

**IMPLICACIONES DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO EN
EL CÁNCER DE MAMA EN
MUJERES**

Silvia Inés Delgado García

TESIS DOCTORAL

Alicante, 2015



TESIS DOCTORAL

Universidad Miguel Hernández

Facultad de Medicina

Departamento de Patología y Cirugía

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

IMPLICACIONES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:
Silvia Inés Delgado García

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Martínez Escoriza

Alicante, 2015.



D^ª Susana Jiménez Moreno, Directora del Departamento de Patología y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández

CERTIFICA:

Que D^ª SILVIA INÉS DELGADO GARCÍA ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de tesis doctoral titulada “**Implicaciones del virus del papiloma humano en cáncer de mama en mujeres**”, cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo en forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al grado de doctora.

Lo que certifico en San Juan de Alicante, a 30 de noviembre de 2015.

Fdo: Susana Jiménez Moreno

Directora del Departamento





El Dr. Juan Carlos Martínez Escoriza,

Certifica:

que la tesis doctoral titulada **“IMPLICACIONES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES”**, presentada por **Dña. Silvia Inés Delgado García**, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple todos los requisitos que dicta la normativa vigente para la presentación de tesis doctorales.

Dr. Juan Carlos Martínez Escoriza

Alicante, noviembre de 2.015



A las dos estrellas que me cuidan desde allí arriba.



Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis y Jefe, *Juan Carlos*; gracias por confiar en mi, proponerme esta idea hace ahora ya 3 años, y poder llevarla a cabo. Espero haber podido satisfacer las expectativas depositadas. Gracias por enseñarme a ser ginecóloga.

A *Pablo Caballero* ("el estadístico"), sin él no podría haber acabado el trabajo y puesto la guinda al pastel. Porque enseguida me abrió la puerta de su despacho, me echó una mano y lo vio todo claro.

A *Alfonso Alba*, por su compromiso y aportación en este trabajo. Por compartir conmigo sus puntos de vista y su paciencia para que entendiera conceptos básicos de biología molecular.

A *Gloria Peiró*, porque desde el principio me mostró su apoyo y colaboración. Por estar siempre dispuesta y ofrecerme algo de su tiempo para aclararme dudas y conceptos histopatológicos.

A *Jose Ponce*, por sacar tiempo para poder leerse la tesis minuciosamente en tiempo record y darme su visión, necesaria y enriquecedora, como oncólogo.

Al Servicio de Anatomía Patológica y Biobanco de tumores del HGUA. Especialmente a *Cristina Alenda*, *María Niveiro* y *Sandra*, porque me hicieron fácil el acceso al material y me ayudaron con la burocracia. Siempre respondiendo muy rápido a mis dudas.

A las bibliotecarias del HGUA, en especial *Encarna*, por su velocidad en hacerme llegar todos los artículos que le he ido pidiendo, fueran más o menos accesibles.

Al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario de Alicante. Gracias a los grandes profesionales que lo formáis, por enseñarme todo de nuestra especialidad durante mi residencia, y fuera de ella. Sigo aprendiendo de cada uno de vosotros cada día. En especial, a *Ángela*, *Lola* y *Charo*, porque de ellas he aprendido TODO en el manejo de la Patología Mamaria.

A mi "trío apañado", *Ana Belén* y *Ceci*, por nuestros 4 años de residencia y miles de momentos compartidos dentro y fuera del hospital. Gracias por vuestra ayuda y apoyo en mis momentos difíciles.

A *Tina*; gracias a ella tengo a veces déficits de horas de sueño por las guardias pero aún así, sigo pensando que mereció la pena elegir ser obstetra y ginecóloga y aprender de tí. Porque me mostró lo apasionante que es esta especialidad y hoy la tengo entre mis amigas.

A *Horten*, mi otra mentora, la verdad es que desde Milano iniciamos un lazo de amistad que espero no se corte nunca, y junto con Tina sois mis dos pilares básicos profesionales. Me encanta aprender con vosotras!.

A mis *padres*, por su generosidad, por inculcarme los valores que realmente importan en la vida. Por ser como sois. Porque siempre están ahí cuando os necesito, sin preguntar. Gracias.

A mis hermanos, *Bea y David*, por ser otro de mis apoyos en la vida. Cada día me sorprendéis más con vuestros logros, me encanta teneros cerca.

A mis tios, *Ana y Miguel*, que son mis segundos padres. Sé que os tengo ahí siempre. Sois referente en mi vida.

A todos mi *familia y amigos*, por su comprensión cuando no he podido quedar con ellos y me han echado un cable cuando lo he necesitado (*Javi*, gracias por “tu toque artístico”).

Por supuesto a mi núcleo, el centro de mi vida. Lo que más me importa en este mundo. *Pablo, Javier, Celia y Juan Pablo*. Os pido perdón por las miles de horas que os he quitado de estar con vosotros. Por estas tardes interminables que se asomaban al estudio preguntando... mamá, ¿cuándo acabas tu libro?... Os adoro. Y a ti, *Juan Pablo*, que das luz a mi vida. Porque siempre sabes ver lo bueno de las cosas. Por ser cómo eres. Por ayudarme a conseguir mis sueños. Te quiero. Esta tesis es vuestra.

Por último, a todas las mujeres que han colaborado respondiendo a mis preguntas cuando las llamé. Sin ellas no hubiera sido posible hacer este trabajo. A todas las mujeres que en un momento determinado de su vida tienen que lidiar contra el cáncer de mama.

A todos, muchas gracias.



Tabla de contenido

Índice de Cuadros, Figuras, y Tablas	21
Abreviaturas	33
1. Introducción	37
1.1 Preámbulo	39
1.2 Epidemiología del cáncer de mama	40
1.3 Diagnóstico precoz del cáncer de mama	46
1.4 Anatomía e histología de la mama	49
1.5 Factores de riesgo del cáncer de mama	53
1.5.1 Edad	53
1.5.2 Sexo	53
1.5.3 Raza	54
1.5.4 Obesidad	54
1.5.5. Factores genéticos y antecedentes familiares	54
1.5.6. Factores obstétrico-ginecológicos (reproductivos)	55
1.5.7. Factores hormonales	56
1.5.8. Estilos de vida	57
1.5.9. Densidad mamaria	59
1.5.10. Historia previa patología mamaria	59
1.5.11. Radiaciones ionizantes	60
1.5.12. Área geográfica	60
1.5.13. Factores ambientales	61
1.5.14. Estrés	61
1.5.15. VPH	61
1.6 Clasificación anatomopatológica del cáncer de mama	62
1.6.1. Carcinoma infiltrante de tipo no especial (NST)	62
1.6.2. Carcinoma infiltrante de tipo especial	64
1.6.3. Lesiones precursoras del cáncer de mama	64
1.7 Estadificación del cáncer de mama	66
1.7.1 Tamaño del tumor (T).....	66
1.7.2 Afectación ganglionar (N).....	67
1.7.3 Metástasis a distancia (M)	69

1.7.4	Estadificación	70
1.8	Factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama.....	71
1.8.1	Factores pronóstico	72
1.8.2	Factores predictivos	86
1.9	Tratamiento del cáncer de mama	88
2	Justificación. Situación actual	91
2.1	Virus del Papiloma Humano	94
2.1.1	Tipos de VPH	95
2.1.2	Ciclo viral	97
2.1.3	Carcinogénesis	99
2.1.4	Prevalencia de la infección por VPH	100
2.1.5	Métodos de detección del VPH	101
2.2	Cáncer de mama y virus. El VPH	108
3	Hipótesis de estudio. Objetivos	121
4	Material y métodos.....	125
4.1	Lugar de realización- entorno.....	127
4.2	Diseño del estudio	128
4.2.1	Cálculo del tamaño muestral	128
4.2.2	Población a estudio	129
4.2.3	Recogida de datos	130
4.2.4	Análisis de las piezas quirúrgicas	131
4.2.5	Obtención de ADN viral	131
4.2.6	Definición de variables	135
4.2.7	Análisis de los datos	137
4.2.8	Consideraciones éticas	138
4.3	Descripción de la muestra obtenida	140
4.3.1	Descriptivo de los casos	142
4.3.2	Descriptivo de los controles	149
4.3.3	Homogeneidad de casos y controles	152

5	Resultados	163
5.1	Presencia de VPH en los casos y en los controles	165
5.2	VPH en los controles	168
5.3	VPH en los casos	169
5.4	VPH en casos y las variables anatomopatológicas	170
5.5	VPH en casos y subtipos inmunohistoquímicos	181
5.6	Infección múltiple y serotipos en casos y controles	182
6	Discusión	187
6.1	Presencia de VPH	189
6.1.1	VPH y características anatomopatológicas.....	198
6.1.2	VPH y subtipos inmunohistoquímicos.....	200
6.1.3	Infección múltiple y serotipos virales.....	202
6.2	Consideraciones sobre la presencia de VPH en tejido neoplásico mamario y la hipótesis de causalidad	205
6.2.1	Conservación de la muestra.....	205
6.2.2	Técnica molecular. Cebadores.....	206
6.2.3	Los controles.....	209
6.2.4	Forms de transmisión del VPH.....	209
6.3	Limitaciones del estudio. Nuevos planteamientos	212
7	Conclusiones	217
8	Bibliografía	221
9	Anexos	243



Índice de

Cuadros,

Figuras,

y Tablas

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Factores de riesgo del cáncer de mama.	53
Cuadro 2	Lesiones benignas de la mama.	60
Cuadro 3	Clasificación anatomopatológica del cáncer de mama, sin incluir microinvasión ni lesiones premalignas).	63
Cuadro 4	Lesiones precursoras, lesiones intraductales proliferativas y lesiones papilares.	65
Cuadro 5	Sistema de clasificación T para el cáncer de mama según ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis treatment and follow-up, 2013.	66
Cuadro 6	Sistema de clasificación N para el cáncer de mama según ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis treatment and follow-up, 2013.	67
Cuadro 7	Sistema de clasificación M para el cáncer de mama según ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis treatment and follow-up, 2013.	69
Cuadro 8	Estadificación según TNM.	70
Cuadro 9	Factores pronóstico y predictivos en el cáncer de mama.	72
Cuadro 10	Clasificación molecular del cáncer de mama.	79
Cuadro 11	Clasificación según subgrupos de cáncer de mama orientada al tratamiento, St Gallen 2015.	82
Cuadro 12	Propuesta de clasificación para el subtipo receptores hormonales positivo, HER2 negativo, Maisonneuve et al, 2014.	83
Cuadro 13	Métodos de detección del VPH.	107
Cuadro 14	Criterios de causalidad de Bradford Hill.	111
Cuadro 15	Ventana del formulario de la base de datos para la introducción de datos.	130
Cuadro 16	Resumen de la homogeneidad entre casos y controles.	162
Cuadro 1	Posibles causas de falsos negativos.	205
Cuadro 17	Posibles casusa de falsos positivos.	205

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ratios estandarizados y porcentajes de Incidencia y Mortalidad por cáncer de mama a nivel mundial, en mujeres por 100. 000 hab/año, GLOBOCAN 2012.	41
Figura 2	Ratios estandarizados de Incidencia por cáncer de mama a nivel mundial, en mujeres por 100. 000 hab/año, en mapa mundi, GLOBOCAN 2012.	41
Figura 3	Ratios estandarizados de Mortalidad por cáncer de mama a nivel mundial, en mujeres por 100. 000 hab/año, en mapa mundi, GLOBOCAN 2012.	42
Figura 4	Mortalidad en algunos países europeos.	43
Figura 5	Incidencia del cáncer de mama en Europa en mujeres por 100 000 hab/año.	43
Figura 6	Ratios de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres en España (GLOBOCAN 2012).	44
Figura 7	Distribución porcentual de la incidencia por grupos tumorales en mujeres, SIO 2010.	45
Figura 8	Tasas de Incidencias estimadas, ajustada a edad y sexo en la Comunidad Valenciana en el año 2010.	45
Figura 9	Clasificación BIRADS, 2013.	48
Figura 10	Corte sagital de la glándula mamaria.	51
Figura 11	Variantes moleculares del cáncer de mama por Perou y Sorlie.	79
Figura 12	Características de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, St Gallen, 2013.	81
Figura 13	Virus del Papiloma humano.	95
Figura 14	Clasificación taxonómica del VPH en base a proximidad genética en el gen L1, de acuerdo con la evolución del VPH. De Villiers.	96
Figura 15	Ciclo viral del VPH-AR en el epitelio cervical, cedido por Doobar.	98
Figura 16	Prevalencia del VPH con citología normal.	100
Figura 17	Prevalencia del VPH con citología normal, ajustada por región. Modificada de Bruni et al.	101
Figura 18	Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.	103
Figura 19	Esquema del método de visualización de CLART.	106
Figura 20	Artículos publicados sobre el VPH y el cáncer de mama.	112

