obtenidas de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario atendidas en el Hospital Santa Rosa.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la presencia del Virus Papiloma Humano de alto riesgo tipo 16 (HPV -16) en biopsias de tejido mamario parafinado con diagnóstico clínico de carcinoma mamario en pacientes atendidos en el Hospital Santa Rosa.

5.2. Objetivos específicos

- Obtener el ADN del HPV 16 presente en muestras de tejido mamario parafinado.
- Estandarizar la PCR en Tiempo Real para la amplificación del gen E6 encontrado en el Virus Papiloma Humano de alto riesgo tipo 16 (HPV-16).
- Evaluar la presencia del Virus Papiloma Humano de alto riesgo tipo 16 (HPV-16) en muestras de tejido mamario parafinado.
- Evaluar la sobreexpresión de los marcadores inmunohistoquímicos/receptores C-erbB2 y Ki-67 en muestras de tejido mamario parafinado.
- Evidenciar que características clínicopatológicas y sociales hacen que favorezca la presencia del HPV-16 en muestra de tejido mamario parafinado.

VI. VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Variable dependiente

Presencia del Virus Papiloma Humano de alto riesgo tipo 16 (HPV-16) en biopsias de carcinoma mamario de pacientes del Hospital Santa Rosa (HSR) por medio de la qPCR.

6.2 Variables independientes

- **Social:** edad de la paciente.
- **Clínicos:** tipo de carcinoma mamario, grado histológico del carcinoma mamario y sobreexpresión de los receptores C-erbB2 y Ki-67 en los tejidos de CaMa (determinados por el área de Patología del HSR)

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño de investigación

Estudio descriptivo-retrospectivo.

7.2. Delimitación espacial

El presente estudio se limitó al HSR, laboratorio de Histopatología, ubicado en la Av. Simón Bolívar 8, Distrito de Pueblo Libre 15084 (entidad que nos proporcionó las muestras del año 2019) y a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Virología Clínica y Molecular, situado en la Ciudad Universitaria - UNMSM, Cercado de Lima; donde se ejecutó el procesamiento de las muestras (extracción del ADN, concentración del ADN, calidad del ADN y PCR en Tiempo Real).

7.3. Población y muestra

- **Población:** Pacientes mujeres de 32 a 93 años, atendidas en el servicio de patología del Hospital Santa Rosa, Lima con diagnóstico de cáncer mamario.
- **Muestra:** 32 muestras de biopsia de tejido mamario de pacientes mujeres con diagnóstico clínico positivo de carcinoma mamario atendidas en el HSR, Lima.

7.4. Muestra biológica

Cada muestra que se empleó en esta investigación estaba constituida por triplicado de cortes histológicos, del tumor de mama de aproximadamente 2 micras depositadas en láminas de polilisina, las cuales fueron catalogadas como diagnóstico clínico positivo de carcinoma mamario por el personal del área de Histopatología del HSR.

7.5. Colección de muestras

Las muestras fueron obtenidas del banco de muestra del Hospital Santa Rosa en el periodo enero – abril del 2019. Puesto que los materiales biológicos fueron adquiridos del banco de muestras previo permiso al encargado del área de Histopatología del Hospital Santa Rosa, no fue necesario contar con ficha de consentimiento del paciente.

7.6. Aprobación del proyecto

Esta investigación forma parte del proyecto: “Evaluación de la relación del cáncer y virus del papiloma humano en biopsias de mama mediante qPCR e inmuistoquímica en el Hospital Santa Rosa durante el 2019”, financiado por el vicerrectorado de investigación y posgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (B19102081) y a su vez fue admitido por el comité de ética de Investigación del Hospital Santa Rosa.

(Anexo 1)

7.7. Experimentación

7.7.1. Extracción del ADN

Con el fin de evitar la contaminación cruzada entre las muestras, se tuvo un especial cuidado en la manipulación de estas.

Para la extracción de ADN del HPV-16 presentes en las 32 muestras de tejido mamario parafinado se empleó el kit NucleoSpin DNA FFPE XS. Por lo que, las operaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera:

1. Desparafinación

A las 32 muestras embebidas en parafina, se le añadieron 400 μ L de disolución de parafina, se incubó durante 3 min a 60°C (para fundir la parafina), luego se agitó fuertemente la muestra en vórtex (a 60°C).

2. Lisis

Después de concluir con el proceso de desparafinación se agregó 100 μ L de Buffer FL (Buffer Lisis), se colocaron en vórtex, luego se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. Se formaron dos fases, en la parte inferior se formó una fase acuosa (ADN) y en la parte superior una fase orgánica (proteínas y lípidos). Posteriormente, se eliminó la fase orgánica (proteínas y lípidos). Se incorporó 10 μ L de solución de Proteinasa K directamente en la fase inferior (acuosa) y se mezcló la fase acuosa pipeteando la solución de arriba a abajo varias veces para que la Proteinasa K se mezcle bien con el tampón de lisis.

En seguida, se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas para lisar la muestra, luego por segunda vez se agregó 10 μ L de solución de Proteinasa K para una mejor solubilización de la muestra y se continuó con la digestión enzimática durante la noche, para aumentar el rendimiento del ADN amplificable. Al día siguiente, se realizó un vórtex por 5 segundos.

3. Separación del ADN de los restos celulares (Decrosslink)

Después de terminar la lisis se agregó al tubo 100 μ L de Decrosslink Buffer (D-Link) y se agitó suavemente en vórtex para mezclar Buffer D-Link en la Fase acuosa (inferior). Se centrifugó a 11 000 x g durante 30 s, se incubó a 90°C durante exactamente 30 min, se realizó un vórtex durante 5 segundos y se dejó enfriar a temperatura ambiente (aprox. 2 min). Seguidamente se realizó un *spin down* a 11 000 x g por 1 s.

4. Ajustes de las condiciones de Unión del ADN a la membrana de sílice

Al término del proceso de separación del ADN de los restos celulares (Decrosslink) se agregó al tubo 200 μ L de etanol al 100% y se realizaron dos vórtex por 5 s. Luego se realizó un *spin down* a 1 000 x g por 1 s.

5. Unión del ADN a la membrana de sílice

Para cada preparación, se utilizó una columna NucleoSpin® DNA FFPE XS (anillo verde) colocada en un CollectionTube (2 mL). En la columna NucleoSpin® DNA FFPE XS se pipeteó 450 µL de la fase acuosa (inferior). Seguido se centrifugó durante 30 s a 2 000 x g

6. Lavado y secado de la membrana de sílice

6.1. 1er lavado

Se agregó 400 µL del tampón B5 a la columna NucleoSpin® DNA FFPE XS. Después se centrifugó durante 30 s a 11 000 x g.

Se desechó el tubo de recolección con flujo continuo y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección (2 mL).

6.2. 2do lavado

Se añadió 400 µL del tampón B5 a la columna NucleoSpin® DNA FFPE XS. Luego se centrifugó durante 2 min a 11 000 x g

Se desechó el tubo de recolección con flujo continuo y se colocó la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga libre de nucleasas (1.5 mL, no incluido).

7. Elución del ADN

Se pipeteó 20 µL de Buffer BE directamente al centro de la membrana de sílice de la columna. Luego se centrifugó durante 30 s a 11 000 x g.

8. Eliminación del residuo de etanol

Los tubos que contenían las muestras de ADN (aprox. 20 μL) fueron incubados con la tapa abierta durante 8 min a 90 °C.

7.7.2. Concentración y calidad del ADN

Las concentraciones del ADN viral fueron evaluadas utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes, marca Denovix, modelo DS-11FX+ (USA). Este equipo es muy sensible, por lo que es capaz de medir la absorción de una muestra, desde un tamaño mínimo de 0.5 μL de volumen y detectar ADN desde 0.75 ng/ μL . Además, mide el rango de longitud de onda de 190-840nm. Las concentraciones de las muestras de ADN se calcularon teniendo en cuenta el valor de la absorbancia obtenidas a una longitud de onda de 260 nm y, la relación de absorbancias A_{260} / A_{280} se emplearon para indicar la pureza de las muestras de ADN purificadas. Se recolectó 2 μL de cada muestra y se procedió a ejecutar la lectura. El equipo estableció la calidad de la muestra por medio de los valores expresados en la ratio de las absorbancias $A_{260/280}$. Se consideró ADN de pureza óptima cuando se evidenció que la relación de $A_{260/280}$ tuvo un valor entre 1.8-2.0 ; ADN de pureza aceptable entre 1.6 -1.8 y ADN no puro cuando el valor de $A_{260/280}$ es < 1.6, el cual indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y una ratio de $A_{260/280} > 2.1$ (contaminación con RNA). Del mismo modo concuerdan con los valores indicativos de pureza en muestras de ADN según el Banco Nacional de ADN Carlos III. (Tabla 8)

Tabla 8. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.

Ratio	Valor	Pureza
$A_{260/280}$	1.8-2	ADN de pureza óptima.
	1.6-1.8	ADN pureza aceptable.
	<1.6	Presencia de compuestos aromáticos.
	> 2.1	Contaminación con ARN.
$A_{260/230}$	<1.5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles.

Fuente: Banco Nacional de ADN Carlos III, 2018.

7.7.3. PCR en Tiempo Real

Se llevó a cabo la PCR en Tiempo Real con la finalidad de detectar el ADN del HPV-16 siguiendo el protocolo de Damin *et al.* (2004) y Friega *et al.* (2012), modificados para el presente trabajo. Por tal razón, la validación de la presencia de este tipo de virus fue de acuerdo con el software del termociclador mic v2.8.0.

Se empleó el kit SensiFast Probe No -ROX y se siguieron las instrucciones de la casa comercial. Para ello, se utilizaron *primers* específicos y sondas TaqMan descritos por Schmitz *et al.* (2009), dichas secuencias se describen en la Tabla 9.

Los *primers* estaban dirigidos a una región altamente conservada del gen viral, E6. Se eligió con base en los registros de otros artículos en donde diferentes autores lo emplearon para este tipo de investigación (Liu *et al.*, 2001; Damin *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2008; Frega *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2012). Estos partidores, así como la sonda TaqMan amplifican un fragmento de 128 bp.

Tabla 9. Primers y sonda TaqMan para la detección de una región del gen E6 del genoma del HPV-16.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto de la qPCR
HPV-16 For	GAACCGAAACCGGTTAGTATAA	128 bp
HPV-16 Rev	ATGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGT	
HPV-16 p	6HEX – CATTTTATGCACCAAAAAGAGAACTGCAATGTTTC – BHQ1	

7.7.3.1. Condiciones de la amplificación y estandarización de la qPCR

Para la elaboración de la mezcla para la PCR se utilizó por cada reacción 10 μL de la Taq polimerasa (2X SensiFast Probe No-ROX Mix), 0.8 μL para cada primer (HPV-16 For y HPV-16 Rev), 0.4 μL para la sonda TaqMan (HPV-16 Probe) ,7 μL de agua ultrapura, y 1 μL de ADN viral, obteniendo un volumen final de 20 μL . Tal como se muestra en la Tabla 10.

Para la estandarización de la qPCR, se empleó como control positivo ADN del HPV-16 de cáncer de cérvix, las cuales fueron proporcionadas por el Instituto de Patología y Biología Molecular Arias Stella liderado por el doctor Iwasaki y como control negativo, agua ultrapura.

Tabla 10. Componentes y cantidades de la mezcla optimizada para la qPCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen μL x 1 reacción	15 reacción
<i>2X SensiFast Probe No-ROX Mix</i>	2x	2x	10	150
<i>HPV -16 For</i>	10 μM	10 μM	0.8	12
<i>HPV- 16 Rev</i>	10 μM	10 μM	0.8	12
<i>HPV -16 PROBE</i>	10 μM	5 μM	0.4	6
<i>DNA</i>	-	-	1	15
<i>H2O para PCR</i>	-	-	7	105
Volumen Total			20	300

Reactivo	15 reacción (μL)
<i>2X SensiFast Probe No-ROX Mix</i>	150
<i>HPV -16 For</i>	12
<i>HPV -16 Rev</i>	12
<i>HPV -16 PROBE</i>	6
<i>H2O para PCR</i>	105
Volumen total	285

Se agregó por tubo 19 μL de la mezcla para la PCR en Tiempo Real

Se agregó 1 μL de ADN (FUERA DE CABINA)

Se optimizó las condiciones de ciclaje de la qPCR programando el termociclador según como se muestra en la Tabla 11. Estas condiciones fueron empleadas para todas las corridas de la qPCR.

Tabla 11. Programa de ciclaje óptimos para la PCR en Tiempo Real.

Paso	Temperatura(°C)	Tiempo(s)	Nº de ciclos
<i>Activación inicial</i>	95	900 (15 min)	1
<i>Denaturación</i>	94	5	45
<i>Hibridación (Annealing)</i>	50	20	
<i>Extensión</i>	60	40	

7.7.4. Análisis Inmunohistoquímico (IHQ)

Para el análisis inmunohistoquímico de las 32 muestras con CaMa se emplearon marcadores para HPV-16. Esta técnica fue ejecutada por el personal del área de Histopatología del H.S.R. Determinaron si las células presentes en las 32 muestras de las pacientes diagnosticadas con CaMa tenían los receptores C-erbB2 y Ki-67.

7.7.4.1. Criterios de confirmación de la IHQ

Las muestras fueron consideradas positivas para el receptor C-erbB2, cuando el análisis de IHQ proporcionó un resultado de 2+ a 3+ y negativo, cuando presentó un resultado de 0 a 1+.

Con respecto al receptor Ki-67, lo clasificaron como positivo o negativo utilizando el valor ki, el cual indica un porcentaje de crecimiento tumoral. Se catalogó como negativo cuando el índice Ki tuvo un valor de 0% y positivo cuando este valor fue superior a 0%.