Figura 21	Número de artículos publicados acerca de VPH y cáncer de mama por zonas geográficas.	117
Figura 22	Prevalencia del VPH en las muestras de los casos y de los controles por zonas geográficas.	119
Figura 23	Incidencia de cáncer de mama en el Hospital General Universitario de Alicante 2006-2012.	127
Figura 24	Diseño inicial del estudio.	128
Figura 25	Clasificación IHQ seguida en este estudio.	136
Figura 26	Flujo de casos.	140
Figura 27	Flujo de controles.	140
Figura 28	Descriptivo de la variable patología mamaria de los casos.	144
Figura 29	Descriptivo de la variable grado histológico de los casos.	145
Figura 30	Porcentaje de invasión linfovascular en la muestra.	146
Figura 31	Distribución de los casos según la variable neoadyuvancia.	146
Figura 32	Distribución de los casos según la afectación axilar.	146
Figura 33	Distribución de los casos con metástasis a distancia.	146
Figura 34	Distribución de los casos por estadio tumoral.	147
Figura 35	Representación de los porcentajes de receptores de estrógenos y progesterona en la muestra.	147
Figura 36	Representación de los porcentajes de HER2 amplificado en la muestra.	148
Figura 37	Representación de los porcentajes de Ki-67 en la muestra.	148
Figura 38	Distribución de los casos según perfil inmunohistoquímico.	149
Figura 39	Descriptivo de la variable patología mamaria de los controles.	151
Figura 40	Distribución en porcentaje de las diferentes patologías benignas en el grupo control de la muestra a estudio.	152
Figura 41	Distribución de la población del estudio casos/controles por franjas de edad.	153
Figura 42	Distribución por edad de las diferentes patologías mamarias según la OMS 2012.	153
Figura 43	Distribución de la variable tabaco en la población a estudio.	154

Figura 44	Porcentaje de mujeres fumadoras o exfumadoras de los casos, de los controles, y de la población española obtenida del Ministerio de Salud, Servicios Sociales de Igualdad, 2011.	155
Figura 45	Distribución de la población a estudio por antecedentes personales de cáncer de mama.	156
Figura 46	Distribución de la población del estudio según paridad.	158
Figura 47	Distribución de la población de estudio según la variable lactancia materna.	159
Figura 48	Distribución de la población del estudio por la edad de la menopausia estratificada.	160
Figura 49	Distribución de la población del estudio por patología cervical.	161
Figura 50	Proporción de VPH positivo y VPH negativo en la población a estudio casos/controles.	165
Figura 51	Proporción de VPH positivo y VPH negativo en la población de los controles (desglosada) a estudio.	168
Figura 52	Proporción de VPH positivo y VPH negativo en la población de los casos (desglosada) a estudio.	169
Figura 53	Proporción de presencia de VPH según grados histológicos.	171
Figura 54	Proporción de presencia de VPH según la variable invasión linfocelular.	172
Figura 55	Proporción de presencia de VPH según la variable ganglios regionales metastásicos.	173
Figura 56	Proporción de presencia de VPH según la variable metástasis al diagnóstico.	174
Figura 57	Proporción de presencia de VPH según la variable neoadyuvancia.	175
Figura 58	Distribución de la población de casos del estudio según estadio y presencia o no de VPH.	176
Figura 59	Proporción de presencia de VPH según la variable receptores de estrógenos.	177
Figura 60	Proporción de presencia de VPH según la variable receptores de progesterona.	178
Figura 61	Proporción de presencia de VPH según la variable HER2.	179
Figura 62	Distribución de la variable Ki-67 en la muestra estudiada según la presencia de VPH.	180
Figura 63	Distribución de la exposición a VPH en la variable fenotipo inmunohistoquímico.	181
Figura 64	Distribución de la presencia de VPH-AR y VPH-BR en los casos y en los controles.	183
Figura 65	Distribución por serotipos de VPH-HR en los casos y en los controles.	184
Figura 66	Distribución por serotipos de alto riesgo con respecto al total de la muestra.	184

Figura 67	Distribución por serotipos de VPH-LR en los casos y en los controles.	185
Figura 68	Distribución por serotipos de bajo riesgo con respecto al total de la muestra.	186
Figura 69	Número total de casos estudiados en las diferentes regiones del mundo.	190
Figura 70	Prevalencia de VPH de los casos por artículos publicados.	197
Figura 71	Proporción de subtipos moleculares en tumores VPH positivos.	200
Figura 72	Proporción de serotipos más frecuentes encontrados en el total muestral.	202
Figura 73	Proporción de serotipos más frecuentes encontrados en las muestras del estudio.	202



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Porcentaje de supervivencia a 5 años en función del estadio tumoral.	74
Tabla 2	Descripción de los estudios sobre VPH y cáncer de mama.	113
Tabla 3	Serotipos de VPH más frecuentes encontrados en los estudios revisados.	120
Tabla 4	Descriptivo de las variables cuantitativas de los casos.	142
Tabla 5	Descriptivo de las variables cualitativas de los casos.	142
Tabla 6	Descriptivo de la variable grado histológico estratificado en carcinoma in situ e infiltrante de los casos.	145
Tabla 7	Descriptivo de las variables cuantitativas de los controles.	149
Tabla 8	Descriptivo de las variables cualitativas de los controles.	150
Tabla 9	Descriptivo de la patología mamaria de los controles desglosada por patología.	151
Tabla 10	Distribución de la muestra de estudio por la variable edad.	152
Tabla 11	Distribución de la muestra de estudio por la variable edad estratificada.	153
Tabla 12	Exposición al tabaco de los casos y controles.	154
Tabla 13	Exposición al tabaco de los casos y controles estratificada por edad.	155
Tabla 14	Distribución en la población a estudio de los antecedentes personales de cáncer de mama.	156
Tabla 15	Comparación de las medias en el número de hijos entre casos y controles.	157
Tabla 16	Distribución de la población de estudio según paridad.	158
Tabla 17	Comparación de medias de meses de lactancia materna en casos y controles.	159
Tabla 18	Distribución de la población de estudio según la variable lactancia estratificada.	159
Tabla 19	Estadísticos descriptivos para la variable edad media de la menopausia (EMP).	159
Tabla 20	Distribución de la población del estudio por franjas de edad de menopausia.	160
Tabla 21	Distribución de la población del estudio por patología cervical.	161
Tabla 22	Número y porcentaje de casos y controles en cada nivel de exposición a VPH.	165
Tabla 23	OR (IC 95%) de desarrollar tumor de mama según exposición a VPH estimado por modelo logístico.	166

Tabla 24	Modelo logístico binario para la probabilidad de pertenecer al grupo casos/control. Variables que están en el modelo	166
Tabla 25	Variables que no están en el modelo	166
Tabla 26	Evaluación de la incidencia de VPH en lesiones benignas de la mama.	168
Tabla 27	Evaluación de la incidencia de VPH en cánceres infiltrantes e in situ.	169
Tabla 28	Estadísticos descriptivos para la variable cuantitativa tamaño tumoral (T) en cada nivel de exposición.	170
Tabla 29	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable grado histológico del tumor.	171
Tabla 30	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable infiltración linfovascular.	172
Tabla 31	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable presencia de ganglios regionales metastásicos.	173
Tabla 32	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable metástasis a distancia.	174
Tabla 33	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable neoadyuvancia.	175
Tabla 34	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable estadio tumoral.	176
Tabla 35	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable estadio tumoral estratificada en estadio inicial o avanzado.	176
Tabla 36	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable presencia de receptores de estrógenos y de progesterona.	177
Tabla 37	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable presencia de receptores de estrógenos y de progesterona (análisis dicotómico positivo/negativo).	178
Tabla 38	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable sobreexpresión HER2.	179
Tabla 39	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable cualitativa Ki-67.	180
Tabla 40	Número y porcentaje de exposición a VPH en la variable fenotipo inmunohistoquímico.	181
Tabla 41	Porcentaje de infección múltiple en los casos y en los controles.	182
Tabla 42	Distribución de los serotipos virales según alto o bajo riesgo en los casos y en los controles.	182
Tabla 43	Frecuencia de los diferentes serotipos de VPH de alto riesgo (HR) en los casos y en los controles.	183
Tabla 44	Frecuencia de los diferentes serotipos de VPH de bajo riesgo (HR) en los casos y	185

	en los controles.	
Tabla 45	Selección de estudios que recogen casos y controles.	192
Tabla 46	Selección de estudios que no encuentran VPH.	196
Tabla 47	Serotipos de VPH publicados en la literatura.	203





Abreviaturas

ASCUS: Atipia de células escamosas de significado incierto

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela

CDI: Carcinoma ductal infiltrante

CDIS: Carcinoma ductal in situ

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CIN: Neoplasia Cervical Intraepitelial

CK: Citoqueratinas

CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante

CLIS: Carcinoma lobulillar in situ

CMV: Citomegalovirus

CTA: Células tumorales aisladas

CTC (CTT): Células tumorales circulantes

EBCCG: Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

ESCO: European Society for Medical Oncology

FDA: Food and Drug Administration

GEICAM: Grupo para el Estudio y la Investigación en Cáncer de Mama

GC: Ganglio centinela

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

HMTV: Human mammary tumor virus

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante

H-SIL: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Inmunohistoquímica

IMC: Índice de masa corporal

ISH: Hibridación in situ

L-SIL: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

MMTV: Mice mammary tumor virus

OMS (WHO): Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio

Pb: Pares de bases

PIB: Producto Interior Bruto

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RE: Receptores de estrógenos

RPg: Receptores de progesterona

Rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa

SIO: Sistema de información oncológica

TIL: Linfocitos tumorales infiltrantes

VEB: Virus del Epstein Barr

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VHH: Virus herpes

VHS: Virus herpes simple

VPH: Virus del papiloma humano

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo

VPH-BR: Virus del papiloma humano de bajo riesgo

VPP: Valor predictivo positivo



1. Introducción

1.1 Preámbulo

El cáncer de mama es uno de los principales problemas de salud de nuestro tiempo. Su elevada incidencia y mortalidad, en nuestro país como en gran parte del mundo, suscita un enorme interés social debido por un lado, al impacto físico, mental, familiar y laboral, aspectos del estigma personal que todavía produce en las mujeres; y por otro lado, al creciente gasto sanitario que conlleva su diagnóstico y tratamiento.

Si bien es cierto que cada día se avanza más en el conocimiento de esta compleja enfermedad, el gran reto pendiente es el de su cura así como progresar en su prevención.



1.2 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en las mujeres, con más casos en los países llamados en vías de desarrollo (883.000 casos) (1-3) que en los desarrollados (794.000 casos). Se estima que en 2012 fueron diagnosticados 1,7 millones de casos nuevos, lo que supone el 11,9% del total de cánceres diagnosticados en el mundo en ambos sexos, y el 25% de los diagnosticados en mujeres (3,4)(figuras 1 y 2).

Las tasas de incidencia varían aproximadamente en cuatro veces, según la región del mundo que se estudie. Las mayores tasas de incidencia se presentan en Australia, Europa y Norteamérica, donde el 6% de las mujeres desarrollará un carcinoma infiltrante antes de los 75 años. Sin embargo, en otras áreas del mundo como el África Sub-Sahariana y el Este Asiático, la incidencia es, en el momento actual, del orden de tres veces menor. No obstante, en los últimos tiempos se detecta un aumento del riesgo debido a la mayor esperanza de vida y la adopción de modos de vida occidentales (1,4).

El cáncer de mama supone la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres (14,7%) a nivel mundial. No obstante, si se tiene en cuenta sólo las regiones más desarrolladas, se sitúa en la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (15,4%), después del cáncer de pulmón (3).

El rango de las tasas de mortalidad entre las regiones del mundo es menor que el de la incidencia debido a la mayor supervivencia del cáncer de mama en regiones desarrolladas (que son las de alta incidencia), con tasas que oscilan del 6 por 100.000/mujeres/año en Asia del Este al 20 por 100.000/mujeres/año en África Occidental (2,3) (figuras 1, 2 y 3).

A nivel mundial, las tasas de supervivencia del cáncer de mama varían también mucho en función del PIB, oscilando desde el 80% en América del Norte, Suecia y Japón hasta cifras inferiores al 40% en los países de menor renta per cápita donde se echa en falta tanto programas de detección precoz, como servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento.

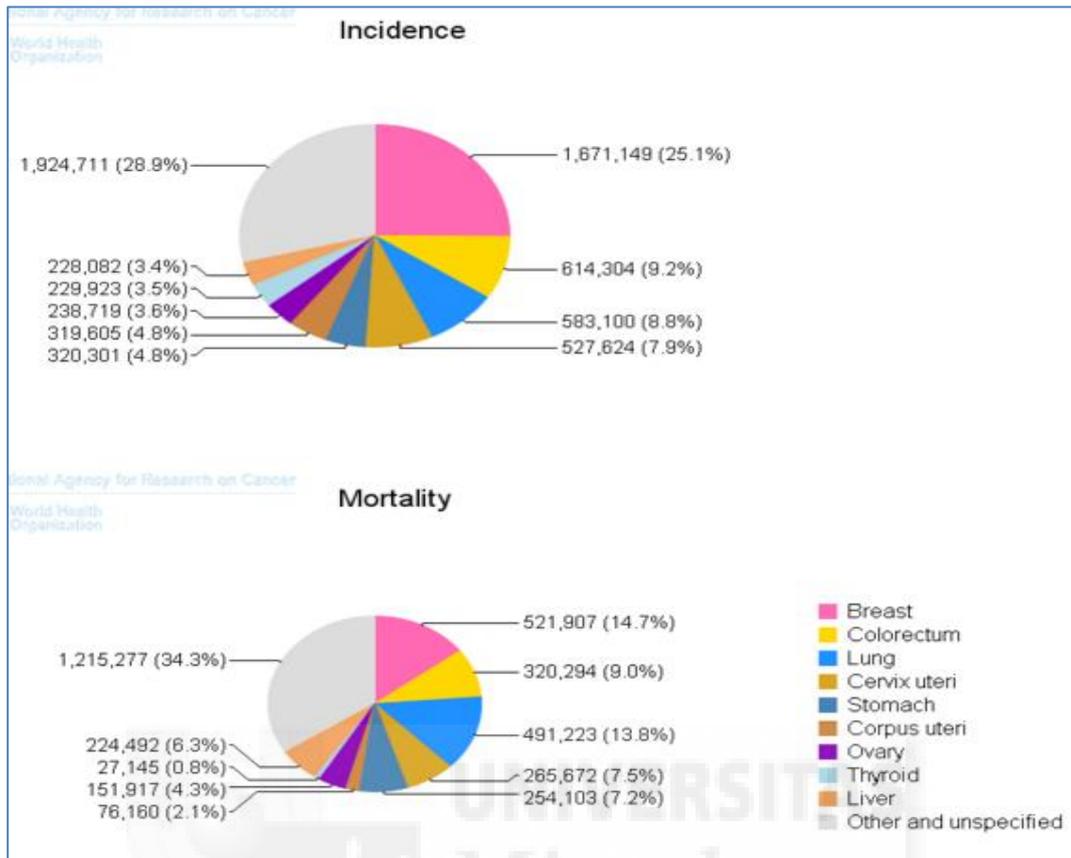


Figura 1: Ratios estandarizados y porcentajes de Incidencia y Mortalidad por cáncer a nivel mundial, en mujeres por 100.000 habitantes/año, GLOBOCAN 2012.

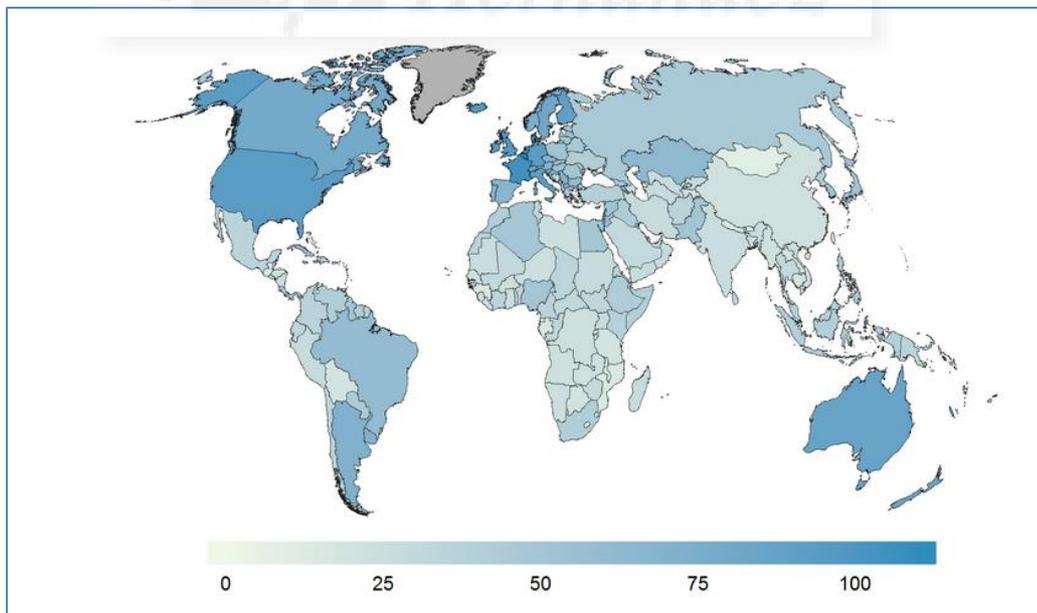


Figura 2: Ratios estandarizados de Incidencia por cáncer de mama a nivel mundial, en mujeres por 100.000 habitantes/año, en mapa mundi, GLOBOCAN 2012.

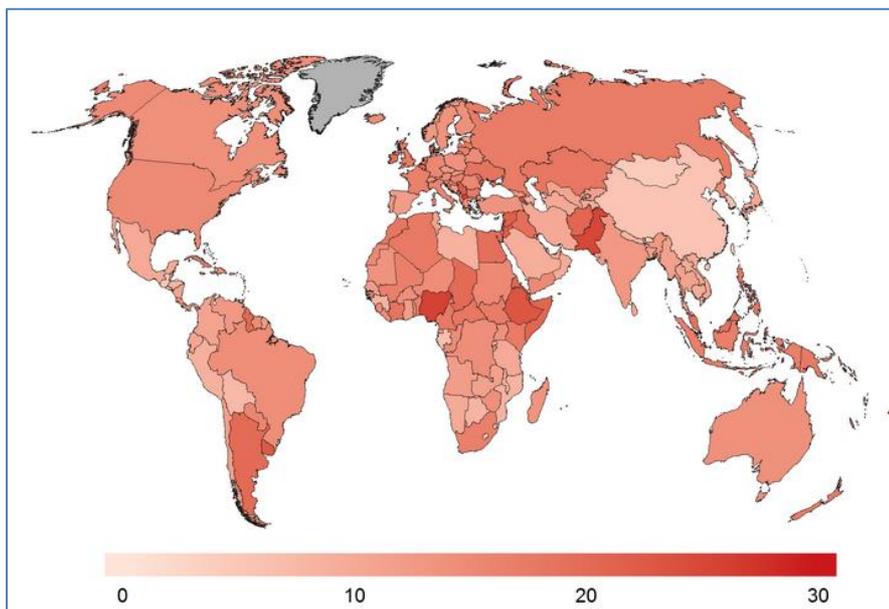


Figura 3: Ratios estandarizados de Mortalidad por cáncer de mama en el mundo en 2012 en mujeres por 100.000 habitantes/año.

En Europa, el cáncer más frecuente es el de mama, suponiendo el 13,5% de todos los cánceres en ambos sexos y el 28,8% de los cánceres en mujeres. Por otro lado, el 16,8% de las muertes por cáncer en mujeres europeas es por este cáncer, ocupando también el primer lugar (2). Sin embargo, la mortalidad por cáncer de mama ha experimentado un descenso, cuyo inicio se produjo en la última década del siglo XX en algunos países. En 2011, la mortalidad en Dinamarca, país con mortalidad más alta, era 1,6 veces superior a la mortalidad en España, país con la mortalidad más baja. En el conjunto de la Unión Europea la mortalidad por cáncer de mama descendió un 23% entre 1990 y 2011 (5)(figura 4). En Europa, el pronóstico es relativamente bueno, con unas tasas de supervivencia a 5 años cercanas al 77%.

En España, el cáncer de mama también es el más frecuente en mujeres. Tanto la incidencia como la mortalidad es una de las más bajas de Europa, tal y como se muestran en las figuras 4 y 5.

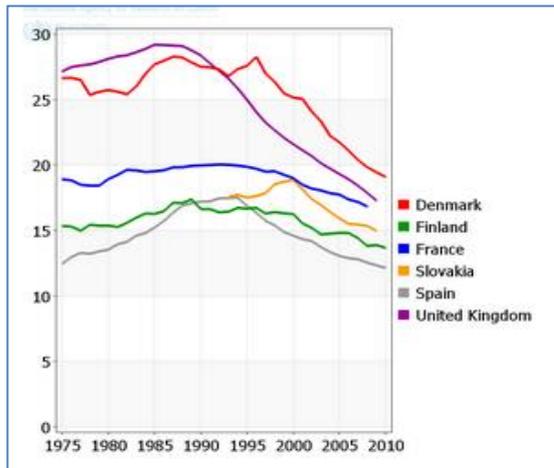


Figura 4: Mortalidad en algunos países europeos.

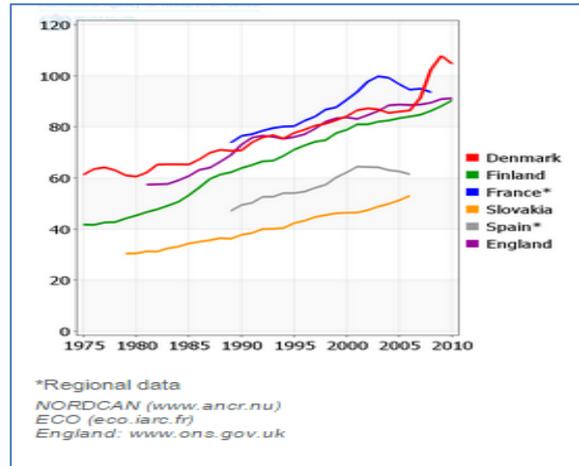


Figura 5: Incidencia del cáncer de mama en mujeres por 100.000hab/año.

En nuestro país, se diagnosticaron 25.215 nuevos cánceres de mama en 2012, lo que representa casi el 11,7% de cánceres para ambos sexos y el 29% de todos los tumores en mujeres (figura 6). La mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y los 65 años de edad.

La mortalidad por cáncer de mama en España es del 5,9% para ambos sexos y si sólo tenemos en cuenta la población femenina, es responsable de un 15,5% (6.075 defunciones en 2012) del total de muertes por cáncer.

Por otro lado, la prevalencia es del 17,9% a nivel general, pero si desglosamos por sexos, supone que el 40,8% (104.210) de las mujeres que padecen cáncer en España es por cáncer de mama, lo que supone las tasas más altas a nivel de cáncer en nuestro país (6).

Aunque la mortalidad ha disminuido, se ha observado un incremento en la incidencia del cáncer de mama desde 2001 en mujeres por debajo de los 45 años, atribuibles, entre otros, a los cambios reproductivos, estilo de vida y dieta (7). El aumento de la incidencia se estima en un 1-2% anual. Así, se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama es de aproximadamente 1 de cada 8 mujeres (5,8).

Los ratios de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres en España se pueden observar en la figura 6 (GLOBOCAN 2012 IARC).

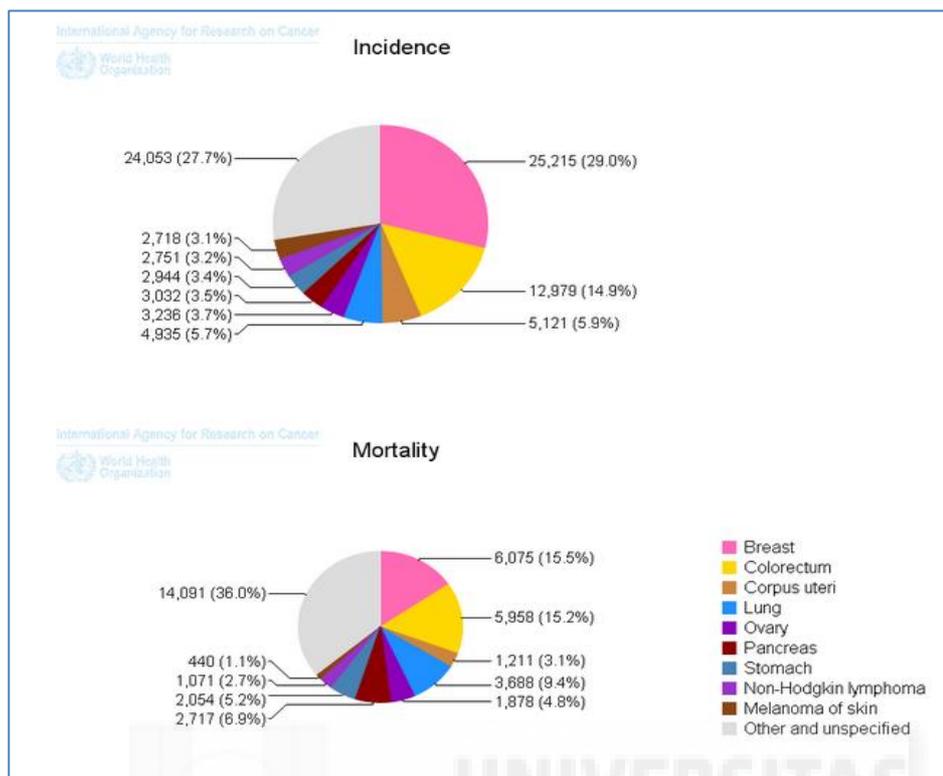


Figura 6: Ratios de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres en España (GLOBOCAN 2012).