VIII. RESULTADOS

8.1. Concentración y calidad de los ADN extraídos de las muestras de CaMa

Tanto las concentraciones como la calidad del ADN de las 32 muestras de CaMa fueron variables, oscilaron desde una concentración mínima de 1,006 ng/μL hasta una concentración máxima de 158 ng/μL (Tabla 12).

La calidad de los ADN se estableció de acuerdo con los valores expresados en la ratio de las absorbancias $A_{260/280}$. Del total de muestras el 34.4% (11 muestras) alcanzaron un valor de 1.8 - 2.0; el 62.5% (20 muestras) obtuvieron un valor entre 1.6 - 1.8 y el 3.1% (1 muestra), un valor <1.6 (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración y calidad de las 32 muestras de ADN obtenidos de los cortes histológicos de CaMa parafinado de pacientes atendidos en el H.S.R.

Nº	Código de la muestra	Concentración ng/μL	Índice A _{260/280}
1	19 - 025 ONCO	2,08	1,72
2	19 - 040 ONCO	1,792	1,69
3	19 - 360 ONCO	2,299	1,75
4	19 - 574 ONCO	2,927	1,73
5	19 - 378 ONCO 6	1,006	1,82
6	19 - 410 ONCO 2	3,416	1,63
7	19 - 492 ONCO 7	2,631	1,71
8	19 - 518 ONCO 5	4,35	1,78
9	19 - 583 ONCO	2,6212	1,69
10	19 - 617 ONCO	4,922	1,83
11	19 - 668 ONCO	3,181	1,95
12	19 - 685 ONCO 6	72,369	1,78
13	19 - 742 ONCO	12,131	1,93
14	19 - 751 ONCO	2,292	1,86
15	19 - 753 ONCO	7,051	1,84
16	19 - 772 ONCO	42	1,76
17	19 - 811 ONCO	53,87	1,88
18	19 - 870 ONCO IZQ	8,507	1,71

Continuación de la Tabla 12.

19	19 - 870 ONCO DER	6,963	1,68
20	799 -19 ONCO	6,405	1,74
21	832 19 ONCO	9,528	1,95
22	877 -19 ONCO	44,307	1,87
23	915- 19 ONCO	47,835	1,67
24	849- 19 ONCO	27,777	1,79
25	032- 19 ONCO 6	19,397	1,78
26	949- 19 ONCO	65,366	1,89
27	818- 19 ONCO 5	61,761	1,68
28	829 -19 ONCO 10	44,817	1,76
29	315 -19 ONCO	86,453	1,54
30	832-19 ONCO 9	158,54	1,73
31	092-19 ONCO	4,046	1,86
32	374 -19 ONCO	4,046	1,78

8.2. PCR en Tiempo Real

8.2.1. PCR en Tiempo Real para los controles positivos

Con respecto a los resultados de la tipificación de la PCR en Tiempo Real. Se evaluó la presencia del HPV-16 en las 4 muestras de CaCu, con el fin de confirmar que las muestras de control positivo se encontraban en óptimas condiciones para su posterior uso y a su vez para evidenciar sus respectivos Ct. Se empleó agua ultrapura como control negativo para contrastar que no hay presencia de ADN del HPV-16. Es preciso enfatizar que solo se empleó un control positivo para las posteriores corridas de qPCR.

Se observó la detección del HPV-16 en los 4 controles, de las cuales 2 controles levantaron sus curvas en el ciclo 12 y el resto en los ciclos 13.15 y 15.01 (Fig.11). Siendo los 2 primeros controles los más concentrados y los 2 últimos los menos concentrados, los cuales cumplen con la regla del *Cycle Thershold* (Ct) que nos indica que a mayor número de copias el valor del Ct es menor (Dorak, 2006).

Cycling: HPV 16

Target	HPV 16 → HPV 16 E6
Normalisation	Dynamic
Ignore	First 3 cycles
Exclusion	Extensive with fluorescence cutoff of 5%
Threshold	0.563 (Automatic) starting at cycle 1

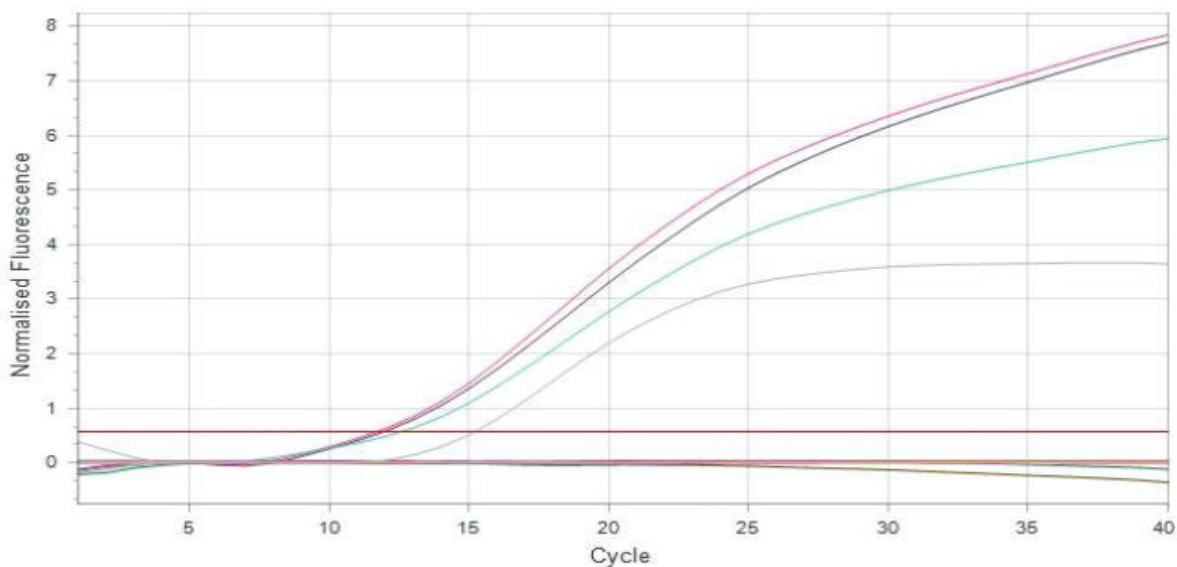


Fig. 11. Resultados de la PCR en Tiempo Real de los controles positivos, muestras de CaCu. Cuyos Ct son 12 para 2 controles positivos y para el resto son 13.15 y 15.01.

8.2.2. PCR en Tiempo Real para las 32 muestras con CaMa del H.S.R.

Según los resultados de la estandarización de la PCR en Tiempo Real para HPV-16, en relación a las 32 muestras de CaMa; se determinó la presencia del HPV-16 en aquellas muestras que presentaron curvas sigmoideas con su Ct respectivo y ausencia del HPV-16, muestras que fueron excluidas; ambos resultados fueron determinados por el software del termociclador micPCR. En la Tabla 13, se aprecian los valores de las Ct. La fig.12 ilustra la presencia y ausencia del HPV-16 con sus respectivos porcentajes; fue detectada la presencia de este virus en 8 de las 32 muestras, el cual representó el 25% del total de casos.

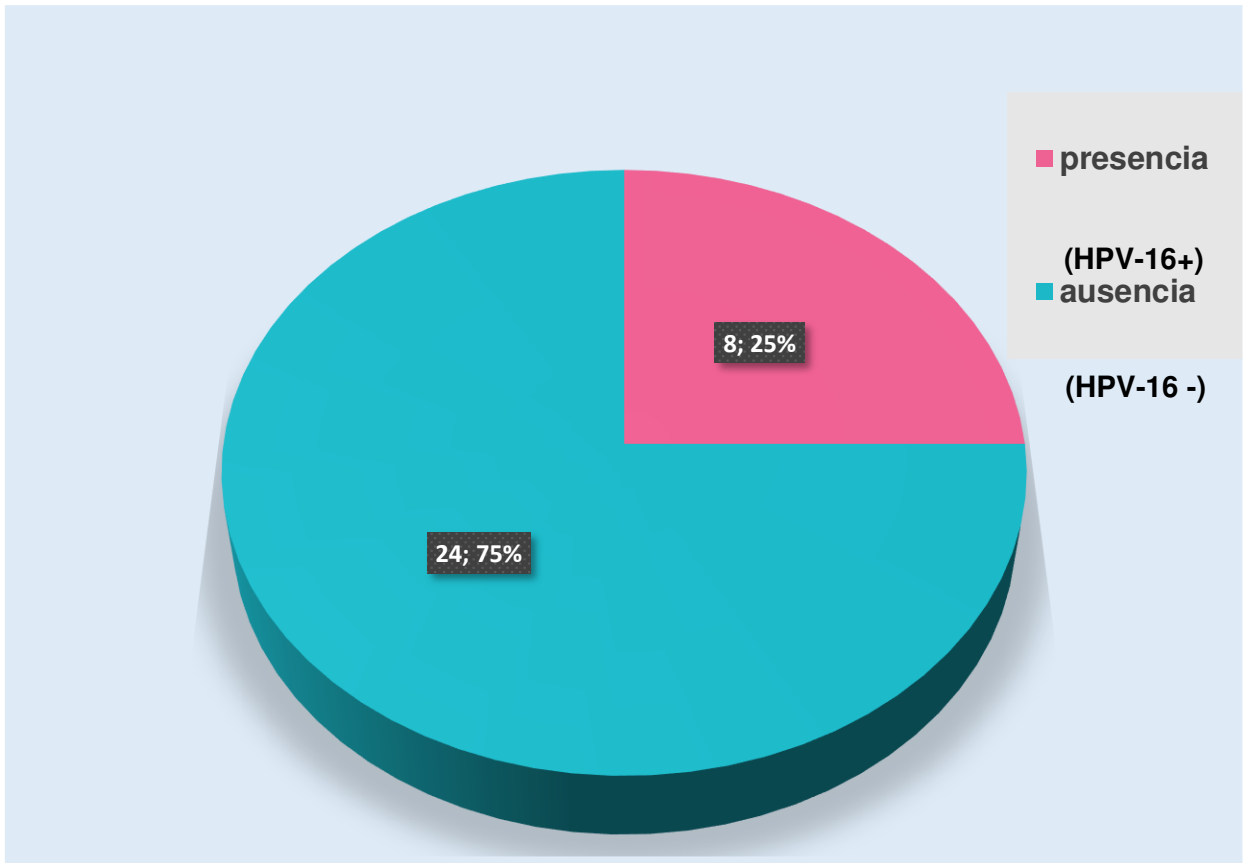


Fig. 12. Presencia y ausencia del Virus Papiloma Humano tipo 16 en las 32 muestras de CaMa.

8.2.3. Curvas sigmoideas de las muestras 19-742 ONCO, 19-811 ONCO, 19-722 ONCO y 19-753 ONCO

En la Fig.13 se destaca las curvas sigmoideas de las muestras 19-742 ONCO,19-811 ONCO,19-722 ONCO y 19-753 ONCO, cuyas Ct fueron 38.09, 39.32, 40.04 y 41.37, respectivamente. Asimismo, se visualiza una exclusión de la muestra 832-19 ONCO 9. El control positivo (muestra de CaCu), tuvo una Ct de 13.15 y el control negativo (agua ultrapura) presentó una ausencia de Ct, lo cual garantiza que no hubo contaminación.

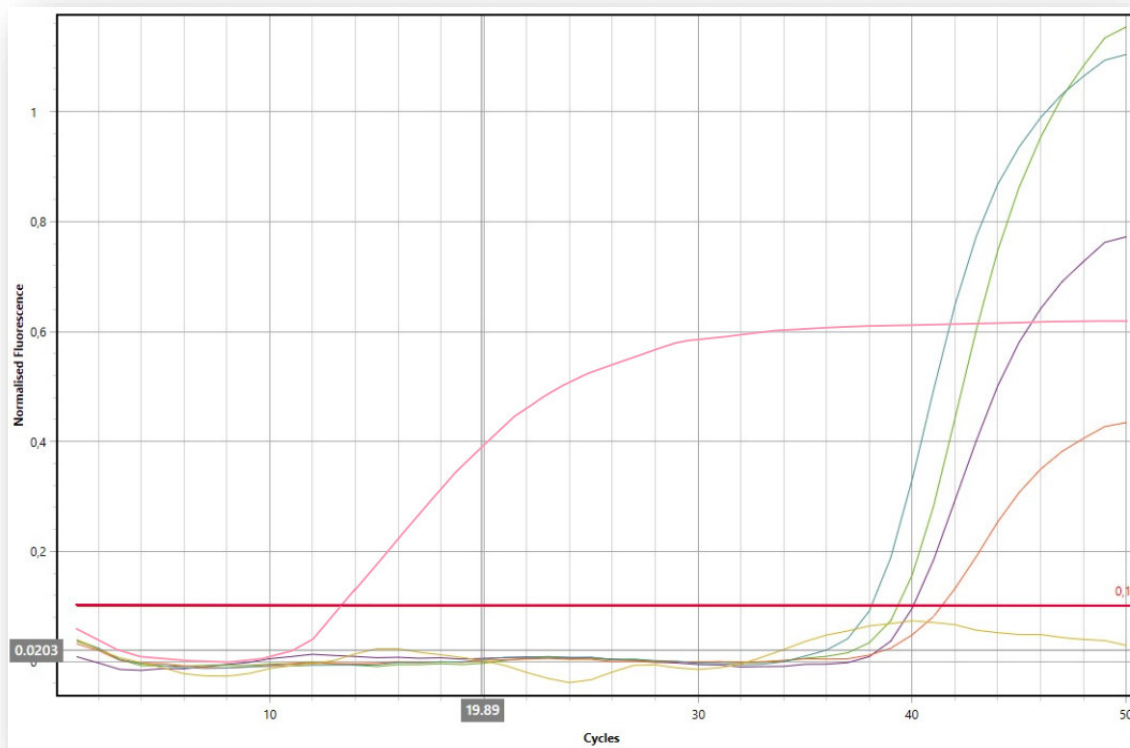


Fig. 13. Resultados de PCR en Tiempo Real de 4 muestras.