La vigilancia del cáncer en la Comunitat Valenciana se realiza a través del Sistema de Información Oncológica (SIO), que es el instrumento que permite realizar estimaciones de incidencia para todo el territorio valenciano. Aquí, la principal causa de cáncer en mujeres, al igual que en el resto de regiones del mundo, es el cáncer de mama que supone un 30,5%, según los datos obtenidos del SIO (9) (figuras 7 y 8).

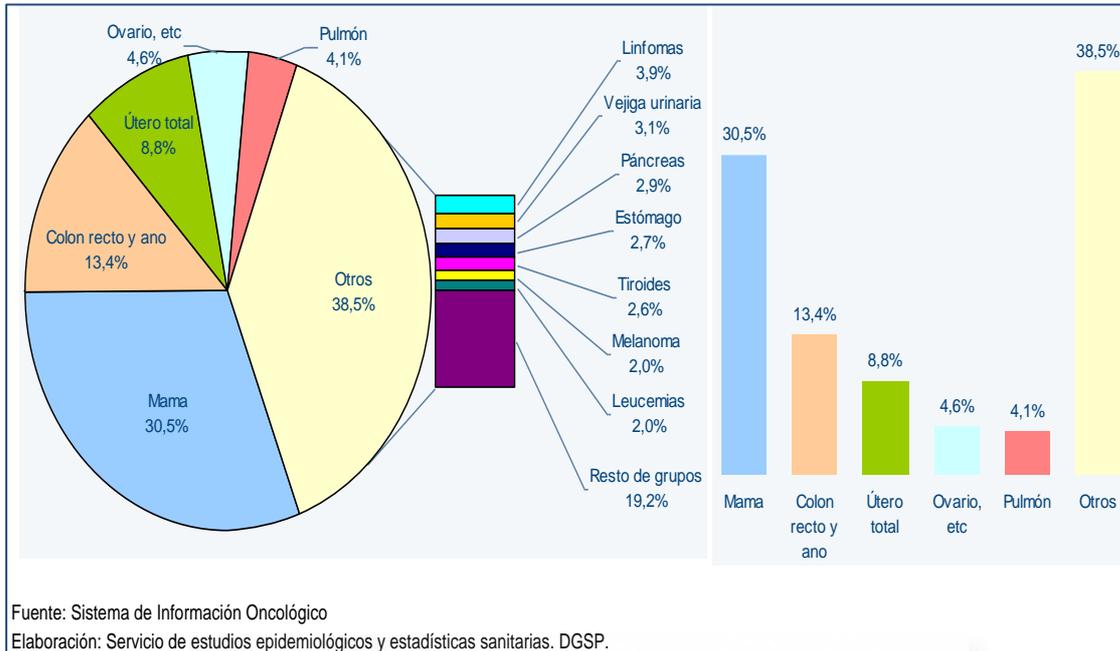


Figura 7: Distribución porcentual de la incidencia por grupos tumorales en mujeres. SIO 2010.

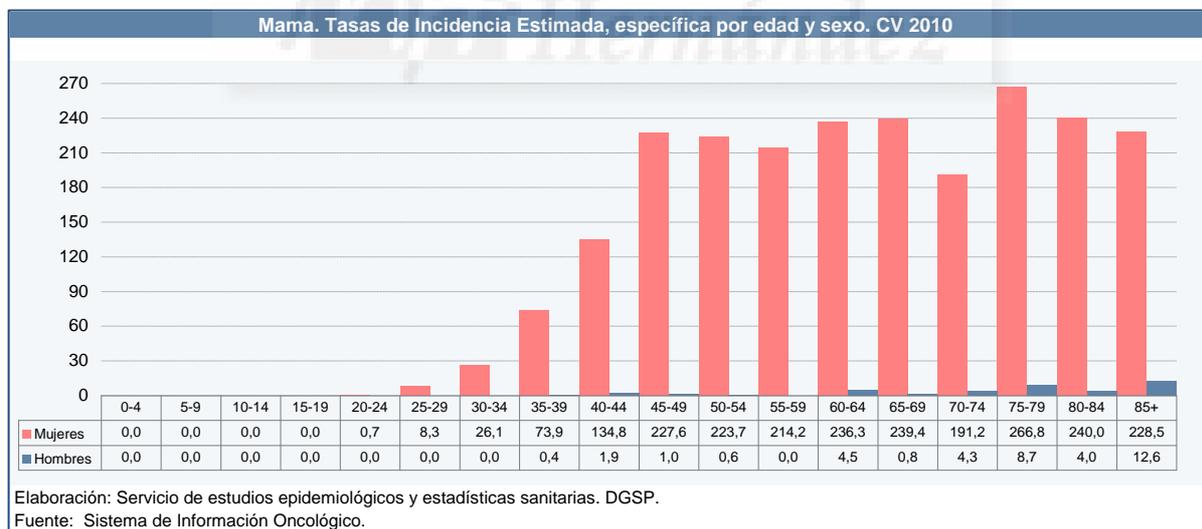


Figura 8: Tasas de Incidencias estimadas, ajustada a edad y sexo en la Comunidad Valenciana en el año 2010.

1.3 Diagnóstico precoz del cáncer de mama

Aunque se puede lograr cierta reducción del riesgo mediante medidas de prevención primaria, esas estrategias no pueden eliminar la mayoría de los cánceres de mama que se registran. Así pues, la prevención secundaria mediante la detección precoz con vistas a mejorar el pronóstico y la supervivencia del cáncer de mama sigue siendo la piedra angular del control de este tipo de cáncer (10-12).

Existen dos tipos de prevención secundaria, el cribado poblacional y el oportunista. Este último hace referencia a la población que acude voluntariamente a efectuarse una prueba. Se busca un beneficio particular de las personas estudiadas mediante el diagnóstico precoz del tumor. La iniciativa de estos programas puede ser muy variada (privada, asociaciones contra el cáncer, Mutuas, etc.) y la metodología de estudio difiere bastante de la de los programas poblacionales. No está garantizada la repetición sistemática de los estudios ni la derivación de los casos sospechosos (11,13).

El cáncer de mama reúne todos los requisitos exigibles para ser objeto de un programa de cribado de carácter poblacional porque (12,13):

- ✚ Constituye un importante problema sanitario, con tasas altas de incidencia y mortalidad.
- ✚ El conocimiento de su historia natural permite diferenciar una fase preclínica, detectable mediante mamografía.
- ✚ En el momento actual, las medidas de prevención primaria (por ejemplo en portadora de la mutación en BRCA1) son aún insuficientes para disminuir la prevalencia de este cáncer.
- ✚ El tratamiento en fases precoces permite una mayor proporción de tratamientos conservadores con tasas de supervivencia elevadas. Esta supervivencia es directamente proporcional al estadio en el diagnóstico.

El programa de cribado del cáncer de mama es una tarea multidisciplinar compleja cuyo objetivo es la disminución de la mortalidad, detectando la enfermedad precozmente para poder realizar un tratamiento eficaz, sin que afecte a la salud de aquellas mujeres que participen en el programa, es decir, que su beneficio debe superar los perjuicios del mismo (12,14).

Así, la mamografía es el único método de cribado que se ha revelado eficaz, y existe un fuerte consenso (grado de recomendación 1A) de que si su cobertura supera el 70%, puede reducir la mortalidad en un 20-30% en las mujeres de entre 50 y 70 años. Entre los 40 y 49 años hay que valorar el riesgo individual, al igual que aquellas mujeres que tienen más de 70 años, ya que la evidencia generada por los estudios no es concluyente (11,15).

A este respecto, muchos autores se han planteado su utilidad. En el año 2000 se publicó el primer artículo que ponía en tela de juicio la utilidad de la mamografía y cuestionaba la reducción de la mortalidad debido al cribado, atribuyendo al mismo una proporción importante de sobrediagnósticos y sobretratamientos (16). Esto se basa en la idea de que el cribado detectaría muchas neoplasias en estadios precoces con muy buen pronóstico, un porcentaje no despreciable de las cuales no necesitarían ningún tratamiento (11,16-19). Por cada 1000 mujeres seleccionadas cada dos años a partir de 50-51 años hasta 68-69 años, se estima que se salvan de 7 a 9 vidas, 4 casos se sobrediagnostican, 170 mujeres tienen un falso positivo que les obliga a un seguimiento con otras pruebas no invasiva y resultado negativo, y 30 mujeres tienen un falso positivo seguido de procedimientos invasivos con resultado negativo (15). Por tanto, se acepta que el cribado supone un sobrediagnóstico de entre el 10 y el 15% (15). Este artículo abrió un debate que aún hoy en día no ha concluido (16,20).

A raíz de esta corriente, se ha planteado la adaptación del cribado al riesgo individual de cada mujer. Pero para poder llevar esto a cabo, deben mejorarse las estrategias para la medición del riesgo (20).

Así, en Europa se están desarrollando varios proyectos cuyo objetivo es la detección precoz personalizada del cáncer de mama (estudio ASSURE o *Adapting Breast Cancer Screening Strategy Using Personalised Risk Estimation*, el PROCAS en el Reino Unido, el KARMA en Suecia o el Tailored Breast Screening Trial en Italia) (20). Estos estudios plantean el cribado en función del riesgo individual de cada mujer de padecer cáncer de mama añadiendo a la mamografía otras pruebas si son pertinentes. Para valorar el riesgo utilizan determinadas variables (antecedentes, densidad mamaria, etc.). Así diferencian cribados fijos de cribados variables, siendo estos últimos de mayor eficiencia y con menos efectos adversos.

En España, dentro de la Red de Investigación en Servicios Sanitarios de Salud en Enfermedades Crónicas, está en marcha un proyecto (CAMISS) que incluye también el diseño de herramientas que permitan adaptar el cribado poblacional al riesgo individual de la mujer.

Por tanto, actualmente, en España, y hasta que estos proyectos sean una realidad, se continúa con el cribado poblacional del cáncer de mama mediante mamografía, que se inició en la década de los 90.

El Programa de Detección Precoz de Cáncer de Mama de la Comunidad Valenciana se puso en funcionamiento en 1992, dirigido a mujeres asintomáticas entre 45 y 65 años. Desde 2001, y de forma progresiva, se ha ido aumentando la franja de edad hasta los 69 años para ajustarse a los estándares de la Red Europea de Cáncer de Mama. Actualmente, cuenta con 29 unidades de Prevención, abarcando en 2011 como población diana a 650.000 mujeres (18). Se realiza cada dos años una doble proyección de ambas mamas, cráneo-caudal y oblicuo-medio-lateral. Todas las mamografías son interpretadas según la clasificación BIRADS (Breast Imaging Reporting and Data System) siguiendo una doble lectura (21) (figura 9).

Clasificación BIRADS

CATEGORÍA 0: Se necesitan pruebas adicionales de imagen y/o comparación con mamografías previas o proyecciones localizadas, magnificadas u otras o ecografía. VPP= 13%
CATEGORÍA 1: Negativa. Mama normal. Control periódico habitual. VPP=0%
CATEGORÍA 2: Hallazgo benigno (fibroadenoma calcificado, lipomas, galactoceles, ...). El VPP es del 0%.
CATEGORÍA 3: Probablemente benigna. Precisa control a corto plazo/biopsia. Incluye: Nódulo sólido, circunscrito sin calcificaciones; asimetrías focales; microcalcificaciones redondeadas o puntiformes; lesiones no palpables.
CATEGORÍA 4: Anomalia sospechosa de malignidad. VPP = 15-30% Esta categoría se divide en: 4A: Baja sospecha de malignidad (masa palpable parcialmente circunscrita que por ecografía fibroadenoma, quiste complicado palpable o absceso). Si biopsia negativa, control 6 meses. 4B: Sospecha intermedia de malignidad (masas parcialmente circunscritas con márgenes parcialmente indistinguibles que resultan fibroadenoma, necrosis grasa o papiloma). Seguimiento según la concordancia clínico-radiológica. 4C: Moderada sospecha de malignidad (masas mal definidas, irregulares, sólidas, y las calcificaciones pleomórficas de nueva aparición). Si biopsia negativa, control a los 6 meses.
CATEGORÍA 5: Altamente sugestiva de malignidad. Más del 95 % de probabilidad de malignidad.
CATEGORÍA 6: Malignidad confirmada con biopsia, antes de su tratamiento definido (cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia).