La curva sigmoidea color celeste corresponde a la muestra 19-742 ONCO; el color verde, a la muestra 19-811 ONCO; el color morado, a la muestra 19-722 ONCO; el color anaranjado, a la muestra 19-753 ONCO; el color rosado, al control positivo, el color azul, al control negativo y una exclusión de la muestra 832-19 ONCO 9 de color mostaza.

8.2.4. Relación de la ausencia/presencia del HPV-16 y el tipo de CaMa

Los tipos de CaMa que padecían las pacientes del H.S.R. fueron: el carcinoma ductal infiltrante, carcinoma intraductal y carcinoma intraquístico, estos tipos representan el 91% (29 muestras), 6% (2 muestras) y el 3% (1 muestra) del total de los casos, respectivamente. (Fig.14)

El grupo de pacientes con carcinoma ductal infiltrante estaba constituido por 29 pacientes, de las cuales 7 manifestaron presencia del HPV-16 y 22 ausencia del mismo virus; el sector de pacientes con carcinoma intraductal estaba conformado por 2 pacientes, 1 caso tuvo presencia del Virus Papiloma Humano tipo 16 y 1 caso presentó ausencia del HPV-16 y el grupo de pacientes con carcinoma intraquístico que estaba constituido por 1 no se confirmó la presencia del HPV-16. (Fig.15) Por lo tanto, de los 8

casos positivos; el carcinoma ductal infiltrante representó el 87% (7 casos) del total de casos positivos; el carcinoma intraductal, el 13% (1 caso) y el carcinoma intraquístico, el 0%.(Fig.15)

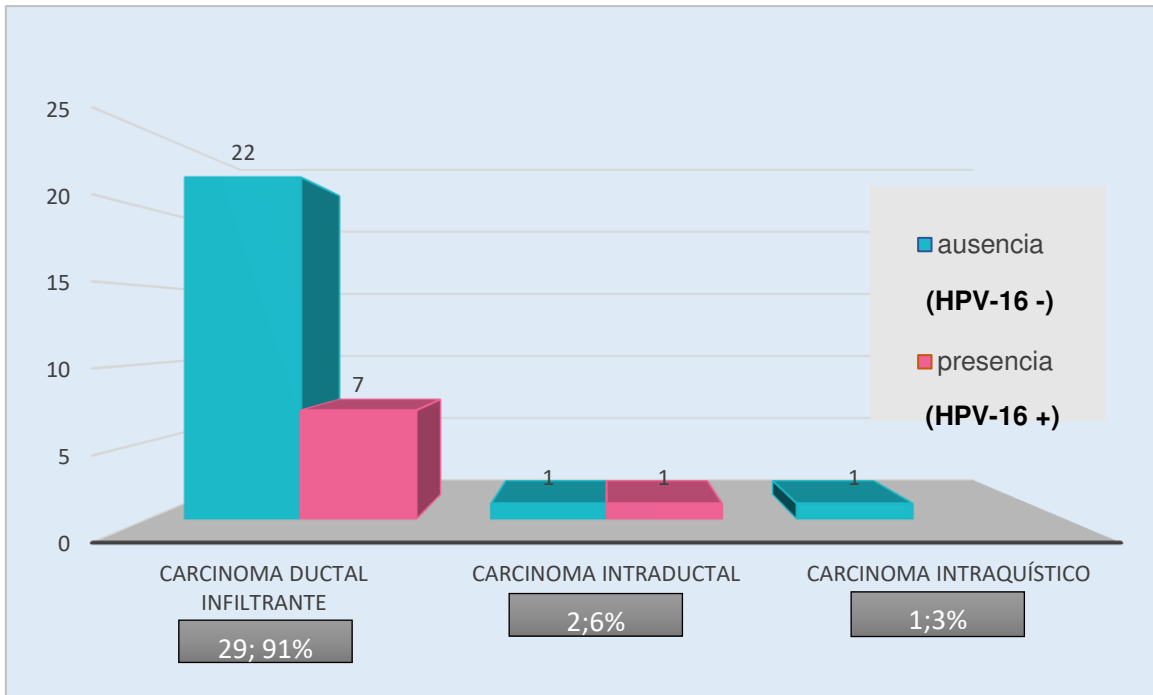


Fig. 14. Presencia y ausencia del HPV-16 en cada tipo de CaMa, analizados en las 32 muestras.

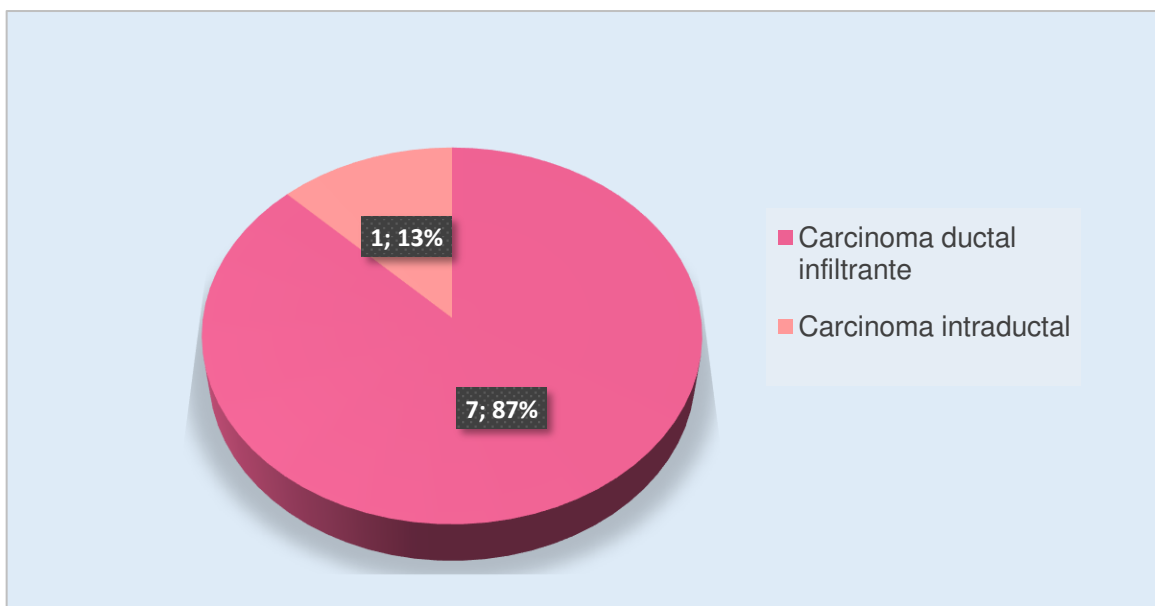


Fig. 15. Porcentaje de la presencia dle HPV-16 en cada tipo de CaMa, analizados en las 8 muestras positivas.

8.2.5. Relación de la ausencia/presencia del HPV-16 y el grado histológico de CaMa

Los grados histológicos de CaMa que adolecían las pacientes del HS.R. fueron: grado I (GI), grado II (GII) y grado III (GIII), los mismos representaron el 6% (2 muestras) ,47% (15 muestras) y el 47% (15 muestras) del total de los casos, correspondientemente (Fig.16).

El total de pacientes con GI de CaMa fueron 2, de los cuales ambos manifestaron ausencia del HPV-16; el conjunto de pacientes con GII estaban constituidos por 15 pacientes, en 2 casos se detectaron presencia del HPV-16 y 13 casos, ausencia del mismo y el grupo de pacientes con GIII que estaba formado por 15 pacientes, 6 de ellos tenían presencia del HPV-16 y 9 pacientes, ausencia del HPV-16 (Fig.16). De los 8 casos positivos; la mayoría fueron del GIII, que representó el 75% (6 casos), luego le siguió el GII con 25% (2 casos) y por último el GI con un 0% (Fig.17).

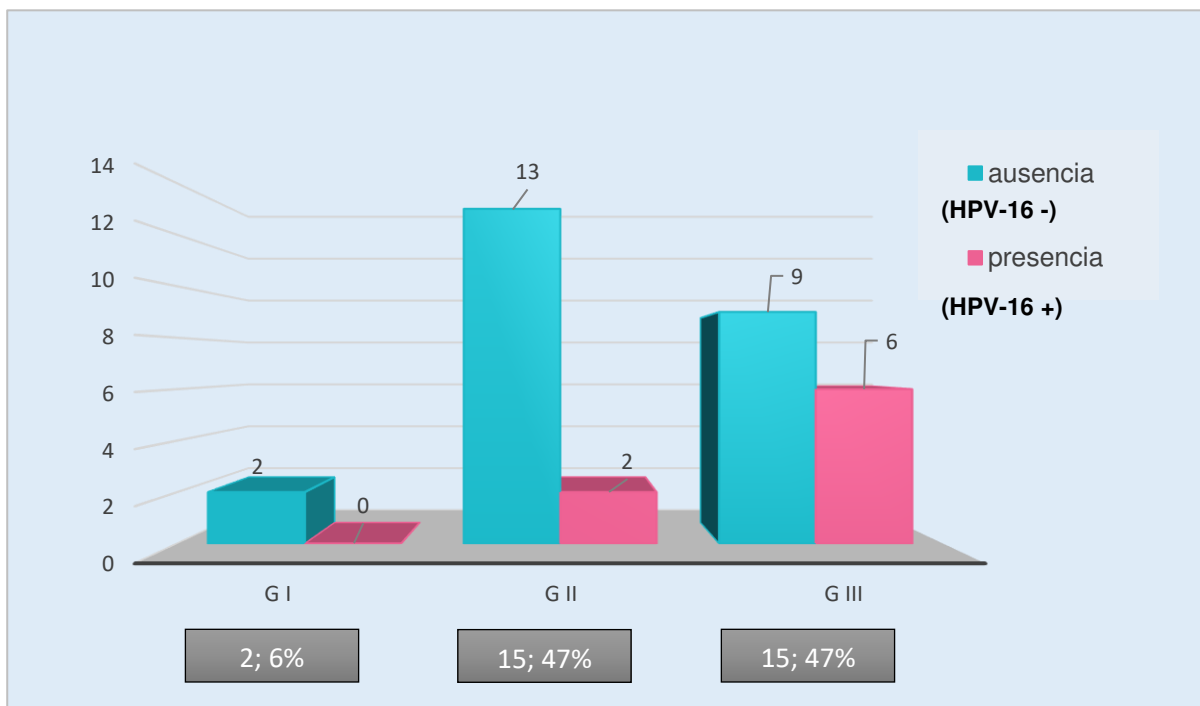


Fig. 16. Presencia y ausencia del HPV-16 en cada grado histológico de CaMa, analizados en las 32 muestras.

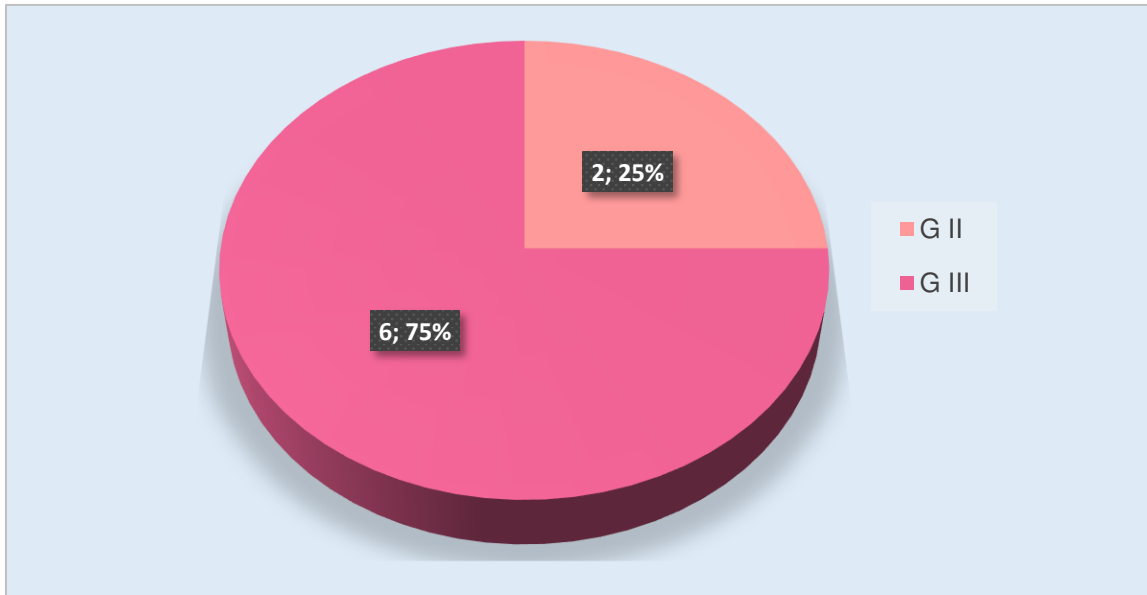


Fig. 17. Porcentaje de la presencia del HPV-16 en cada grado histológico de CaMa, analizados en las 8 muestras positivas.

8.2.6. Relación de la ausencia/presencia del HPV-16 y la edad de las pacientes

El rango de las edades de las mujeres con CaMa atendidas en el HSR fluctuó de 32 a 93 años, cuya mediana fue de 59 años. El valor de la mediana obtenida sirvió para hacer un fraccionamiento; el primer grupo estaba organizado por las mujeres con un valor menor a 59 años, siendo un total de 15 pacientes (47%) y el segundo grupo, por pacientes mayor o igual a 59 años, siendo un total de 17 pacientes (53%) (Fig.18).

El grupo de pacientes menores a 59 años presentó 4 pacientes con HPV-16 y 11 pacientes sin HPV-16. El segundo grupo (pacientes mayores o igual a 59 años), manifestó 4 pacientes con HPV-16 y 13 pacientes sin HPV-16. (Fig.19). Del total de casos positivos (8 pacientes), el 50% fueron mujeres menores de 59 años y el otro 50% fueron mujeres con una edad mayor o igual a 59 años. En suma, en ambos grupos de edades hubo la misma cantidad de pacientes con CaMa con presencia del HPV-16.

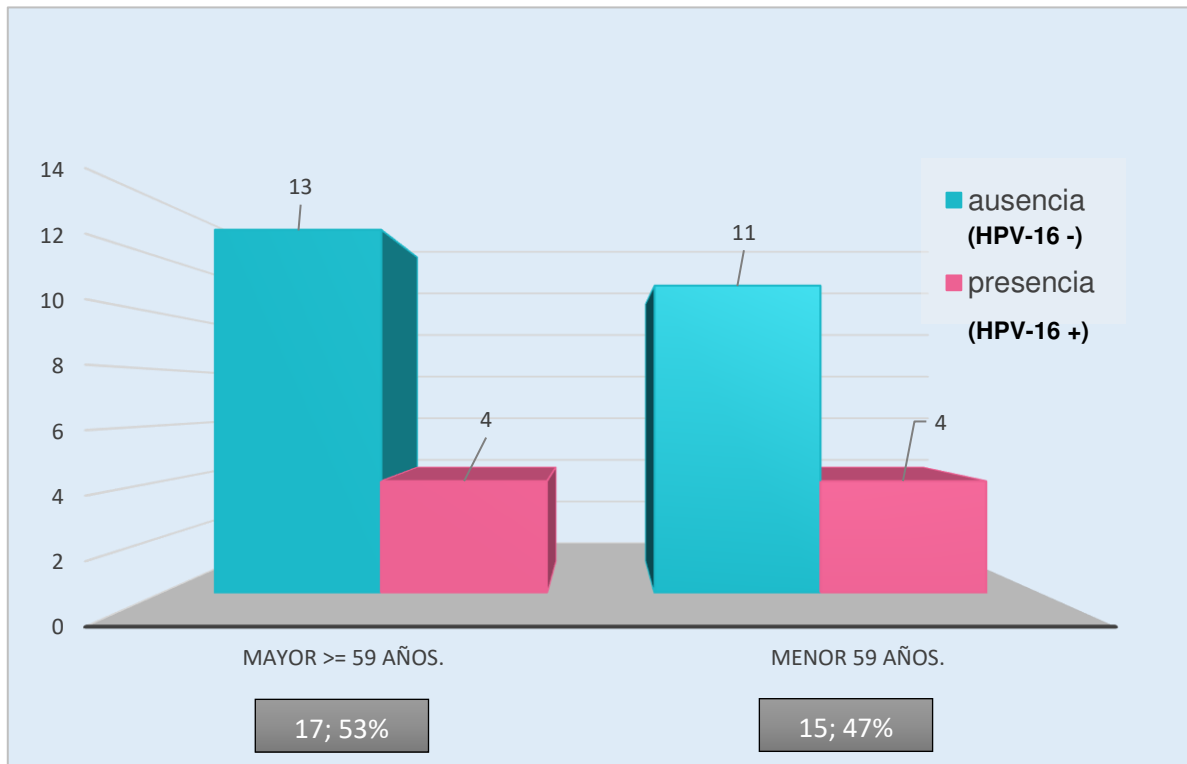


Fig. 18. Presencia y ausencia del HPV-16 en cada grupo de mujeres (grupo menores de 59 años y mayor o igual a 59 años) con CaMa, analizados en las 32 muestras.

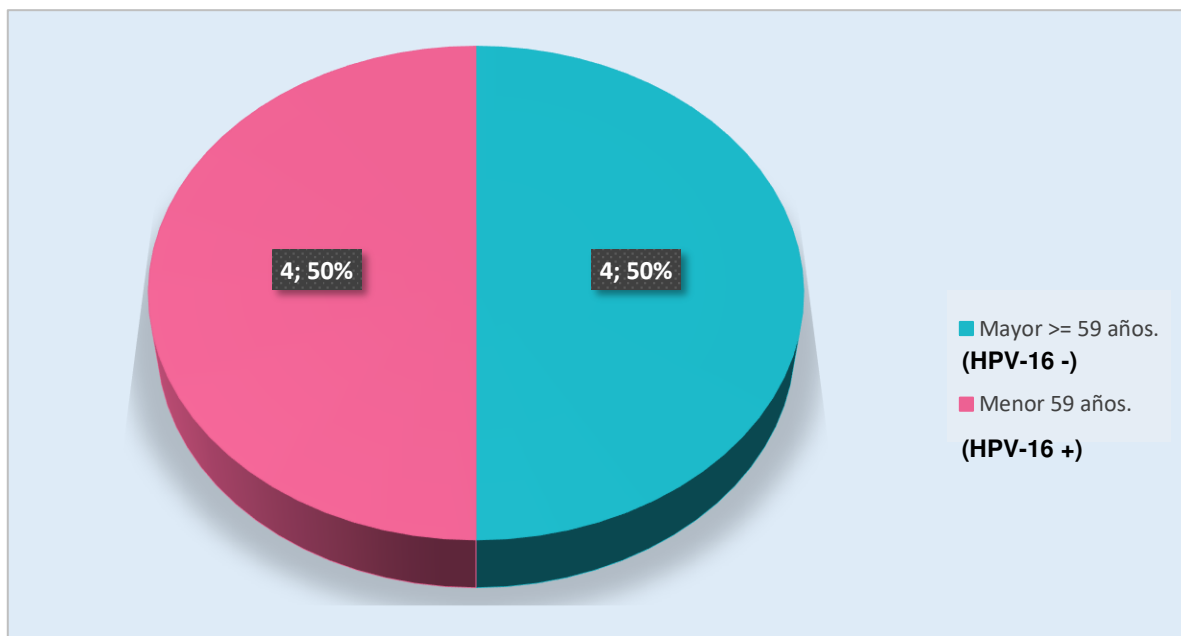


Fig. 19. Porcentaje de la presencia del HPV-16 en cada grupo de edades de mujeres con CaMa menor a 59 años y mayores o igual a 59 años, analizados en las 8 muestras positivas.

8.2.7. Consolidado de las 32 muestras de CaMa

En la Tabla 13 se visualiza el consolidado de las 32 muestras de CaMa, el cual abarca los datos de las variables independientes (social: edad y clínicos: tipo de CaMa y Grado histológico de CaMa), y los datos de la variable dependiente (los valores de las concentraciones de la extracción de los ADN y los valores de Ct).

Tabla 13. Consolidado de las 32 muestras con CaMa.

Nº	Código de la muestra	Edad	Concentración ng/µL	Ct	Diagnóstico	Grado Histológico
1	19 - 025 ONCO	64	2.08	37.42	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
2	19 - 040 ONCO	68	1.792	excluido	Carcinoma ductal infiltrante.	GIII
3	19 - 360 ONCO	80	2.299	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
4	19 - 574 ONCO	58	2.927	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
5	19 - 378 ONCO 6	85	1.006	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GI
6	19 - 410 ONCO 2	68	3.416	excluido	Carcinoma intraquístico	GII
7	19 - 492 ONCO 7	65	2.631	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
8	19 - 518 ONCO 5	62	4.35	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
9	19 - 583 ONCO	49	2.6212	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
10	19 - 617 ONCO	84	4.922	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
11	19 - 668 ONCO	70	3.181	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
12	19 - 685 ONCO 6	64	72.369	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
13	19 - 742 ONCO	47	12.131	38.09	Carcinoma ductal infiltrante	GIII

Continuación de la Tabla 13.

14	19 - 751 ONCO	48	2.292	37.61	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
15	19 - 753 ONCO	70	7.051	41.37	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
16	19 - 772 ONCO	47	42	40.04	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
17	19 - 811 ONCO	73	53.87	39.32	Carcinoma ductal infiltrante	GII
18	19 - 870 ONCO IZQ	59	8.507	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
19	19 - 870 ONCO DER	59	6.963	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
20	799 -19 ONCO	54	6.405	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
21	832 19 ONCO	67	9.528	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GI
22	877 -19 ONCO	55	44.307	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
23	915- 19 ONCO	48	47.835	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
24	849- 19 ONCO	39	27.777	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
25	032- 19 ONCO 6	48	19.397	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
26	949- 19 ONCO	32	65.366	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
27	818- 19 ONCO 5	63	61.761	25.4	Carcinoma intraductal	GII
28	829 -19 ONCO 10	37	44.817	excluido	Carcinoma intraductal	GII
29	315 -19 ONCO	93	86.453	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
30	832-19 ONCO 9	35	158.54	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII
31	092-19 ONCO	58	4.046	36.83	Carcinoma ductal infiltrante	GIII
32	374 -19 ONCO	38	4.046	excluido	Carcinoma ductal infiltrante	GII

La Tabla 14 proporciona una visión general del porcentaje de las muestras positivas del HPV-16 según su variable independiente (Tipo de CaMa, grado histológico de CaMa y la edad de las pacientes con CaMa) en las 32 muestras analizadas, donde el 25% manifestó presencia del HPV-16 y el resto ausencia.

Tabla 14. Porcentaje de las variables independientes positivas para HPV-16.

Variables independientes		Cantidad de pacientes HPV-16 +	Porcentaje de positivos para HPV-16 de acuerdo con su variable independiente	Porcentaje total de positivos para HPV-16
<i>Tipo de CaMa</i>	Carcinoma ductal infiltrante	7	21.88%	25%
	Carcinoma intraductal	1	3.12%	
	Carcinoma intraquístico	0	0%	
<i>Grado histológico de CaMa</i>	GI	0	0%	25%
	GII	2	6.25%	
	GIII	6	18.75%	
<i>Edad de las pacientes con CaMa</i>	< 59 años	4	12.50%	25%
	≥ 59 años	4	12.50%	

8.2.8. Resultados de la Inmunohistoquímica (IHQ)

Con respecto a los resultados de la inmunohistoquímica (IHQ) para HPV-16 se visualizó que, de las 32 muestras analizadas solo 2 muestras manifestaron la sobreexpresión de los marcadores inmunohistoquímicos C-erbB2 y Ki-67 (Tabla 15), el cual representó el 6.25% del total de los casos, las 30 muestras restantes no sobreexpresaron estos receptores en un 93.75% (Fig.20).

Se puede observar en la Fig.20 una gráfica comparativa entre la técnica molecular qPCR representada por la línea morada y la técnica de IHQ, por la línea amarilla. A simple vista se aprecia que de los 8 HPV-16+ (25%) para qPCR, solo 2 (6.25%) muestras que sobreexpresaron los receptores Ki-67 y C-erbB2 coincidieron con las dos técnicas, las cuales fueron la muestra 1 (19 - 025 ONCO) y muestra 14(19 - 751 ONCO).

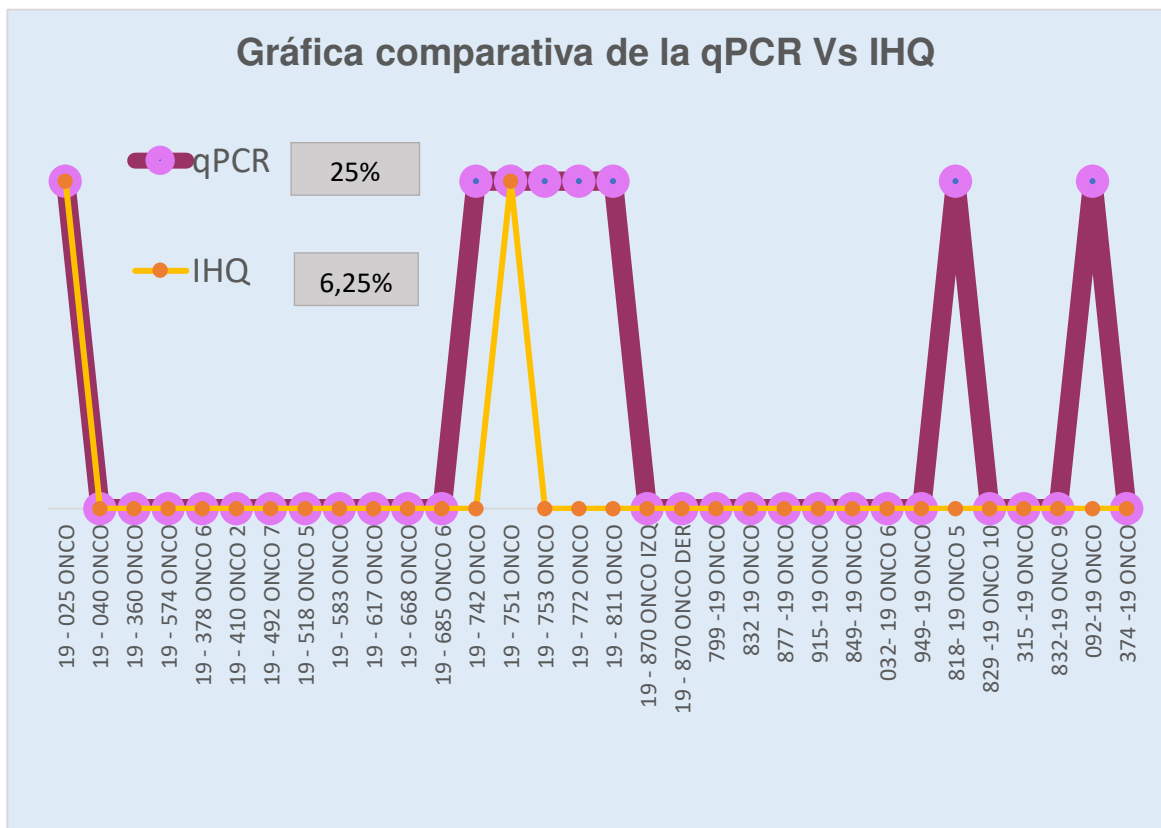


Fig. 20. Gráfica comparativa entre las técnicas qPCR e IHQ para HPV-16.
Solo coincidieron en 2 muestras, en la muestra 1 (19 - 025 ONCO) y muestra 14(19 - 751 ONCO).