Figura 9: Clasificación BIRADS, 2013, (21).

En los 20 años de actividad (1992-2012) del programa de Cribado de Cáncer de Mama en la Comunidad Valenciana, la tasa de detección global ha sido del 4,1/1.000 mujeres exploradas.

Así, se considera un programa consolidado, y goza de buena aceptación dado los resultados de los indicadores de participación y adhesión. Además, el programa presenta una buena precocidad diagnóstica medida a través del porcentaje de tumores diagnosticados en estadios 0 y I con valores alrededor del 80% (18).

En cuanto al diagnóstico, la combinación de mamografía y/o ecografía mamaria, permanecen como pilares en el diagnóstico del cáncer de mama. La mamografía, es el primer método a utilizar en pacientes mayores de 35 años con clínica sospechosa de cáncer de mama. En pacientes jóvenes menores de 35 años, la ecografía constituye el estudio inicial. La sensibilidad y especificidad de la mamografía se sitúan entre un 66,6%-95% y 80-99,7% respectivamente, siendo para la ecografía de un 82,0% y 99,3% respectivamente. Pero la sensibilidad se puede ver influenciada por varios factores como la edad (a mayor edad, mejor sensibilidad), la densidad mamaria (a mayor densidad mamaria peor sensibilidad tanto en mamografía como en ecografía), o la experiencia del radiólogo (a mayor experiencia mayor sensibilidad) (22).



1.4 Anatomía e histología de la mama

Las mamas son un órgano par y glandular que proviene del ectodermo embrionario. Están presentes en ambos sexos. En el hombre se mantienen rudimentarias toda la vida, en cambio en la mujer están poco desarrolladas hasta antes de la pubertad, cuando empieza el proceso de maduración.

Se sitúan en la parte anterior del tórax desde la segunda hasta la sexta costilla, desde el borde externo del esternón hasta la línea axilar media y pueden extenderse en medida variable por su cara lateral. Su forma varía según características personales, genéticas y en la misma mujer de acuerdo a la edad y paridad. El área superexterna de cada glándula se extiende hacia la axila y se denomina “prolongación axilar”. La cara profunda de la mama es ligeramente cóncava y se encuentra en relación con el músculo pectoral mayor, el serrato anterior y la parte superior del oblicuo externo del abdomen. La mama está separada de estos músculos por la aponeurosis profunda. Entre ambas hay un tejido areolar laxo denominado espacio retromamario, éste permite que la mama tenga cierta movilidad sobre la aponeurosis profunda que cubre el plano muscular.

La cara superficial de la mama está cubierta por piel. El pezón está en el centro de un área oscura llamada areola. En la base del complejo areola-pezón, se localizan las células mioepiteliales, rodeadas de fibras musculares radiales que permiten la salida de la leche ante ciertos estímulos. La areola posee también numerosas glándulas sebáceas de Montgomery, éstas contienen estructuras histológicas similares a la parte glandular de la mama y producen una secreción grasa que lubrica el pezón y la areola. Bajo esta última, se ubican las dilataciones de los conductos galactóforos.

El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida; desde este tejido, se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo (ligamentos suspensorios de la mama o de Cooper).

La glándula mamaria consta de dos elementos fundamentales histológicamente hablando (23): un parénquima glandular formado por alveolos y conductos, y un estroma de soporte, principalmente tejido adiposo y conectivo.

Así, el parénquima glandular está formado por un conjunto de seis a diez lóbulos, cada uno de los cuales está dividido en lobulillos que son las unidades funcionales del parénquima mamario. Cada sistema ductal drena a través de un conducto excretor principal independiente,

ducto o seno galactóforo. Los conductos galactóforos principales se abren a la piel principalmente en el pezón (23), (figura 10).

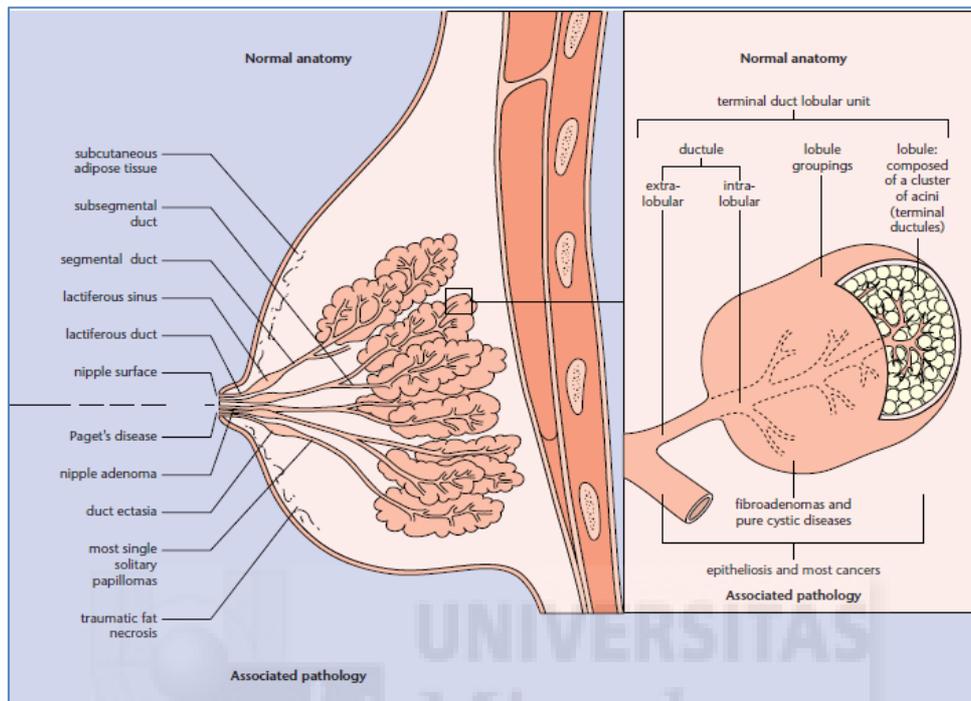


Figura 10: Corte sagital de la glándula mamaria (24).

Cada lobulillo a su vez, está formado por acinos en un número de diez a cien, cada cual con su conducto excretor denominado conducto terminal. Están rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche. Los acinos están estructurados por células secretoras que producen la leche y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción.

El pezón y la areola están revestidos por epitelio plano estratificado. El epitelio plano o escamoso se continúa en el orificio del conducto y, más adelante, se transforma de manera brusca en epitelio cuboideo de doble capa. Los conductos están revestidos por epitelio cuboideo o cilíndrico. Por fuera de este epitelio, entre él y la membrana basal, existe una capa de células mioepiteliales muy ramificadas, que envuelven a los conductos y acinos (23).

El resto de la mama está compuesto por tejido conjuntivo (colágeno y elastina) y tejido adiposo (grasa) proporcionando consistencia y volumen a la mama, además de vasos arteriales y venosos, y nervios. El drenaje linfático de las mamas se produce fundamentalmente a los ganglios linfáticos axilares, sin olvidar también los ganglios de la región de la arteria mamaria interna.

Después de la pubertad, la mama crece y decrece con cada ciclo menstrual debido a la influencia hormonal. Tras la ovulación, y bajo la influencia de los estrógenos y de los niveles cada vez mayores de progesterona, se incrementa la proliferación y el número de acinos por lobulillo y aparecen vacuolas en las células epiteliales basales, y se hace prominente el edema del estroma lobulillar. Tras la menstruación, y con el descenso de los niveles de estrógenos y progesterona, se produce la apoptosis de células epiteliales y desaparece el edema del estroma. Pero sólo con el embarazo, la mama sigue su maduración morfológica y su actividad funcional completa. Se produce una inversión en la relación del estroma con el componente glandular a favor de éste último. Aparecen en el interior de los acinos vacuolas secretoras; esta secreción adquiere características especiales y se denomina calostro. Algunos días después del parto aparece la verdadera secreción láctea, la que distiende los alveolos que en ese momento están tapizados por una sola capa de células cilíndricas bajas. A medida que aumenta la cantidad de secreción, las células se aplanan, desapareciendo los espacios intercelulares o desmosomas (23).

Después de la menopausia, la glándula mamaria se atrofia y los elementos celulares de los alveolos y conductos degeneran y disminuyen en número. A veces, pueden incluso desaparecer, dejando sólo conductos con un patrón morfológico que se asemeja al varón. Sin embargo, en la mayoría de mujeres queda suficiente estimulación estrogénica para mantener los vestigios de los lobulillos que diferencia a la mama femenina de la del hombre.

El estroma interlobulillar radiodenso de la mama joven es sustituido de manera progresiva con la edad por tejido adiposo radiotransparente. De ahí que, en mujeres jóvenes, la mamografía sea menos sensible (23,25).

1.5 Factores de riesgo del cáncer de mama

Se conocen bien varios factores de riesgo del cáncer de mama. Sin embargo, son pocos los casos que realmente podemos atribuirle una causa de riesgo identificable, y por tanto siguen teniendo poca precisión discriminatoria para identificar mujeres de riesgo. En el 88% de las pacientes, ningún factor de riesgo puede ser determinado, indicando que “todas” las mujeres deberán ser consideradas de riesgo (12,26), cuadro 1.

Cuadro 1: Factores de Riesgo para el cáncer de mama.

Edad	Factores genéticos	Obesidad	Área geográfica	Factores hormonales
Sexo	Densidad mamaria	Radiaciones Ionizantes	Factores ambientales	Factores reproductivos
Raza	Antecedentes patología mamaria	VPH	Estrés	Estilos de vida

A continuación se expondrán los principales factores de riesgo:

1.5.1. EDAD

La incidencia de cáncer de mama es muy baja por debajo de los 25 años de edad (menos de 10 casos por cada 100.000 mujeres/año). Esto pone de relieve el papel de los estrógenos como posible factor etiológico del cáncer de mama. El cáncer de mama aumenta con la edad; sin embargo, la pendiente de crecimiento se ralentiza tras la menopausia debido a la disminución de estrógenos. No obstante, la incidencia varía mucho dependiendo de la región geográfica tal y como se ha comentado en la epidemiología. En países como Suiza o EEUU, la incidencia sigue aumentando hasta los 75 años, mientras que decrece en zonas como Japón (27,28).

1.5.2. SEXO

La variable sexo es uno de los factores de riesgo más importantes. El cáncer de mama es 100 veces más frecuente en mujeres que en hombres (28,29).

1.5.3. RAZA

Las mujeres de raza blanca tienen más probabilidad de desarrollar un cáncer de mama. Gran parte de las diferencias étnicas en las tasas de cáncer de mama son atribuibles a factores asociados con el estilo de vida (ver más adelante) y acceso a la salud, aunque los factores genéticos y/o biológicos pueden contribuir también. Por ejemplo, el cáncer de mama en mujeres menores de 40 años con el inmunofenotipo triple negativo parece ser más común entre las afroamericanas que entre las mujeres de raza blanca (30). No obstante la mayoría de los estudios están realizados en EEUU, en donde actualmente todavía hay desigualdades para acceder al sistema de salud según la raza a la que se pertenezca (28,31).

1.5.4. OBESIDAD

Un Índice de masa corporal (IMC) $\geq 30 \text{kg/m}^2$ se asocia con un aumento global de la morbilidad y la mortalidad. Sin embargo, el riesgo de cáncer de mama asociado con el IMC parece depender de la condición de la menopausia. El aumento de peso a partir de la perimenopausia se ha asociado, de manera consistente, con un mayor riesgo de cáncer de mama. Esto puede explicarse por los niveles más altos de estrógenos que resultan de la conversión periférica de los mismos. En cambio, en las mujeres premenopáusicas un mayor índice de masa corporal se asocia con un menor riesgo de cáncer de mama, quizás debido a los ciclos anovulatorios con niveles menores de progesterona en las fases finales del ciclo (28,29,32).

1.5.5. FACTORES GENÉTICOS Y ANTECEDENTES FAMILIARES

Los antecedentes familiares de cáncer de mama, multiplican el riesgo por dos (un familiar de primer grado), o por tres (dos familiares de primer grado). No obstante, no sólo depende del número de familiares de primer grado diagnosticados de cáncer de mama, sino también la edad del diagnóstico. Así, si el diagnóstico se hace antes de los 30 años en un familiar de primer grado, el riesgo de tener cáncer de mama se multiplica por 2. Sin embargo, si la edad fue por encima de los 60 años, el riesgo se multiplicaría por 1,5. Algunas mutaciones, sobre todo en los genes BRCA1 y BRCA2 se asocian a un riesgo muy elevado de cáncer de mama. Estas mutaciones suponen entre un 5 y un 6% del total de los cánceres de mama (28,29,33).

1.5.6. FACTORES OBSTÉTRICO-GINECOLÓGICOS (REPRODUCTIVOS)

Los factores reproductivos, asociados a una exposición prolongada a estrógenos endógenos, como una menarquia precoz, una menopausia tardía y una edad avanzada en el primer parto figuran entre los factores de riesgo más importantes del cáncer de mama (27,34).

1.5.6.1. MENARQUIA

Una menarquia temprana (menos de 13 años) se ha asociado con un aumento en el riesgo entre un 10-20% de cáncer de mama, probablemente debido a la exposición prolongada del epitelio de la mama a los estrógenos y progesterona (27). Aquellas mujeres con un retraso de la menarquia por encima de los 15 años tienen menos riesgo (16% descenso del riesgo) de desarrollar cáncer de mama con receptores hormonales positivos (28,29,32).

1.5.6.2. MENOPAUSIA

Cada año de retraso en la menopausia supone un aumento de riesgo de 1.03% (28).

1.5.6.3. NULIPARIDAD

Ser nulípara supone factor de riesgo con respecto aquellas mujeres que han tenido hijos (riesgo relativo 1,16). Sin embargo, el efecto protector del embarazo no se inicia hasta 10 años después del primer parto (28,32). Por otro lado, este factor protector que supone la paridad aumenta cuando el periodo intergenésico es corto. Tener 3 o más hijos supone factor protector (32).

1.5.6.4. EDAD EN LA GESTACIÓN DEL PRIMER HIJO Y EMBARAZO

El embarazo tiene un doble efecto a corto y largo plazo: si bien es cierto que a priori aumenta el riesgo por el aumento de las hormonas circulantes, después ese riesgo disminuye y se hace factor protector gracias a la diferenciación del tejido mamario que confiere un efecto protector frente a la carcinogénesis. Se considera que el posible efecto protector que tendría la gestación desaparece si la edad del primer hijo es por encima de los 35 años, asemejándose el riesgo a las mujeres nulíparas (28). No obstante, hay estudios que la edad límite la sitúan en 30 años (32).

1.5.6.5. LACTANCIA MATERNA

Es un factor protector debido a la maduración del tejido mamario que se produce durante la misma. La lactancia materna se asocia con un menor riesgo de cáncer de mama (RR, 0,87 [IC,

0,77 a 0,98]), sobretodo partir de los 12 meses de lactancia (32). De hecho, en una gran revisión sistemática que incluía datos individuales de 47 estudios epidemiológicos, se estimó que por cada 12 meses de lactancia materna, había una reducción del 4,3% en el riesgo relativo de cáncer de mama. Un mecanismo postulado para el efecto protector de la lactancia materna es que puede retrasar el restablecimiento de los ciclos ovulatorios (28,35).

1.5.7. FACTORES HORMONALES

1.5.7.1. NIVELES HORMONALES DE ESTRÓGENOS

Los niveles altos de estrógenos endógenos aumentan el riesgo de cáncer de mama (receptores hormonales positivos) en mujeres tanto premenopáusicas (sobre todo en fase lútea), como postmenopáusicas (28).

1.5.7.2. ANTICONCEPTIVOS HORMONALES

Los estudios actuales no pueden concluir que la toma de anticonceptivos orales aumente el riesgo de cáncer de mama (28,36,37). Si bien es cierto que, en aquellos estudios donde se ha visto que sí que aumentaba el riesgo, éste desaparecía a partir de los 10 años de su cese (38). El factor de riesgo más importante parece ser el uso prolongado de anticonceptivos hormonales en mujeres jóvenes antes del primer embarazo a término, dado que las hormonas actuarían sobre un tejido mamario menos diferenciado (37). Por otro lado, los anticonceptivos reducen el riesgo de presentar enfermedad benigna de la mama (mastopatía fibroquística, fibroadenomas, etc.), y este efecto persiste tras los siete años de empleo (39).

1.5.7.3. TERAPIA HORMONAL

Aumenta el riesgo de cáncer de mama en general. El estudio Women`s Health Initiative (WHI), en el que se administró 0,625 mgr de estrógenos conjugados equinos y 2,5 mgr de acetato de medroxiprogesterona al día, fue suspendido a los 5,2 años de seguimiento por un exceso de 8 cánceres de mama por cada 10.000 mujeres/año. Sin embargo, la rama en la que únicamente se utilizó estrógenos, no registró incrementos del riesgo relativo de cáncer de mama (40). Además, parece que si su uso ha sido durante menos de 3 años, el riesgo no es estadísticamente significativo (40). Este riesgo, que desaparece tras 5 años del cese de la toma, depende de si la toma fue de sólo estrógenos (incremento del 10%) o combinado con gestágenos (se incrementa un 30%) (27,28). Por último, el riesgo parece que es mayor si se inicia la toma en los primeros

años tras la menopausia que si se inicia después de 5 años, por lo que el inicio de la toma de la terapia hormonal sustitutiva, desde este punto de vista, es controvertido.

1.5.7.4. OOFORECTOMÍA

Por otro lado, las mujeres sometidas a una ooforectomía bilateral antes de los 45 años tienen una disminución del riesgo de padecer cáncer de mama comparado con las que tienen una menopausia natural a partir de los 50 años (27).

1.5.7.5. OTROS NIVELES HORMONALES

Algunos estudios sugieren que la elevación de andrógenos incrementa el riesgo de cáncer de mama tanto en mujeres premenopáusicas como en postmenopáusicas. Lo que no es del todo concluyente es si este aumento del riesgo es específico para aquellos cánceres receptores hormonales positivos (28). Por otro lado, niveles elevados de insulina también se consideran factor de riesgo (28).

1.5.8. ESTILOS DE VIDA

Actualmente, debido a los cambios que se están produciendo en nuestra sociedad (aumento del sedentarismo y de la obesidad), las recomendaciones sobre el control del peso, la realización de ejercicio físico y la reducción del consumo de alcohol, son cada vez más necesarias ya que se ha demostrado que suponen factor de riesgo para determinados tipos de cáncer.

1.5.8.1. ALCOHOL

Algunos estudios revelaron que el riesgo de cáncer de mama aumenta en relación con la cantidad de alcohol que consume una mujer y que esta relación es dosis dependiente (el consumo de alcohol incrementa la circulación de estrógenos) (41). En 2013, un metaanálisis de 110 estudios epidemiológicos mostró una pequeña pero significativa asociación entre el cáncer de mama y la ingesta de alcohol (RR 1,05; IC del 95%: 1.2 a 1.8)(42). Este riesgo se potencia con la toma de terapia hormonal (28).

1.5.8.2. TABACO

De sobra es conocida su toxicidad y efectos nocivos sobre la salud. Medir esta variable en el cáncer de mama se complica por la influencia que tiene éste en los estrógenos endógenos. Aunque hay estudios con resultados dispares, se puede concluir que el tabaco incrementa el

riesgo de cáncer de mama. Además, se ha relacionado con un aumento mayor del riesgo si se inicia el hábito tabáquico antes del primer hijo e incluso de la menarquia (28).

1.5.8.3. TURNO LABORAL NOCTURNO

Varios estudios sugieren que trabajar en turno nocturno puede aumentar el riesgo de cáncer en general y, de mama en particular. Esta asociación puede estar relacionada con la exposición a la luz nocturna, lo que da lugar a la supresión de la producción nocturna de melatonina por la glándula pineal. La evidencia para apoyar esto, viene de la constatación de que los niveles bajos de 6-sulfatoximelatonina (el principal metabolito de la melatonina) están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama (28).

1.5.8.4. DIETA

Existe una fuerte correlación entre el total de calorías y grasas ingeridas, y la mortalidad por cáncer de mama tanto en países con alta como con baja incidencia. La ingesta de grasas influye en el metabolismo estrogénico y por tanto en los niveles de estrógenos en sangre (43). Algunos autores sugieren que el cambio en el patrón dietético, combinado con los cambios en los patrones de fertilidad, hace que aumente la incidencia de cáncer de mama en aquellas poblaciones que migran a países con alto riesgo para el mismo. Pero esto no justificaría en realidad todo el incremento de la incidencia. El GEICAM (Grupo para el Estudio y la Investigación en Cáncer de Mama) en su estudio de patrones de conducta de Epi-GEICAM (44) afirma que la adherencia al patrón occidental se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama y, sin embargo, una dieta mediterránea supondría un factor protector para el mismo. La justificación de que las dietas ricas en fibra previenen la aparición del cáncer de mama es que, por un lado tienen menos aporte calórico y por otro, favorece la eliminación vía fecal de los estrógenos conjugados en el hígado (45).

Dentro de este apartado, y relacionado con el subapartado anterior, cabe mencionar que algunos estudios proponen la altura como factor de riesgo para el cáncer de mama. El mecanismo subyacente a esta asociación se desconoce, pero puede reflejar la influencia del estado nutricional, y por tanto, la dieta que haya tenido esa persona durante la infancia y la pubertad (28,29). También se ha propuesto el alto peso al nacimiento como factor de riesgo (41).

Existen otros factores como la actividad física. Sin embargo, se puede concluir que la actividad física protege a través de la disminución del peso, la reducción de estrógenos en sangre y de la insulina.

1.5.9. DENSIDAD MAMARIA

La densidad mamográfica se define como la razón existente entre el parénquima mamario y la grasa radiolúcida adyacente. Los estudios epidemiológicos, aunque heterogéneos, evidencian que la presencia de una proporción de tejido glandular por encima del 75% se asocia a un mayor riesgo relativo (multiplicado por cuatro o cinco) de cáncer de mama (28,46), por lo que sitúa este factor como de alto riesgo relativo.

Además, hay que resaltar que el problema de densidad mamográfica no es sólo el aumento del riesgo de cáncer de mama, sino una marcada disminución de la sensibilidad de la mamografía. Esto debería hacer reflexionar a los responsables de los programas de cribado para intentar “personalizar” los mismos en función de la densidad mamaria tal y como se ha señalado en el punto de Diagnóstico Precoz (28). De hecho, Nelson y colaboradores (32), sugieren que aquellas mujeres entre 40 y 49 años con alta densidad mamaria y antecedentes familiares de primer grado con cáncer de mama deben tener un cribado mamográfico personalizado, ya que el riesgo de padecer cáncer de mama se multiplica por 2 en comparación con población sin alta densidad mamaria (29).

La densidad mamaria es inversamente proporcional a la edad, siendo las pacientes de mayor densidad mamaria las que tienen un riesgo más elevado de padecer cáncer de mama a la vez que menor sensibilidad mamográfica en el diagnóstico (47,48).

1.5.10. HISTORIA PREVIA DE PATOLOGÍA MAMARIA

El antecedente personal de cáncer de mama, sea in situ sea infiltrante, aumenta el riesgo de cáncer de mama contralateral (28,29).

Las lesiones benignas de la mama se pueden clasificar en tres grupos de riesgo (cuadro 2): las lesiones proliferativas con atipia tienen un riesgo relativo (RR) de 4-5 para desarrollar un cáncer de mama, las lesiones proliferativas sin atipia tienen un RR de 1,5-2 y las lesiones benignas de tipo no proliferativo no están asociadas con un aumento de riesgo de cáncer de mama (49,50).

Como ya se ha comentado previamente, el uso de anticonceptivos hormonales disminuye la incidencia de patología benigna. No obstante, esto no ocurre si se trata de hiperplasia con atipia, en donde incluso el riesgo está incrementado debido a que los gestágenos actúan probablemente como agente antiproliferativo en células normales pero como agente mitótico sobre células anómalas (37).

La hiperplasia ductal atípica muestra un lapso de tiempo entre la biopsia y el carcinoma infiltrante de 8-12 años como promedio. Otro dato importante es que los riesgos relativos no son constantes a lo largo de la vida de la mujer, siendo el riesgo mayor en los diez años siguientes al diagnóstico, pero si transcurridos los mismos no han desarrollado cáncer infiltrante, su riesgo relativo se reduce a la mitad. Es por ello, que deben existir cofactores que contribuyan a su desarrollo todavía no conocidos (51).

Cuadro 2: Lesiones benignas de la mama.

NO PROLIFERATIVAS	Cambios fibroadenomatosos	Necrosis grasa	Mastitis
	Cambios papilares apocrinos	Galactocele	Quistes
	Fibroadenomas simples	Harmatoma	Lipoma
PROLIFERATIVAS SIN ATIPIA	Lesiones esclerosantes	Adenoma	Cicatriz Radial
	Fibroadenoma complejo	Hiperplasia sin atipias	Fillodes
	Papiloma intraductal		
PROLIFERATIVAS CON ATIPIA	Hiperplasia ductal con atipias	Hiperplasia lobulillar con atipias	

1.5.11. RADIACIONES IONIZANTES

La exposición a radiaciones ionizantes en el tórax, como sucede tras el tratamiento de una enfermedad Hodgkin o tras un accidente de una central nuclear, incrementa el riesgo de cáncer de mama. La edad de mayor vulnerabilidad se sitúa en la etapa prepuberal, entre los 10 y 14 años. Por encima de los 45 años, no parece que la exposición a radiaciones ionizantes aumente el riesgo (28,33).