Tabla 15. Consolidado de los resultados de la IHQ y qPCR para HPV-16.

Nº	Código de la muestra	qPCR (Ct)	IHQ para HPV-16
1	19 - 025 ONCO	37.42	IHQ/HPV-16+
2	19 - 040 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
3	19 - 360 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
4	19 - 574 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
5	19 - 378 ONCO 6	excluido	IHQ/HPV 16 -
6	19 - 410 ONCO 2	excluido	IHQ/HPV 16 -
7	19 - 492 ONCO 7	excluido	IHQ/HPV 16 -
8	19 - 518 ONCO 5	excluido	IHQ/HPV 16 -
9	19 - 583 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
10	19 - 617 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
11	19 - 668 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
12	19 - 685 ONCO 6	excluido	IHQ/HPV 16 -
13	19 - 742 ONCO	38.09	IHQ/HPV 16 -
14	19 - 751 ONCO	37.61	IHQ/HPV-16+
15	19 - 753 ONCO	41.37	IHQ/HPV 16 -
16	19 - 772 ONCO	40.04	IHQ/HPV 16 -
17	19 - 811 ONCO	39.32	IHQ/HPV 16 -
18	19 - 870 ONCO IZQ	excluido	IHQ/HPV 16 -
19	19 - 870 ONCO DER	excluido	IHQ/HPV 16 -
20	799 -19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
21	832 19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
22	877 -19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
23	915- 19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
24	849- 19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
25	032- 19 ONCO 6	excluido	IHQ/HPV 16 -
26	949- 19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
27	818- 19 ONCO 5	25.4	IHQ/HPV 16 -
28	829 -19 ONCO 10	excluido	IHQ/HPV 16 -
29	315 -19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -
30	832-19 ONCO 9	excluido	IHQ/HPV 16 -
31	092-19 ONCO	36.83	IHQ/HPV 16 -
32	374 -19 ONCO	excluido	IHQ/HPV 16 -

IX. DISCUSIÓN

Hasta el momento, uno de los mayores retos en la ciencia es tener un apoyo científico concluyente con la capacidad de aseverar sobre la existencia de un factor viral en la génesis del cáncer de mama (Ríos *et al.*, 2016). Se ha demostrado en innumerables experimentos la presencia del Virus Papiloma Humano en mujeres con CaMa (Pereira *et al.*, 2013; Lawson *et al.*, 2015; Ngamkhan *et al.*, 2017) y en mujeres con antecedentes con CaCu que están más proclives a desarrollar CaMa (Widschwendter *et al.*, 2004). Sin embargo, no hay algo que explique cómo llega este HPV a la glándula mamaria, cómo se transmite ni muchos menos se sabe el mecanismo de la oncogénesis del HPV en CaMa, estos vacíos hacen que sea todo un desafío comprender en su totalidad el rol de este virus como causante de esta enfermedad (Lawson *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2016).

La contribución que puede tener la detección del genoma viral del HPV-16 en pacientes con CaMa para un diagnóstico preliminar es de suma importancia por su impacto en la salud a nivel mundial y sobre todo hay una clara necesidad de implementar este tipo de diagnóstico a nivel nacional, puesto que esta enfermedad es la segunda neoplasia más recurrente que afecta a las mujeres peruanas (Poma, 2017). Mientras más estudios demuestren la presencia de este virus en mujeres con CaMa apertura un mayor interés en este posible factor viral implicado en la transformación de las células de la glándula mamaria (Solórzano *et al.*, 2016). Por consiguiente, contribuirá a un mejor entendimiento y tratamiento del cáncer.

Los estudios de detección del Virus Papiloma Humano por medio de la PCR en Tiempo Real son la base para hacer diagnósticos preliminares del cáncer de mama, en vista de que es el método más sensible para detectar los ácidos nucleicos; la cantidad de

ADN que puede detectar la reacción puede ser a partir de bajas concentraciones (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

En esta investigación descriptiva - retrospectiva, se demostró por medio de la PCR en Tiempo Real la presencia del HPV-16, para ello se utilizaron *primers* dirigidos a la región altamente conservada del gen viral E6, debido a que se mantiene genéticamente intacto y no se pierde durante la integración viral (del HPV en el ADN del huésped) como ocurre con el gen L1 (He *et al.*, 2009; Hernández, 2010), debido a esto posiblemente los estudios realizados por muchos autores desde 1992 no encontraron presencia del Virus Papiloma Humano en muestras con CaMa.

En la investigación realizada en USA por Bratthauer *et al.* (1992) estudiaron la relación de la etiología del carcinoma de mama y el Virus Papiloma Humano, para ello realizaron ensayos de reacción de la PCR dirigidas a la región L1 para los HPV tipos 6, 11,16 y 18 en muestras parafinadas, la cuales fueron 15 muestras con carcinomas papilares y 13, con carcinomas ductales infiltrantes de mama. Sus resultados reportan que no encontraron presencia del HPV en ninguna de las 28 muestras analizadas. Asimismo, en Argentina Noguera *et al.*(2004), desarrollaron una investigación sobre el Virus Papiloma Humano y su relación con el cáncer de mama por medio de la PCR dirigida a la región L1, para ello usaron 40 muestras de CaMa embebidas en parafina, de todos los casos estudiados ni uno presentó ADN viral del HPV.

En esta investigación, las concentraciones del ADN extraídos de las 32 muestras fueron variables, no influyeron en la evaluación de presencia del HPV-16, ya que en la mayoría de los ADN extraídos se reportó ADN de calidad óptima. Villalobos (2006) y Delgado (2015) mencionan que la alta calidad del ADN extraído, son estados conservados de los ácidos nucleicos que garantizan resultados satisfactorios de la técnica molecular PCR en Tiempo Real.

Heng *et al.* (2009) estipulan que los niveles de ADN del HPV en mama son mucho más bajos a los encontrados en el cérvix. Asimismo, reportaron que en el cérvix la carga viral del HPV es aproximadamente 4000 veces más a la encontrada en mama.

Las muestras embebidas en parafina son el material fundamental para el diagnóstico de patologías y por supuesto para la realización de estudios genéticos y moleculares de cáncer, y otras enfermedades (Bustamante *et al.*, 2011; De Guillermo *et al.*, 2013). Efectuar una buena extracción de ADN es vital para estudios retrospectivos, ya que lo hace menos costoso (Simonato *et al.*, 2007). Las muestras incluidas en parafina son de fácil almacenamiento y transporte (Bustamante *et al.*, 2011). Sin embargo, realizar extracciones de ADN a partir de ellas es muy dificultoso. Una mala extracción de los ácidos nucleicos puede conllevar a obtener material genético de baja calidad en comparación con los ácidos nucleicos extraídos de tejidos frescos, por lo que dificultaría el análisis molecular (Ren *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2011). La calidad del ADN está influenciada por diversos factores: el fijador que se emplea (concentración, pH, naturaleza, temperatura), el tiempo de fijación de la muestra, tamaño del tejido fijado, edad del bloque (edad de la muestra embebida en parafina), espesor de la parafina, el procedimiento de extracción (Jiménez *et al.*, 2007). En una PCR convencional, el tamaño de los fragmentos de ADN que se pueden extraer a partir de muestras parafinadas tratadas bajo condiciones óptimas es de 300 a 400 bp. Asimismo, se debe saber que, para toda PCR en Tiempo Real, se recomienda trabajar con amplicones de 80 a 250 bp, ya que amplicones mayores (>250 bp) generan inespecificidades (horquillas, homodímeros y heterodímeros) y para una alta precisión diagnóstica, se recomienda amplicones menores a 200 bp, lo óptimo para muestras parafinadas son amplicones que oscilen entre 100 y 150 bp (Jiménez *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2011; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La presencia del ADN del Virus Papiloma Humano tipo 16 fue validada por el software del termociclador micPCR v2.8.0. que dio valores de Ct para cada muestra (Tabla 13). Estos resultados son confiables ya que al emplearse sondas TaqMan (sondas irreversibles) que sigue el principio de “Transferencia de energía de resonancia fluorescente”, nos aseguramos de que los resultados fueron muy exactos y evitó

posibles secuencias inespecíficas presentes en el producto de la PCR en Tiempo Real, lo cual lo cataloga como el método de detección de primera línea (Vineza, 2009). Otras características que hacen a esta técnica molecular un método idóneo para diagnósticos preliminares son su alta especificidad y eficiencia (Tamay de Dios *et al.*, 2013) e inclusive posee un sistema cerrado que reduce la contaminación (Costa, 2004).

De las 32 muestras analizadas, 8 fueron positivas para HPV-16, representando un 25% del total de las muestras. Estos datos concordaron con los estudios realizados en Brasil por Damin *et al.* (2004), cuyo objetivo fue investigar la presencia del HPV en pacientes con carcinoma mamario embebidos en parafina por medio de la PCR y secuenciación del gen E6 en 101 muestras con carcinoma mamario, de los cuales 25 muestras fueron positivas para HPV, de estas 25 solo 14 ejemplares fueron positivos para el HPV tipo 16 y 10 para HPV-18. En Turquía Gumus *et al.*(2006), analizaron 50 muestras de pacientes con cáncer de mama por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando cebadores para HPV, con la intención de detectar HPV-11, HPV-16, HPV-18 y HPV-33; de las 50 muestras 37 expresaron ADN del HPV-16, representando el 74% del total de casos. En china He *et al.*(2009), detectaron HPV tipo 16 amplificando el gen E6 del mismo virus mediante el método PCR, de las 1833 muestras estudiadas solo se encontraron 24 ejemplares positivos para HPV-16. De la misma manera en Chile, Aguayo *et al.* (2011) analizaron 55 muestras de cáncer de mama para detectar la presencia del HPV por medio de la PCR, de las 55 muestras solo 46 poseían ADN amplificable y de estas solo detectaron HPV-16 en 4 ejemplares (8.7%) de un total de 46 casos. De la misma forma, en Perú Chumpitaz (2018) tuvo como objetivo demostrar la presencia del ADN del HPV-6, HPV-16 y HPV-18 en 100 muestras de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama del INEN por medio de la PCR en Tiempo Real. De los 100 casos, solo 9 fueron positivos para HPV, de los 9 casos positivos 7 fueron HPV-16+ (77.8%) , demostrando ser el más prevalente,

Muchos estudios que evalúan la presencia del HPV-16 en carcinomas mamarios han determinado que la presencia de este virus puede estar o no relacionado con el tipo del carcinoma mamario, el grado histológico y la edad. La data base obtenida en este trabajo nos indica que el tipo de carcinoma que presentó más ADN del HPV-16 fue el carcinoma ductal infiltrante, de los 8 casos positivos 7 presentaron este tipo y solo una muestra de carcinoma intraductal tuvo un resultado positivo para HPV-16, esto concordó con el estudio realizado por Solórzano *et al.*(2016), quienes probaron por medio de la técnica PCR-FLP que hubo una mayor presencia del Virus Papiloma Humano en los carcinomas ductal infiltrantes, de los cuales el 57.9% (n=33) de un total de 57 muestras tuvieron un resultado positivo para este virus. Asimismo, estos resultados son similares a los que reportaron Ngamkhan *et al.*(2017); por medio de la PCR demostraron que de un total de 274 pacientes el 5.1% (14) de los casos de cáncer de mama con ADN del HPV fueron carcinoma ductal invasivo, también llamado infiltrante.

En cuanto al grado tumoral; el grado que tuvo más presencia del HPV-16 fue el grado III (G3), de las 8 muestras positivas para HPV-16, 6 pertenecían a este grado y los otros 2 casos positivos correspondían al grado II (GII). Estos datos solo coinciden con Kroupis *et al.*, (2006) que realizaron un estudio sobre la presencia de secuencias del HPV de alto riesgo en 107 tejidos de cáncer de mama y su asociación con características histopatológicas por medio de la PCR, ellos corroboraron que el 70.6% de las muestras que fueron positivas para HPV eran carcinomas de mama de grado tumoral III (GIII). Diversos autores no establecen una relación del grado tumoral y la presencia del HPV (Damin *et al.*, 2004; Gumus *et al.*, 2006; He *et al.*, 2009) por lo que es necesario hacer más estudios del HPV en cáncer de mama.

Las edades de las pacientes con CaMa atendidas en el Hospital Santa Rosa fluctuaron entre 32 y 93 años, cuya mediana fue de 59 años. El grupo de pacientes menores a 59 años presentó 4 pacientes con HPV-16 al igual que el grupo de pacientes mayores de

59 años; por lo que, en esta investigación no se puede prescribir una relación de edad y HPV-16. Sin embargo, en otros estudios llevados a cabo por Kroupis *et al.*(2006) demostraron que de las 21 muestras que dieron positivo para HPV, 14 pertenecían al tipo 16 y dichas pacientes con CaMa que albergaron secuencias de ADN del HPV de alto riesgo eran más jóvenes que el resto de las pacientes. No obstante, Khan *et al.*(2008) no encontraron significancia cuyas edades de las pacientes fluctuaban de 23 a 90 años y la mediana fue 55 años; de los 15 casos que eran menores de 40 años 3 fueron positivos para HPV, los 37 casos que tenían edades entre 40 y 49 , 9 fueron positivos para HPV; las 27 pacientes con edades entre 50 y 59 años, 5 albergaron el genoma viral del HPV y de los 45 casos que tenían edades entre 60 y 93, 9 fueron positivos para HPV. De igual forma, Ngamkhan *et al.* (2017) determinaron la frecuencia de la infección provocada por HPV tanto en cáncer de mama como en lesiones benignas de mama/tejidos tumorales, donde la edad de las pacientes varió de 25 a 89 años, la edad media de las pacientes fue de 41.76 para lesiones benignas de mama/tumor y 52.73 años para muestras de CaMa; de las 200 pacientes menores de 40 años, 3 pacientes con tumores benignos fueron positivos para HPV y 2 pacientes con CaMa fueron positivo para el HPV; de las 198 pacientes que tenían una edad entre 40-49 años, 4 pacientes con tumores benignos fueron positivos para HPV y 4 con CaMa fueron positivos para HPV; de los 168 casos las edades variaban entre 50 y 59 años, 1 paciente con tumor benigno fue positivo para HPV y 6 pacientes con CaMa fueron positivos para HPV; por último, de las 134 pacientes cuyas edades fluctuaban entre 60 y 89, 2 años pacientes con tumor benigno fueron positivos para HPV y 3 con CaMa fueron positivos para HPV.