1.5.12. ÁREA GEOGRÁFICA

Tal y como se ha expuesto en el apartado de epidemiología, se han encontrado diferencias significativas (de 5 a 10 veces) en incidencia y mortalidad de una a otra región del mundo. Estas diferencias se hacen aún más profundas después de la menopausia.

La gran variación de la incidencia de cáncer de mama entre las diferentes regiones del mundo puede atribuirse a las diferencias genéticas entre poblaciones y a las diferencias en el estilo de vida, factores reproductivos y exposición ambiental. Los estudios sobre inmigrantes han demostrado que la incidencia de cáncer de mama aumenta en mujeres que se trasladan de una

zona de baja a una de alta incidencia (como Estados Unidos o países occidentales) incluso este riesgo se trasmite a las dos generaciones posteriores (27-29,34,43).

1.5.13. FACTORES AMBIENTALES

La exposición a estrógenos en el ambiente, por ejemplo, las hormonas presentes en la carne o los pesticidas organoclorados, los cuales producen sustancias similares al estrógeno cuando son absorbidos por el cuerpo, suponen una manera de incrementar los estrógenos corporales (28).

1.5.14. ESTRÉS

Ya en 1994 se describió el estrés (52) como factor fundamental que afecta al crecimiento de un tumor, junto con la personalidad de un individuo y el apoyo psicosocial disponible a su alrededor.

1.5.15. VPH

Finalmente, en la revisión realizada se citan ciertos virus como factores que están presentes en el epitelio tumoral de la mama, sin determinar claramente que estos sean factores causales de esta enfermedad. Entre ellos, encontramos al virus del papiloma humano (VPH) (53-60). Ha sido tal la polémica sobre lo que representaría la presencia de infección por VPH en el cáncer de mama que, recientemente, ya se puede leer un meta-análisis donde la mayoría de los artículos concluyen que la presencia de ADN del VPH está presente de manera significativa en las piezas de cáncer mamario y que son necesarios estudios más sólidos que corroboren esta impresión (53,55,60). Este punto se desarrollará en el apartado Justificación.

1.6 Clasificación anatomopatológica del cáncer de mama

La mayor parte de los tumores de mama son de origen epitelial. Estos son un grupo heterogéneo de lesiones que se distinguen por sus características microscópicas y su comportamiento biológico.

La clasificación histopatológica que se utiliza en el cáncer de mama es la de la OMS, 4ª edición, 2012 (4). Es una actualización de la tercera edición que se publicó en 2003, ya que desde entonces ha habido muchos progresos en la patología y biología molecular en el cáncer de mama. Cubre todas las lesiones neoplásicas y preneoplásicas de la mama (cuadro 3). En esta clasificación, se incorporan, junto a la clasificación tumoral tradicional, datos moleculares y genéticos, abarcando no sólo los cánceres infiltrantes, sino también las lesiones precursoras, las lesiones benignas de bajo potencial maligno, las proliferaciones epiteliales, fibroepitelial, mioepiteliales y neoplasias mesenquimales, entre otras.

1.6.1. CARCINOMA INFILTRANTE DE TIPO NO ESPECIAL (NST)

Anteriormente conocido como carcinoma ductal infiltrante o carcinoma no específico (NOS). Este grupo comprende todos los tumores de mama sin las características diferenciadoras específicas que caracterizan las otras categorías de los cánceres de mama. En realidad, la definición del 2012 es similar a la del 2003, la única diferencia es que se ha omitido en el nombre la palabra “ductal”. No obstante se sigue aceptando la anterior terminología aunque se prefiere la actual (61).

Es el más frecuente, supone el 70-80% de todas las neoplasias malignas de la mama (62).

Histológicamente, estos tumores pueden presentar un incremento importante del estroma denso, lo que le da una consistencia dura (carcinoma escirro). Estos tumores suelen presentarse como nódulos duros, irregulares y ocasionalmente bien delimitados, y a la palpación pueden infiltrar estructuras adyacentes como la fijación a la pared costal o retracción de la piel (23). Se dividen en tres grados siguiendo el método más aceptado de Scarf-Bloom y Richardson modificado por Elston-Ellis, que combina la arquitectura, atipia nuclear e índice mitótico, permitiendo su clasificación en bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciado (grado 2) y mal diferenciado (o grado 3) (62).

Cuadro 3: Clasificación anatomopatológica del cáncer de mama, sin incluir microinvasión ni lesiones premalignas) (4,61).

Type	Classification
Invasive carcinoma of no special type (NST)	8500/3
Pleomorphic carcinoma	8522/3
Carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells	8035/3
Carcinoma with choriocarcinomatous features	
Carcinoma with melanotic features	
Invasive lobular carcinoma	8520/3
Classic lobular carcinoma	
Solid lobular carcinoma	
Alveolar lobular carcinoma	
Pleomorphic lobular carcinoma	
Tubulolobular carcinoma	
Mixed lobular carcinoma	
Tubular carcinoma	8211/3
Cribriform carcinoma	8201/3
Mucinous carcinoma	8480/3
Carcinoma with medullary features	
Medullary carcinoma	8510/3
Atypical medullary carcinoma	8513/3
Invasive carcinoma NST with medullary features	8500/3
Carcinoma with apocrine differentiation	
Carcinoma with signet-ring-cell differentiation	
Invasive micropapillary carcinoma	8507/3
Metaplastic carcinoma of no special type	8575/3
Low-grade adenosquamous carcinoma	8570/3
Fibromatosis-like metaplastic carcinoma	8572/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Metaplastic carcinoma with mesenchymal differentiation	
Chondroid differentiation	8571/3
Osseous differentiation	8571/3
Other types of mesenchymal differentiation	8575/3
Mixed metaplastic carcinoma	8575/3
Myoepithelial carcinoma	8982/3
<i>Epithelial-myoepithelial tumors</i>	
Adenomyoepithelioma with carcinoma	8983/3
Adenoid cystic carcinoma	8200/3
<i>Rare types</i>	
Carcinoma with neuroendocrine features	
Neuroendocrine tumor, well-differentiated	8246/3
Neuroendocrine carcinoma poorly differentiated (small cell carcinoma)	8041/3
Carcinoma with neuroendocrine differentiation	8574/3
Secretory carcinoma	8502/3
Invasive papillary carcinoma	8503/3
Acinic cell carcinoma	8550/3
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
Polymorphous carcinoma	8525/3
Oncocytic carcinoma	8290/3
Lipid-rich carcinoma	8314/3
Glycogen-rich clear cell carcinoma	8315/3
Sebaceous carcinoma	8410/3

1.6.2. CARCINOMA INFILTRANTE DE TIPO ESPECIAL

Los subtipos “especiales” más comunes incluyen lobulillar infiltrante, tubular, cribiforme, metaplásico, apocrino, mucinoso, papilar, y el carcinoma micropapilar, así como el carcinoma infiltrante medular, o el neuroendocrino, entre otros. Estos tipos de tumores especiales se definen no sólo por su morfología, sino también están vinculados a una clínica, una epidemiología y unas características moleculares específicas. Algunas características de los más significativos se describen a continuación.

El 76% de los carcinomas lobulillares infiltrantes son habitualmente de grado II. Se acepta que hasta un 15% expresan E-cadherina aberrante (expresión discontinua de membrana) o son focalmente positivos como el subtipo túbulo-lobulillar, por lo que este parámetro debe interpretarse con cautela para diferenciar estos tumores de los carcinomas infiltrantes de tipo no especial (61).

Los carcinomas infiltrantes tubulares y los cribriformes suelen ser de bajo grado y de pronóstico favorable. Los papilares suelen ser luminales. Los carcinomas infiltrantes apocrinos suelen tener receptores de estrógeno y progesterona negativos, sin embargo expresan receptores de andrógenos y ocasionalmente HER2 (*human epidermal growth factor reception 2*).

Los carcinomas infiltrantes medulares se dan en mujeres más jóvenes que la media de edad del cáncer de mama y suelen ser de alto grado. También son más frecuentes en las portadoras de la mutación del gen BRCA 1/2. El pronóstico de estas pacientes es relativamente bueno y se ha atribuido en parte, a la presencia de un infiltrado linfocitario prominente, especialmente linfocitos T reguladores (61).

Por último, los carcinomas infiltrantes metaplásicos, suelen ser escamosos con elementos mesenquimales, de alto grado y típicamente no expresan receptores hormonales, y sí marcadores de células basales (citoqueratinas 5/6, EGFR, c-KIT) siendo de peor pronóstico que otros triple negativos (61,62).

1.6.3. LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER DE MAMA

Por otro lado, la nueva clasificación de la OMS divide el resto de lesiones de la mama en: lesiones precursoras, lesiones intraductales proliferativas y lesiones papilares (cuadro 4). Sólo se comentarán las primeras de ellas. Como lesiones precursoras del cáncer de mama aparece en carcinoma ductal in situ y la neoplasia lobulillar (4).

Cuadro 4: Lesiones precursoras, lesiones intraductales proliferativas y lesiones papilares.

Type	Classification
Precursor lesions	
Ductal carcinoma in situ	8500/2
Lobular neoplasia	
Lobular carcinoma in situ	
Classic lobular carcinoma in situ	8520/2
Pleomorphic lobular carcinoma in situ	8519/2*
Atypical lobular hyperplasia	
Intraductal proliferative lesions	
Usual ductal hyperplasia	
Columnar cell lesions including flat epithelial atypia	
Atypical ductal hyperplasia	
Papillary lesions	
Intraductal papilloma	8503/0
Intraductal papilloma with atypical hyperplasia	8503/0
Intraductal papilloma with ductal carcinoma in situ	8503/2*
Intraductal papilloma with lobular carcinoma in situ	8520/2
Intraductal papillary carcinoma	8503/2
Encapsulated papillary carcinoma	8504/2
Encapsulated papillary carcinoma with invasion	8504/3
Solid papillary carcinoma	
In situ	8509/2
Invasive	8509/3

La neoplasia lobulillar a su vez, se divide en carcinoma lobulillar in situ e hiperplasia lobulillar atípica; no obstante, el CLIS tiene un riesgo significativamente mayor de transformarse en carcinoma infiltrante que la hiperplasia lobulillar atípica.

El carcinoma ductal in situ (CDIS) abarca un grupo heterogéneo de lesiones que se caracterizan por la proliferación de las células epiteliales malignas que no han invadido la membrana basal. Existen varias clasificaciones atendiendo a sus características morfológicas (63). Así, se pueden clasificar según su patrón de crecimiento, su grado nuclear (bajo grado, grado intermedio y alto grado), y la necrosis (presencia o ausencia).

Según su patrón de crecimiento, el CDIS se divide en cinco tipos principales (23,62): comedocarcinoma, cribiforme, micropapilar, papilar y el sólido. Cabe destacar que el tipo comedocarcinoma se caracteriza por la necrosis central del cúmulo celular asociando frecuentemente calcificaciones (mamográficamente son lineales y ramificadas). La actividad mitótica puede ser prominente, y suele asociarse más a menudo con la invasión precoz del estroma (carcinoma microinfiltrante), a la vez que supone un fuerte predictor del riesgo de recidiva en la mama ipsilateral después del tratamiento.

1.7 Estadificación del cáncer de mama

El sistema de estadificación TNM del cáncer de mama es un sistema internacional aceptado que atiende al tamaño el tumor (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M). Permite determinar el estadio de la enfermedad, que es una medida de la extensión de la misma, utilizada para determinar el pronóstico y guiar el manejo (64-66):

1.7.1. TAMAÑO DEL TUMOR (T)

La clasificación del tumor primario T es la misma ya sea clínica (c) o anatomopatológica (p). Se debe además redondear el milímetro al límite más cercano. En general, la medición anatomopatológica debe prevalecer.

Pueden existir múltiples carcinomas ipsilaterales multicéntricos, ya sea en el mismo cuadrante o en diferentes, la T se basará en el más grande, y no la suma, de estos (cuadro 5).

Cuadro 5: Sistema de clasificación T para el cáncer de mama según ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis treatment and follow-up, 2013 (64).