Dada la presencia del ADN del Virus Papiloma Humano tipo 16 y la concordancia con los estudios mencionados, es probable que el HPV sea un posible factor viral del cáncer de mama que padecen las mujeres peruanas. Los resultados obtenidos soportan la hipótesis de este proyecto que el Virus Papiloma Humano tipo 16 se encuentra presente

en las biopsias obtenidas de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario atendidas en el H S R. Con estos resultados se busca motivar la realización de más proyectos relacionados a este tema, ya que merece estudios adicionales por ser un tema de interés en el área de salud pública. Por ello, es necesario que el Ministerio de Salud y organismos relacionados consideren esta prueba molecular como un método de diagnóstico preliminar. Todo ello apertura la posibilidad que tengan alguna relación para el desarrollo de CaMa, además de los otros factores involucrados y contribuir en el mejor entendimiento y tratamiento del cáncer. Por ende, permitirá ofrecer una mejor calidad con respecto al servicio de la salud. Sin embargo, es necesario evaluar la prevalencia de estos virus asociados al grado histológico, el tipo de CaMa, la edad de los pacientes y otros factores relacionados a esta enfermedad en los diferentes departamentos del Perú para confirmar que es un factor de riesgo para este tipo de cáncer y que realmente el HPV está asociado directamente al desarrollo del CaMa.

La aplicación de la inmunohistoquímica en muestras de mama se efectuó con la intención determinar la sobreexpresión de los marcadores inmunohistoquímicos o receptores C-erbB2 y Ki-67. En diversos estudios han utilizado estos marcadores (Kroupis et al., 2006; De Azambuja *et al.*, 2007) y los han catalogado como específicos de células cancerosas con alta asociación con HPV de alto riesgo (De Azambuja *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2013).

Con respecto a los resultados de inmunohistoquímica (IHQ) para HPV-16, se observaron que, de las 32 muestras analizadas solo en 2 muestras hubo sobreexpresión de los marcadores inmunohistoquímicos C-erbB2 y Ki-67, el cual representó el 60.25% el total de casos. Se apreció que de los 8 HPV-16+ (25% del total de casos) para qPCR solo 2 (6.25% del total de casos) manifestaron sobreexpresión de los receptores Ki-67 y C-erbB2, solo estos 2 ejemplares coincidieron con las dos técnicas, las cuales fueron la muestra 1 (19 - 025 ONCO) y muestra 14(19 - 751 ONCO). Por tanto, al trabajar con pocas

muestras, no se puede determinar si la sobreexpresión de C-erbB2 y Ki-67 guardan o no relación con la presencia del HPV-16+.

El gen C-erbB2, también es conocido como proteína HER-2 (NIH, 2020), esta proteína es receptora de las células mamarias, normalmente ayudan a controlar el crecimiento, división y autoreparación de las células mamarias. Sin embargo, este gen en un 10% a 20% de los casos reportados con CaMa, no funcionan de manera adecuada y se amplifican; es decir realizan demasiadas copias de sí mismo (Breastcancer; 2019). Este aumento extra de HER-2, indican a las células mamarias que produzcan muchos receptores HER2, a esto se le denomina sobreexpresión de la proteína HER2. (De Placido *et al.*, 1998; He *et al.*, 2009; Breastcancer; 2019). La literatura indica que existe controversias sobre la relación entre HPV positivos y el C-erbB2. En el 2007, Yasmeeen y colaboradores anunciaron en un estudio realizado en ratones que HER-2 y las proteínas oncogénicas E6 y E7 del HPV-16 interactúan en la formación del tumor del CaMa. En el año 2005, Woods y colaboradores, estudiaron la interacción cooperativa entre HER-2 y las oncoproteínas del HPV-16 en la transformación de células epiteliales mamarias humanas, al término de su investigación observaron que la coexpresión de E6 con HER-2 dio como resultado células que expresaban niveles más altos de HER-2 por lo que concluyeron que probablemente hay una influencia de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 en la sobreexpresión del gen HER2. No obstante, Hennig *et al.* (1999) informaron que no se encontró una correlación significativa entre HPV-16 y la expresión de C-erbB2 en carcinomas mamarios. Lo mismo concluyó la investigación realizada por Kan *et al.* (2005) que identificaron secuencias de genes del ADN del HPV en cáncer de mama humano en 50 muestras, de las cuales 24 fueron positivas para HPV y no encontraron correlación con la sobreexpresión de C-erbB2. De la misma manera, en el 2009, He y colaboradores hicieron un estudio de las correlaciones de la infección del HPV-16 (región E6) y las sobreexpresiones de C-erbB2 en 40 muestras con cáncer de mama, detectaron el gen del HPV-16 en 24 de las 40 muestras de cáncer de mamá

(60%), la tasa de expresión positiva de C-erbB2 fue de 42.5% (17/40). Además, detectaron la sobreexpresión de C-erbB2 en una gran proporción en CaMa (42.5%) sin asociación entre la sobreexpresión de C-erbB2 y la presencia del HPV16 en los CaMa, por lo que concluyeron que se requiere un estudio adicional para investigar si C-erbB2 es o no otro objetivo del HPV.

La proteína Ki-67, es un antígeno que se encuentra en el núcleo de la célula humana y expresa proliferación celular tanto en el tejido normal como en el maligno alcanzando niveles máximos de expresión durante la mitosis (Poblete,2001;Delgado,2015; Mannell,2016).La técnica que se utiliza para determinar el índice de proliferación de esta proteína es la IHQ, la cual se fundamenta en las reacciones antígeno – anticuerpo específico para la proteína Ki-67 (Mannella,2016; Mayanga, 2019) .Debido a que la característica principal del cáncer es la proliferación celular no controlada, se está usando más el índice proliferativo de Ki-67 para evaluar y controlar el cáncer como un indicador pronóstico (Mannella, 2016). La presencia de Ki-67 (antígeno) se relaciona con frecuencia en los pacientes con CaMa (De Azambuja *et al.*, 2007). Con respecto a este marcador, hay investigaciones que creen que si hay una correlación entre HPV y Ki-67 y otras no. Delgado (2015) realizó un análisis entre la posible relación entre aquellos CaMa HPV positivos y el marcador inmunohistoquímico Ki-67 en 275 casos y concluyó que no existe discrepancias estadísticamente significativas entre la presencia del HPV y los niveles de Ki-67. En contraste, Kroupis *et al.* (2006) examinaron la presencia del HPV en tejidos de CaMa por PCR, 17 (15.9%) muestras de 107 dieron positivo para HPV, de los cuales 14 fueron positivos para HPV-16 y encontraron una significancia estadística entre el HPV-16 de CaMa y Ki-67.

En suma, este experimento no detectó ninguna evidencia de una correlación entre la infección del HPV-16 y las sobreexpresiones de los receptores C-erbB2 y Ki-67, por lo que se sugiere hacer más estudios que proporcionen más información sobre la relación entre HPV-16 y la expresión exagerada de estos marcadores inmunohistoquímicos.

Lawson *et al.* (2015) mencionan que la presencia del Virus Papiloma Humano influenciado por hormonas en los cánceres de mama es de especial interés, debido que el receptor HER-2 coopera con las oncoproteínas HPV E6 y E7 en la oncogénesis mamaria (Yasmeen *et al.*,2007)

X. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones variadas de los ADN obtenidos no influyeron en la identificación de la presencia del HPV-16, ya que fueron de calidades (purezas) adecuadas que garantizan una correcta extracción del material genético viral.
2. El Virus Papiloma Humano tipo 16 fue detectado en 8 de las 32 pacientes con cáncer de mama atendidas en el Hospital Santa Rosa mediante la PCR en Tiempo Real, representando el 25% del total de los casos.
3. No se demostró correlación alguna entre la infección del HPV-16 y las sobreexpresiones de C-erbB2 y Ki-67, ya que solo 2 (6.25%) muestras manifestaron la sobreexpresión de estos marcadores.
4. La presencia del HPV-16 se correlacionó en su gran mayoría con las características clínico –patológicas: carcinoma ductal infiltrante en un 87% y al grado III en un 75%. Con respecto a la característica social, el 50% (4) fueron mujeres menores a 59 años y el otro 50% mayores o igual a 59 años, por lo que no se puede establecer una relación de edad y HPV.

XI. RECOMENDACIONES

1. Que se incremente el número de muestras a analizar para poder determinar la prevalencia del HPV -16 en CaMa y su correlación con los marcadores inmunohistoquímicos C-erbB2 y Ki-67.
2. Se sugiere realizar más estudios de la presencia de otros HPV distinto a HPV-16 en diversos carcinomas mamarios con la finalidad de establecer si existe alguna relación directa.
3. Es importante la evaluación de la carga viral del HPV-16 y otros tipos del HPV con el grado histológico y tipo de carcinoma mamario para poder determinar si hay alguna relación entre ellos.
4. Se recomienda la implementación de la detección de la presencia del HPV como diagnóstico preliminar de CaMa a nivel nacional.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abugattas, J.; Manrique, J. y Vidaurre, T. (2015). Mamografía como instrumento de tamizaje en cáncer de mama. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 61(3), 311-319.
2. Aguilar, M., Neri, M., Padilla, C., Pimentel, M., García, A., Sánchez, A. (2012). Factores de riesgo como pronóstico de padecer cáncer de mama en un estado de México. *Nutr Hosp.* ,27(5):1631-1636.
3. Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B. y Chanez, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Capítulo: PCR en tiempo real.* (1ª Ed.) Editorial Instituto Nacional de Ecología: 175-201.
4. Ajalcriña, A. (2016). *Factores de riesgo en mujeres con y sin diagnóstico de Virus de Papiloma Humano atendidas en Onco Prev Internacional Distrito de San Isidro-Lima 2015.* (Tesis de pregrado). Universidad San Martín de Porres, Lima, Perú.
5. Alfaro, A. y Fournier, M. (2013). Virus del Papiloma Humano. *Rev Med Cos Cen.*; 70(606); 211-217.
6. Álvarez, L. (2017). *Caracterización de la infección cervical por el Virus Papiloma Humano. Aplicación de nuevas técnicas de microbiología molecular en el estudio de la infección por el genotipo 16.* (Tesis Doctoral). Universidad Miguel Hernández, España.
7. American Cancer Society. (2020). Riesgo y prevención del cáncer de seno. Recuperado de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/riesgos-y-prevencion.html>
8. American Cancer Society. (2019, 18 de septiembre). ¿Qué es el cáncer de seno? Recuperado de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>

9. American Cancer Society. (2019,20 de septiembre). Grados del Cáncer de seno. Recuperado de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/grados-del-cancer-de-seno.html>
10. Arya, M., Shergill, I., Williamsom, M., Gommersall, L., Arya, N. y Patel, H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2):209.
11. Bazán, M. (2017). *Factores de riesgo en mujeres tamizadas para cáncer de mama preventorio oncológico del Hospital Regional Docente Cajamarca 2015*. (Tesis de segunda especialidad). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.
12. Banco Nacional de ADN Carlos III. (SN). Programa control de calidad de muestras. Universidad de Salamanca, España. Recuperado de <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
13. Bayrak, M., Olmez, OF., Kurt, E., Cubukcu, E., Evrensel, T., Kanat, O., et al. (2013) Prognostic significance of c-erbB2 overexpression in patients with metastatic gastric cancer. *Clin Transl Oncol*; 15 (4): 307-12.
14. Beltrán, J. (2014). Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma humano. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 45(2):108.
15. Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. and Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*; 23:781-783.
16. Bernard, H., Calleja, I. y Dunn, S. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*; 118 (5): 1071-1076.
17. Bratthauer, G., Tavassoli y O'Leary, T. (1992). Etiology of Breast Carcinoma: No Apparent Role for Papillomavirus Types 6/11/16/18. *Pathology-Research and Practice*; 188(3): 384-386. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)81229-X](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)81229-X)
18. Breastcancer.org. (2018, 20 de noviembre). Definición ¿Qué es el cáncer de mama? Recuperado de

[https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer de mama/que es cancer mama](https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama)
[a](#)

19. Breastcancer.org. (2020). Guía para entender el informe patológico de cáncer de mama. Recuperado de https://www.breastcancer.org/Images/Pathology_Report_Bro_FINAL_2_tcm8-334609.pdf
20. Breastcancer.org. (2019,1 de noviembre). Estado del HER2. Recuperado de <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/her2>
21. Bullón, S., Cueva, S. Y Vásquez, Z. (2018). Efectividad del programa educativo “Diciéndole no al cáncer de mama” en el nivel de conocimientos sobre factores de riesgo y prácticas de prevención autoexamen y mamografía en las madres de los alumnos del 4to y 5to de secundaria del C. E. P. Villa María. (Tesis de Especialización). Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.
22. Bullwinkel, J.; Baron-Lühr, B.; Lüdemann, A.; Wohlenberg, C.; Gerdes, J. & Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.*, 206(3):624-35.
23. Bustamante, J., Astudillo, M., Jairo, A. y Bravo, L. (2011). Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biol. Colomb*, 16(2):83-98.
24. Calleja, I.E., Villa, L.L., Prado, J.C., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, A.L., Chung, L.P., Collins, R.J., Zuna, R.E., Dunn, S.T., Chu, T.Y., Cubie, H.A., Cuschieri, K., Von Knebel, M., Martins, C.R., Sánchez, G.I., Bosch, F.X., Muñoz, N. y Bernard, H.U. (2005). Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31, 35, 52, and 58, Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type. *J Virol*.16; 79(21):13630–40.
25. Cancer, I. N. (2015,9 de febrero). Definición de ¿Qué es el cáncer? Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

26. Cantú de León, D., Pérez, D., Nemcova, J., Mikiskova, I., Turcios, E., Cetina, L., Coronel, A. y Hes, O. (2009). Human papillomavirus (HPV): prevalence in a group of Mexican patients. *Cáncer BMC*, 9(1):26.
27. Castillo, M. y Ávila, J. (2010). Cáncer de mama: Etapa clínica en la que se realiza el diagnóstico y tipos histológicos más frecuentes en mujeres que acuden a un hospital de segundo nivel. *Arch Inv Mat Inf.*, 2(2):85-90.
28. Castro, A., Muela, D., Soto, U. y Bologna, R. (2019). Expresión Inmunohistoquímica de Ki-67 en Lesión Central de células gigantes. *Int.J. Odontostomat.*; 13(2):150-158.
29. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2018,11 de septiembre). Cáncer de mama. Recuperado de https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
30. Cheang, MC., Chia, SK., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P., Parker, J., Perou, C., Ellis, M. y Nielsen, T. (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.*; 101 (10):736-750.
31. Cho, H., Mason, K., Ramyar, K., Stanley, A., Gbell, S., Denney, D y Leahy, D. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.*; 421, 756–760. <https://doi.org/10.1038/nature01392>.
32. Chumpitaz, M. (2018). *Prevalencia de tipos de Virus del Papiloma Humano en pacientes con cáncer de mama en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas en el año 2017*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
33. Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 22: 299- 305.

34. Cotran, R., Kumar, V. and Collins, T. (1999). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. (6^a Ed.). Philadelphia: W.B. Saunders, 1107.
35. Damin, AP., Karan, R., Zettler, CG., Caleffi, M. and Alexandre, C. (2004). Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*; 84(2):131-7.
36. De Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, MS., Durbec, V., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, MJ., y Paesmans, M. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*; 96(10):1504-13. Doi: 10.1038/sj.bjc.6603756.
37. De Dios, M. y Acosta, G. (2018). Guía de inmunohistoquímica para técnicos. (1^a Ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer.
38. De Guglielmo, Z., Ávila, M., Fernández, A., Veitía, D, & Correnti, M. (2013). Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(1), 83-86.
39. De la Fuente, D., Guzmán, S., Barboza, O. y González, A. (2010). Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico *Medicina Universitaria*; 12 (49): 231-8.
40. Di Lonardo, A., Venuti, A. and Marcante, ML. (1992). Human papilloma virus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 21(2):95-100.
41. De Placido, S., Carlomagno, C., De Laurentiis, M. y Raffaele, A. (1998). C-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 52, 55–64 <https://doi.org/10.1023/A:1006159001039>.
42. De Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H., Hausen, H. (2004). Classification of papillomavirus. *Virology*; 324, 17–27.

43. Del Rocío Góngora, Y., Moreno, M.A., Ocampo, J., Romero, P. y Rodríguez, C. (2016). Marcadores y subtipos inmunohistoquímicos relacionados con factores clínicos patológicos en pacientes mexicanas con cáncer de mama. *Rev Sanid Milit Mex.*; 70:533-540.
44. Delgado, S. (2015). Implicaciones del virus del papiloma humano en el cáncer de mama en mujeres. (Tesis doctoral). Universidad Miguel Hernández, España.
45. Delgado-García, S., Martínez-Escoriza, J.C., Alba, A., Martín-Bayón, T., Ballester, H., Peiró, G., Caballero, P. y Ponce-Lorenzo, L. (2017). Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. *BMC Cancer*; 17(1):320.
46. Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*; 110(5):525-41.
47. Dorak, M.T. (2006). Real-Time PCR. (1ª Ed.) Newcastle University, London, UK: Taylor & Francis Group. Doi <https://doi.org/10.4324/978020396>.
48. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. and Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*; 7(7); 3863-3890.
49. Elgue, M. y Vásquez, C. (2015). *Diseño y puesta a punto de un sistema de diagnóstico de PCR en Tiempo Real para las mutaciones en los genes que codifican para Factor II, Factor V y Metilentetrahidrofolato reductasa*. (Tesis de Licenciatura). Universidad ORT Uruguay, Uruguay.
50. Elsevier. (2019, 14 de febrero). Tipos de papilomavirus humanos y sus asociaciones con otras enfermedades. Recuperado de <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/tipos-de-papilomavirus-humanos-y-sus-asociaciones-con-otras-enfermedades>
51. European Society for Medical Oncology. (2018). ¿Qué es el cáncer de mama? Serie de guías ESMO para pacientes basada en la guía de práctica clínica de la ESMO, Suiza. Recuperado de

[file:///C:/Users/PEDROBERNARDO.Pedro_Oncoy/Downloads/ES-Cancer-de-Mama-Guia-para-Pacientes%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/PEDROBERNARDO.Pedro_Oncoy/Downloads/ES-Cancer-de-Mama-Guia-para-Pacientes%20(2).pdf)

52. Fernández, A. Pesci -Feltri, A., García, I., Guida, V., Salazar, J., Rodríguez, C., Kasr, E., Blanch, R. and Correnti, M. (2015). Evaluación de la Infección por Virus de Papiloma Humano en pacientes con Cáncer de Mama. *Rev Venez Oncol.*; 27(1):22-29.
53. Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., Garcia, R. L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*; 77 (8): 4818-4826.
54. Fiorica, J. (2001). Prevention and treatment of breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*; 28(4):711-26.
55. Fuente, E., & Mira, LM. (2008). Las 47 preguntas sobre el virus del papiloma humano, VPH. *Med. Segur. Trab.*; 54(212), 111-119.
56. Frega; A., Lorenzon, L., Bononi, M., De Cesare, A., Ciardi, A., Lombardi, D., Assorgi, C., Gentil, M., Moscarini, M., Torrisi, MR. y Francés, D. (2012). Evaluation of E6 and E7 mRNA expression in HPV DNA POSITIVE breast cancer. *Eur J Gynecol Oncol*; 33 (2): 164-167.
57. González, J., Ugalde, C. (2012). La glándula mamaria, embriología, histología, anatomía y una de sus principales patologías, el cáncer de mama. *Rev Med Cos Cen.*; 69(602):317-320.
58. Grillo, C., Martínez, M. y Morales, B. (2008). VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: ASPECTOS MOLECULARES Y CÁNCER DE CÉRVIX. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*; 59(4):310-315.
59. Gumus,M.,Yumuk,PF.,Salepci,T.,Aliustaoglu,M.,Dane,F.,Ekenel,M.,Basaran,G.,Kaya,H.,Barisik,N,Turhal,NS.(2006). Frequency analysis and subsets of HPV DNA in normal and tumor tissue samples from patients with human breast cancer. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research*; 25 (4):515-521.

60. He, Q., Zhang, SQ., Chu, YL., Jia, XL. y Wang, XL. (2009). The correlations between HPV16 infection and expressions of c-erbB-2 and bcl-2 in breast carcinoma. *Mol Biol Rep.*; 36(4):807-812. Doi: 10.1007/s11033-008-9249-9.
61. Hennig, EM., Kvinnsland, S. y Holm, R. (1999) Significant difference in p53 and p21 protein immunoreactivity in HPV 16 positive and HPV negative breast carcinomas. *Acta Oncol*; 38:931–938.
62. Hennig, EM., Suo, Z., Thoresen, S., Holm, R., Kvinnsland, S. y Nesland, JM. (1999). Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat*; 53: 121–135.
63. Hernández, D. (2010). *Diseño y Estandarización de un Sistema PCR-SSCP del gen E6 para detección y Tipificación de Virus Papiloma Humano (VPH)*. (Tesis para optar Licenciatura), Universidad de los Andes, Venezuela.
64. Hernández, D., Cruz, J., Quintero, M., Bastidas, M. & Puig, J. (2012). Diseño de un sistema de PCR para la detección del virus del papiloma humano mediante el uso de oligonucleótidos degenerados de la región E6. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 72(4), 249-254.
65. Herrera, NE. y Hernández, A. (2017). Los factores de riesgo reproductivos reportados internacionalmente en el desarrollo de cáncer de mama no se observan en las pacientes mexicanas. *Rev Esp Méd Quir*; 22(1):28-36.
66. Huicochea, S., González, P., Tovar, I., Olarte, M. y Vásquez, J. (2009). Cáncer de mama. *Anales de Radiología México*, 1:117-126.
67. IARC. (13 de 12 de 2015). Globocan 2012. Obtenido de International Agency for Research on Cancer:
http://globocan.iarc.fr/old/summary_table_pop_prev.asp?seleccionon=154604&title=Peru&sex=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute
68. Jiménez, G., Villalobos, M., Jiménez, E., Palma, W. (2007). Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*; 1(1).

69. Jorge, D., Lara, C., Ortiz, C. (2007). Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología*; 45(3):126-140.
70. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H.(2012). Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol*;3:152.
71. Kan, C., Iacopetta, B. y Lawson, J. (2005). Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer*; 93(8), 946–948. Doi:10.1038/sj.bjc.6602778.
72. Khan, NA., Castillo, A., Koriyama, C., Kijima, Y., Umekita, Y., Ohi, Y., Higashi, M., Sagara, Y., Yoshinaka, H., Tsuji, T., Natsugoe, S., Douchi, T., Eizuru, Y. and Akiba, S. (2008). Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *British Journal of Cancer*; 99:408-414.
73. Kroupis, C., Markou, A., Vourlidis ,N., Dionyssiou-Asteriou, A. y Lianidou, ES.(2006) Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem*; 39(7):727-731. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.03.005>
74. Kroupis, C. y Vourlidis, N. (2011). Human papilloma virus (HPV) molecular diagnostics. *Clin Chem Lab Med.*; 49(11):1783–99.
75. Lacave, M. y García, T. (2014). Atlas de Inmunohistoquímica: Caracterización de células, tejidos y órganos normales. Editorial Diaz de Santos: 3-6.
76. Lawson, JS., Glenn, WK., Salyakina, D., Delprado, W., Clay, R., Antonsson, A., Heng, B., Miyauchi, S., Tran, DD., Ngan, CC., Lutze-Mann, L. and Whitaker, NJ. (2015). Human Papilloma Viruses and Breast Cancer. *Front. Oncol*; 5: 277.

77. Liu, Y., Klimberg, VS., Andrews, NR., Hicks, CR., Peng, H., Chiriva-Internati, M., Henry-Tillman, R. and Hermonat., PL. (2001). Human Papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *Journal of Human Virology*; 4(6):329-334.
78. López, J. y Ancízar, F. (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm*; 35(1) ,5-32.
79. Loredó, G. (2007). Análisis de los factores de riesgo y de los marcadores pronósticos HER-2 y P53 en pacientes pre menopáusicas con cáncer de mama del Occidente de México. *Gamo*; 6:98-103.
80. Mannell, A. (2016). The role of Ki-67 in breast cancer. *South Afr J Surg Suid-Afr Tydskr Vir Chir.*;54(2):10-3
81. Maschio, LB., Madalozzo, BB., Capellasso, BA., Victorasso, B., Gobbe, M., Jampietro, J., Augusto, F., y Pires, D., (2014). Immunohistochemical investigation of the angiogenic proteins VEGF, HIF-1 α and CD34 in invasive ductal carcinoma of the breast. *Acta Histochem*; 116(1):148-157. Doi:10.1016/j.acthis.2013.06.005.
82. Mateos, M., Pérez, S., Rodríguez, M., & Pérez, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del papiloma humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 1-10.
83. Mayanga S. Características clínico patológicas del cáncer de mama asociadas a la expresión del marcador celular Ki-67 en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, 2013- 2017. *An Fac med*; 2019; 80(4):427-31. Doi: <https://doi.org/10.15381/anales.v80i4.16746>
84. MINSA. (2014). Cartera de Servicios Oncológicos en el Perú 2014, basado en el Registro nacional de establecimientos de Salud. Informe Técnico elaborado por el Equipo de Plan Esperanza, Lima.
85. MINSA. (2017-2021). Plan Nacional para la Prevención y Control de Cáncer de Mama en el Perú.
86. Mitchell, R., Kumar, V., Abbas, A. y Aster J. (2017). *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. (9ª Ed.). España: Elsevier España, 1057-1060.

87. Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol*, 155:335-50.
88. Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L., Křivda, V., Jiřincová, H., Sedlák, K., Horníčková, J. & Havlíčková, M. (2017). Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Sci Rep* 7, 41392.
89. Navarro, E., Serrano, G., Castaño, MJ, Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Elsevier*. 439: 231–250.
90. National Institutes of Health. (2013, 3 de mayo). Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Grado de un tumor. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/pronostico/hoja-informativa-grado-tumor>
91. National Institutes of Health (2020). Definition of C-erbB2. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/c-erbb-2>
92. Ngamkhan, J., Karalakm, A., Chaiwerawattana, A., Sornprom, A., Thanasutthichai, S., Sukarayodhin, S., Mus-u-Dee, M., Boonmark, K., Phansri, T. y Laochan N. (2017). Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Breast Cancer Cells from Thai Women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 18(7):1839–45.
93. Noguera, A., Piuzzi, V., ML-Soto de Ferrini, S., Acosta, P. y Cerder, A. (2004). Virus Papiloma Humano y su relación con Cáncer de mama. Informe preliminar Disponible en <http://www.une.edu.ar/unvieja/Web/cyt/com2004/3-Medicicna/M-082.pdf>.
94. Organización Mundial de la Salud. (2004) Cáncer de mama-prevención y control: World Health Organization. Recuperado de <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>

95. Organización Mundial de la Salud. (2018, 12 de septiembre).Cáncer: World Health Organization. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>
96. Organismo Panamericano de la Salud. (2018). Cáncer de mama en las Américas. Recuperado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=estadisticas-mapas-4868&alias=46503-epidemiologia-cancer-de-mama-en-las-americas-2018&Itemid=270&lang=es.
97. Ortiz, C. (2018). Breve nota sobre la historia de la inmunohistoquímica. *Patología Rev Latinoam*; 56(2):46-59.
98. Panal, M., Herrera, M., Hardisson, D., Choqueneira, M., Román, A. y Javier de Santiago, F. (2014).Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Rev Senol Patol Mamar*; 27 (4):163-169.
99. Peñate, F. & de la Torre, A. (2018). El autoexamen y la detección precoz del cáncer de mama. *Medicentro Electrónica*, 22(1), 99-10.
100. Pereira Suárez, AL, Lorenzetti, MA, González Lucano, R., Cohen, M., Gass, H., Martínez Vázquez, P., González, P., Preciado, M. y Chabay, P. (2013). Presence of Human Papilloma Virus in a Series of Breast Carcinoma from Argentina. *PloS one*; 8 (4), e61613. Doi: 10.1371 / journal.pone.0061613.
101. Pérez, J., Muñoz, E. y Cortés, J. (2013). *El médico en casa. Comprender en Cáncer de mama*. Barcelona, España: Editorial Amat.
102. Poblete, MT. (2001). Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad Cir*. 2018; 15(1):74-9. Doi: 10.4206/ cuad.cir.v15n1-14
103. Poma, P. (2017). Women affected by breast cancer-follow up recommendations. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 63(1), 35-51.

104. Prada, J. y Ríos, D. (2014). Cáncer de mama en hombres. ¿Es una entidad diferente al cáncer de mama en la mujer? Revisión de la literatura. *Rev Colomb Cancerol*; 18(2):78-82.
105. Prolla, C.M., Santos, P., Oliveira, C., Goldim, J. & Ashton-Prolla, P. (2015). Conocimiento del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 23(1), 90-97.
106. Quirós, J., Arce, I., Torrealba, G., Jiménez, E. y Barrientos, R. (2015). Detección del receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (her2/neu): inmunohistoquímica en carcinomas de mama. *Acta méd costrarric.*;57(1):23-28
107. Ramírez, A., González, M., Castañeda, K., Agudelo, M., López, C., & Sánchez, G. (2019). Filogenia y oncogénesis del virus del papiloma humano: una aproximación translacional al descubrimiento de biomarcadores para la detección de lesiones precancerosas de cérvix. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat*; 43(168), 351-365.
108. Ren, ZP., Sallstrom, J., Sundstrom, C., Nister, M. y Olsson, Y. (2000). Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin embedded materials. *Pathobiology.* ;68(4-5):215-217
109. Ríos, M., Hernández, M. y Forntera, M. (2016). Infecciones virales, posible factor de riesgo en cáncer de mama. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 42(3):412-424.
110. Rivera, E., Fornaris, A., Mariño, E., Alfonso, K, Ledesma, R. & Abreu, I. (2019). Factores de riesgo del cáncer de mama en un consultorio de la Atención Primaria de Salud. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(2), 308-322.
111. Rivera, R., Aguilera, J. & Larraín, A. (2002). EPIDEMIOLOGIA DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV). *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*; 67(6), 501-506.

112. Rivera, R., Delgado, J., Painel, V. Barrero, R. y Larraín, A. (2006). Mecanismo de infección y transformación Neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol*; 71(2):135-140.
113. Rodríguez, M. y Rodriguez, W. (2006). Métodos físico-químicos en Biotecnología. PCR en Tiempo Real. Instituto de Biotecnología, UNAM. Recuperado de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
114. Saiki, RK., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, KB., Horn, GT., Erlich, HA., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science, Dec. 20*; 230(4732):1350-4.
115. Santos, G. , Márquez, L., Reyes, J. y Vallejo, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 53(S2); 166-171.
116. Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B.J., Stanley, M.A. y Franceschi, S., (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 2. ISSN 2056676X. Doi 10.1038/nrdp.2016.86.
117. Schmitz, M., Scheungraber, C., Hrrmann, J., Teller, K., Gajda, M., Runnebaum, I.B. y drst, M. (2009). Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *Journal of Clinical Virology*; 44(4):302-307.
118. Seshie, B., Adu-Aryee, NA., Dedey, F., Calys-Tagoe, B., Clegg Lamptey, JN. (2015). A retrospective analysis of breast cancer subtype based on ER/PR and HER2 status in Ghanaian patients at the Korle Bu Teaching Hospital, Ghana. *BMC Clin Pathol.*; 15:1-8.
119. Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J. y Sánchez, R. (2013). Diagnóstico de la infección por virus del papiloma humano en el hombre. *Rev Chil Infectol*; 30(2):186-192.

120. Sifuentes, A., Castañeda, L., Lugo, M. y Reyes, M. (2015). Factores de riesgo asociados con el cáncer de mama en mujeres del estado de Durango, México. *Rev Ginecol Obstet Mex.*, 83:662-669.
121. Simonato, L., García, J., Nunes, C., Miyahara, G. (2007). Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. *J Bras Patol Med Lab*; 43(2):121-127.
122. Sociedad Española de Oncología Médica .(2011,febrero).Hablemos de cáncer de mama. Recuperado de http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/infopublico/publicaciones/HABLEMOS_CANCER_MAMA.pdf
123. Sociedad Española de Oncología Médica. (2020,7 febrero). Cáncer de mama. Recuperado de <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>
124. Sociedad Española de Oncología Médica (2020,07 de febrero). Cáncer de mama/HER-2. Recuperado de <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>
125. Soca, P Argüelles, I. & Peña, M. (2016). Factores genéticos en la carcinogénesis mamaria. *Revista Finlay*, 6(4), 299-316.
126. Solorzano, M., Bastidas, M., Quintero, M., Rojas, L., Stea, D., Villasmil, S., Acosta, V., Martín, C., Ramírez, A., Blanco, N., Cruz, J. y Puig, J. (2016). Detección y tipificación e virus del papiloma humano en biopsias de carcinoma ductal infiltrante y lesiones malignas en mujeres venezolanas. *Rev Obstet Ginecol Venez*; 76(4):260-265.
127. Tai, W., Mahato, R., Cheng, K. (2010). The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release*; 146 (3): 264-75.
128. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad. Medigraphic*; 2(2) ,70-78.

129. Tan, M., y Yu, D. (2013). Mecanismos moleculares de la quimiorresistencia del cáncer de mama mediada por ErbB2. En: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6194/>
130. Torrades, S. (2003). El origen genético del cáncer de mama. *OFFARM*, España, 22(6):108-112.
131. Uribe, A. (2009). Cáncer de mama. *Rev. Obstet. Ginecol.*,4(3):223-232
132. Vega, J., Mayagoitia, J., Ramírez, E., Pulido, A. y Noyola, H. (2017), *Tratado de cirugía general*. (3ª Ed.) Ciudad de México, México: Editorial El Manual Moderno.
133. Villalobos, MJ. (2006). *Implementación de un protocolo de extracción de ADN a partir de biopsias humanas y determinación de su calidad para PCR*. (Tesis de pregrado), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
134. Widschwendter, A.; Brunhuber, T.; Wiedemair, A.; Mueller-Holzner, E. y Marth, C. (2004). Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J Clin. Virol*; 31(4), 292-297.
135. Wisbaum, W. (2018). *Cáncer de mama Guía práctica. Un manual para resolver las dudas paso a paso*. (1ª Ed.) Madrid, España: La Esfera de los Libros.
136. Woods, KM., Dziubinski, ML., Ammerman, C. y Ethier, SP. (2005). Cooperative interactions of HER-2 and HPV-16 oncoproteins in the malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Neoplasia*; 7(8):788-798. Doi:10.1593/neo.05106
137. Yasmeeen, A., Bismar, TA., Kandouz, M., Foulkes, WD., Desprez, PY. y Al Moustafa, AE.(2007) E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Cell Cycle*; 6(16):2038-2042. Doi:10.4161/cc.6.16.4555.
138. Zafra, G., Flórez, Ó. y González, C. (2004). Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. *Salud UIS*; 36:73-79.

139. Zertuche, J., Salazar, M., Peña, A. y Ver, D. (2013). Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. Revisión sistemática. *Rev Sanid Milit Mex*; 67(5):205-213.

VI. ANEXO

Anexo 1. Documento de aceptación del estudio por parte del Comité de Ética del Hospital Santa Rosa.



Anexo 2. Imágenes de la extracción del ADN del HPV-16.

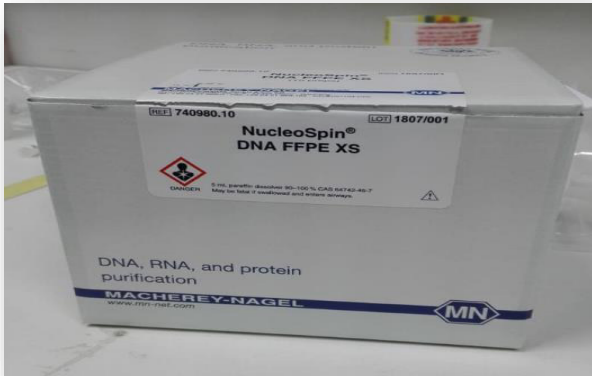


Fig.21. Kit NucleoSpin DNA FFPE XS para extracción de DNA presentes en las 32 muestras parafinadas.



Fig.22. Componentes del Kit NucleoSpin DNA FFPE XS

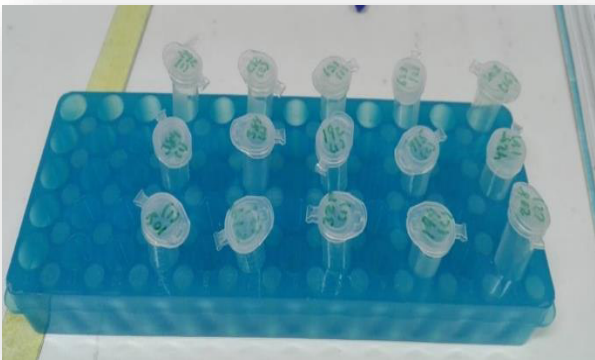


Fig.23. Muestras parafinadas de carcinoma mamario depositadas en tubos Eppendorf.



Fig.24. Desparafinación de las muestras en el Termobloque BIOBASE.

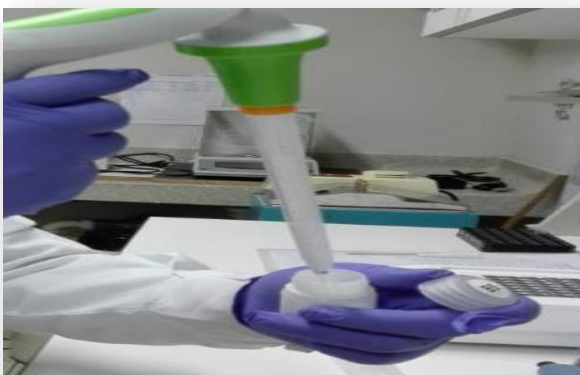


Fig.25. Reactivo B5 del kit NucleoSpin DNA FFPE XS NucleoSpin DNA FFPE XS.



Fig.26. Cuatro muestras de cáncer de cuello uterino positivos para HPV-16 (Control positivo).



Fig.27. Parte inferior se observa una fase acuosa y en la parte superior una fase orgánica de la muestra 11.



Fig.28. Vórtex vigoroso a la muestra 11.



Fig.29. Centrifugando las muestras a 2.000 x g por 30 s.



Fig. 30. Agregándole proteinasa K a la muestra 15.

Anexo 3. Imágenes de la ejecución de la PCR en Tiempo Real.



Fig. 31. Espectrofotómetro de microvolúmenes marca DeNovix DS-11 FX.

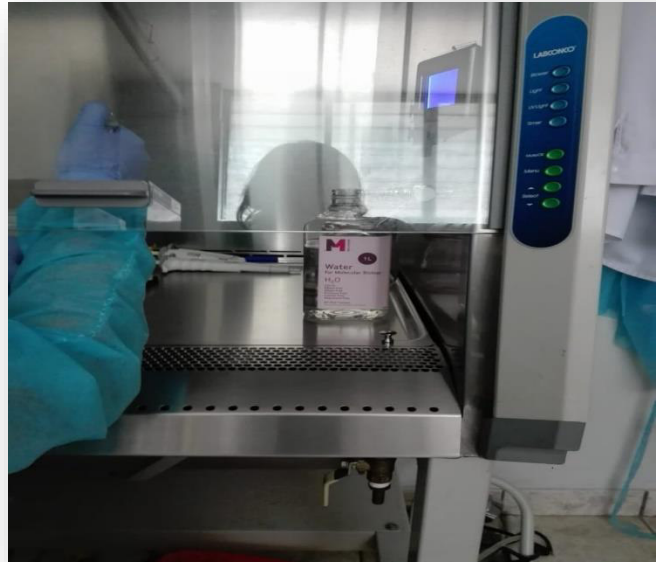


Fig. 32. Preparación de la mezcla para la PCR en Tiempo Real.



Fig. 33. Termociclador micPCR v2.8.0.



Fig. 34. 15 muestras con su respectivo control negativo y positivo en el termociclador micPCR v2.8.0.