TX	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ (CDIS/CLIS).
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón que NO está relacionada con el carcinoma infiltrante/ in situ en el parénquima mamario subyacente. Los carcinomas infiltrantes relacionados con el Paget se clasifican según el estadio del infiltrante, señalando la existencia de la enfermedad de Paget.
T1	El tumor mide ≤ 20 mm en su mayor dimensión.
T1mi	El tumor mide ≤ 1 mm en su mayor dimensión.
T1a	El tumor mide > 1 mm, pero ≤ 5 mm en su mayor dimensión.
T1b	El tumor mide > 5 mm, pero ≤ 10 mm en su mayor dimensión.
T1c	El tumor mide > 10 mm, pero ≤ 20 mm en su mayor dimensión.
T2	El tumor mide > 20 mm, pero ≤ 50 mm en su mayor dimensión.

Continuación cuadro 5

T3	El tumor mide >50 mm en su mayor dimensión.
T4	El tumor es de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o piel (ulceración o nódulos cutáneos). La invasión de la dermis por sí sola no se califica como T4.
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir adherencia o invasión en músculos pectorales.
T4b	Ulceración y/o nódulos satélites ipsilaterales y/o edema (incluida piel de naranja), pero no criterio de carcinoma inflamatorio.
T4c	Ambos: T4a y T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio: eritema difuso y edema (piel de naranja) incluyendo 1/3 piel de la mama. Con frecuencia existe invasión dermolinfática.

1.7.2. AFECTACIÓN GANGLIONAR (N)

Cuadro 6: Sistema de clasificación Nc y Np para el cáncer de mama según ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis treatment and follow-up, 2013 (64).

Nc(Clínico)	
X	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, extirpación previa).
0	No hay metástasis regional a los ganglios linfáticos.
1	Metástasis ipsilateral niveles I o II.
2	Ganglios axilares afectos/metastásicos (fijos o duros) clínicamente ipsilaterales niveles I o II o ganglios mamarios internos ipsilaterales clínicamente afectos (metástasis) en ausencia de afectación axilar clínicamente manifiesta.
2a	Metástasis ipsilateral niveles I o II en los ganglios linfáticos axilares (fijos).
2b	Ganglios mamarios internos ipsilaterales clínicamente afectos (metástasis) en ausencia de afectación axilar clínicamente manifiesta.
3	Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales (nivel III axilar) con/sin compromiso de los ganglios linfáticos axilares niveles I/II o con o sin afectación ganglios mamaria interna; o afectación ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales internos con afectación axilar niveles I/II.
3a	Metástasis/afectación en ganglios infraclaviculares ipsilaterales.
3b	Metástasis/afectación en ganglios mamaria interna ipsilateral y ganglios axilares.
3c	Metástasis/afectación en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

Continuación cuadro 6

pN (patológica)	
pNx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, por resección previa).
pN0	No se identificó metástasis en los ganglios linfáticos regionales por medios histológicos.
<p>Nota: las células tumorales aisladas (CTA) se definen como pequeños grupos de células $\leq 0,2$ mm, de células tumorales simples o una aglomeración de < 200 células en una sección transversal simple. Las CTA se pueden ubicar mediante pruebas histológicas de rutina o métodos IHQ. Los ganglios que solo contienen CTA se excluyen del recuento total de ganglios positivos para el proceso de clasificación N, pero se deben incluir en el número total de ganglios evaluados.</p>	
pN0(i-)	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales ni histológicamente ni por IHQ.
pN0(i+)	Células malignas ≤ 0.2 mm (detectadas mediante hematoxilina y eosina, o IHQ, incluyendo CTA).
pN0(mol-)	No metástasis ganglionar histológica, o RT-PCR hallazgos moleculares negativos.
pN0(mol+)	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se detectó metástasis en los ganglios linfáticos regionales mediante pruebas histológicas o IHQ.
pN1	Micrometástasis; o Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares, y/o metástasis en ganglios de la mamaria interna con metástasis diagnosticada con ganglio centinela (GC) sin detección clínica.
pN1mi	Micrometástasis ($> 0,2$ mm o > 200 células, pero ninguna > 2 mm).
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, y al menos una > 2 mm.
pN1b	Metástasis en los ganglios de la mamaria interna con micro/macrometástasis detectadas mediante biopsia de GC sin detección clínica o radiológica.
pN1c	Metástasis 1 a 3 ganglios axilares y en ganglios de la mamaria interna con micro/macrometástasis detectadas mediante biopsia de ganglio linfático, pero sin detección clínica o radiológica.
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares; o en los ganglios de la mamaria interna detectados clínica o radiológicamente en ausencia de metástasis en ganglios axilares.
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares (al menos uno > 2 mm).
pN2b	Metástasis en los ganglios de la mamaria interna detectados clínicamente en ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares.

Continuación cuadro 6

pN3 Metástasis en ≥ 10 ganglios linfáticos axilares; o en ganglios de nivel III (infraclaviculares); o afectación en los ganglios linfáticos de la mamaria interna ipsilaterales detectados clínica o radiológicamente en presencia de ≥ 1 ganglio linfático axilar positivo de los niveles I o II; o Metástasis en >3 ganglios axilares y ganglios de la mamaria interna con micro/macrometástasis detectadas mediante biopsia de GC pero sin detección clínica o radiológica; o afectación de los ganglios ipsilaterales supraclaviculares.

pN3a Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares, al menos uno >2 mm; o metástasis en los ganglios infraclaviculares (nivel III).

pN3b Metástasis en ganglios de la mamaria interna detectados clínica o radiológicamente en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o Metástasis en >3 ganglios axilares y en ganglios de la mamaria interna con micro/macrometástasis detectadas mediante biopsia de ganglio centinela, pero sin detección clínica.

pN3c Metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales.

La clasificación que se fundamente en la biopsia selectiva del ganglio centinela se reseña como "sn", por ejemplo pN0(sn).

1.7.3. METÁSTASIS A DISTANCIA (M)

Cuadro 7: Sistema de clasificación M para el cáncer de mama según ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis treatment and follow-up, 2013 (64).

M0 No hay prueba clínica ni radiográfica de metástasis a distancia.

cM0(i+) No hay prueba clínica ni radiográfica de metástasis a distancia, pero sí detección de depósitos de células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares que no son regionales de ≤ 0.2 mm en pacientes sin signos ni síntomas de metástasis.

M1 Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiográficos clásicos o se comprueba por medios histológicos que es $>0,2$ mm.

yc o ypTNM: Esta nomenclatura se utiliza para los casos de terapia neoadyuvante. T y N se clasifican utilizando las mismas categorías que en la estadificación clínica o patológica de la enfermedad, y los resultados se registran con el prefijo apropiado (ycT, ycN, ypT, ypN).

1.7.4. ESTADIFICACIÓN:

Cuadro 8: Estadios tumorales en el cáncer de mama (64).

0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	ANY	N3	M0
IV	ANY	ANY	M1

Si un paciente tiene M1, se considera estadio IV, independientemente de la respuesta neoadyuvante.

T1: incluye T1mi

M0: incluye M0(i+).

1.8 Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama

Actualmente las pautas del tratamiento en el cáncer de mama se basan en las características tumorales o biomarcadores, también llamados factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama (67). El factor pronóstico es capaz de proporcionar información sobre el resultado clínico en el momento del diagnóstico, independientemente de la terapia y por tanto, se asocia con una determinada supervivencia, global o libre de enfermedad, en ausencia de tratamiento adyuvante (68-70). Tales marcadores son generalmente indicadores de crecimiento, invasión y el potencial metastásico, y por lo tanto, reflejan la agresividad inherente del cáncer.

Por otra parte, un factor predictivo es capaz de proporcionar información sobre la probabilidad de respuesta a un tratamiento determinado. Tales marcadores suelen ser la diana terapéutica (69,70).

Aunque existen factores pronóstico y predictivos por separado, es cierto que muchos factores son ambos a la vez, pronóstico y predictivo, por ejemplo, la presencia de la sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico-2 receptor humano (HER2) o los receptores hormonales.

Estos factores cobran especial importancia en los tumores en estadios tempranos, permitiendo ajustar el tratamiento, de tal forma que no se trate en exceso a pacientes que no se beneficiarán del tratamiento adyuvante con quimioterapia, sin dejar escapar aquellos que, de no tratarse, tendrán una recaída (71).

Así, son muchos los factores pronósticos y predictivos potenciales en el cáncer de mama y su número aumenta continuamente. Las aportaciones a este incremento de las “nuevas tecnologías” para el estudio de la biología del tumor y el conocimiento del genoma humano han sido fundamentales. Pese a ello, sólo una pequeña proporción de los marcadores son, en última instancia, de utilidad clínica. A continuación se exponen los más relevantes (cuadro 9).

Cuadro 9: Factores pronóstico y predictivos en el cáncer de mama.

Factores Pronóstico		
Edad	Marcadores tisulares	
Factores tumorales	RE	
Tamaño	RPg	
Estado ganglionar	HER2	
Tipo histológico	Marcadores de proliferación celular	
Grado histológico	Ki67	
Metástasis	p53	
Invasión linfovascular	Otros	
CTC	Subtipos intrínsecos/ Perfil génicos	
Sistemas de evaluación de riesgo		
Factores Predictivos		
Índice de recidiva	RE	HER2

1.8.1. FACTORES PRONÓSTICO

Un marcador pronóstico debe demostrar tres características para ser de uso clínico (69):

- ✚ Validez analítica: Se refiere a los aspectos técnicos de la prueba, incluyendo la precisión, reproducibilidad y la fiabilidad.
- ✚ Validez clínica: es la capacidad de un factor para separar una población de interés en dos o más subgrupos que difieren en los resultados biológicos o clínicos.
- ✚ Utilidad clínica: implica que un factor es útil para el tratamiento del paciente. Un factor demuestra que tiene una utilidad clínica relevante cuando existen diferencias significativas entre usarlo y no usarlo.

Los factores pronóstico los podemos dividir en: edad y raza, factores tumorales, marcadores tisulares, marcadores de proliferación celular, células tumorales circulantes (CTCs), y marcadores de expresión génica (69,71-73).

1.8.1.1. EDAD Y RAZA

Las mujeres menores de 35 años se asocia a peor pronóstico (69,74,75). Sin embargo, existen diferencias en el impacto de la edad entre los subtipos de cáncer de mama. Por ejemplo, para las pacientes que tiene cáncer de mama HER2 positivo, la edad no está asociada con recaída temprana o con supervivencia, ya sea con o sin tratamiento con trastuzumab (76).

En cuanto a la raza, existen disparidades en los resultados. Aunque las mujeres negras tienen una menor incidencia de cáncer de mama en comparación con las mujeres blancas, en los Estados Unidos su mortalidad es mayor. Además, algunos estudios señalan que las mujeres afroamericanas son más frecuentemente diagnosticadas del subtipo basal (30).

1.8.1.2. FACTORES TUMORALES

I. TAMAÑO TUMORAL

El tamaño tumoral (mayor diámetro del tumor primario) es un potente factor pronóstico del comportamiento de esta enfermedad (69), teniendo una relación lineal (74,75). Además, se correlaciona con la afectación ganglionar, pero el valor pronóstico de los dos factores es independiente. En los tumores triple negativo, la correlación del tamaño del tumor con el estatus ganglionar y con el pronóstico es mucho más débil (77). En una cohorte de 24.740 pacientes en el estudio *Surveillance Epidemiology and End Research (SEER)* (78), las tasas de supervivencia de cáncer de mama a 5 años oscilaron entre el 91% para T <2 cm, al 80% para T 2-5 cm y 63% para T > 5 cm.

II. AFECTACIÓN GANGLIONAR

La afectación axilar y el número de ganglios axilares metastatizados es uno de los principales factores pronósticos. Durante años, la presencia o no de afectación axilar ha sido el punto de separación entre administrar un tratamiento más agresivo o no, dado que es un factor muy importante a la hora de predecir la supervivencia global y libre de enfermedad (79). Sin embargo, hoy en día, teniendo por supuesto en cuenta la afectación ganglionar, es también el perfil biológico el que determina qué tipo de tratamiento sistémico se debe administrar (69,70).

El significado de la extensión periganglionar en la axila es controvertido. Recientes estudios no detectan una repercusión negativa en el pronóstico cuando se trata de micrometástasis o células tumorales aisladas (69).

III. TIPO HISTOLÓGICO

En general, el subtipo histológico del cáncer de mama infiltrante no es vital desde el punto de vista pronóstico, si bien es cierto que algunos tipos especiales de adenocarcinomas infiltrantes aparecen asociados a un riesgo muy bajo de recidiva: carcinoma tubular, cribiforme o el mucinoso. En la mayoría de las series, estos tumores se asocian a características favorables tales como bajo grado histológico o negatividad axilar. En cambio, el metaplásico se asocia a mal

pronóstico, no estando absolutamente claro que estos subtipos histológicos sean indicadores independientes de un curso favorable (4,74).

IV. GRADO HISTOLÓGICO

El grado histológico también es reconocido como un factor pronóstico clásico. Su uso como un indicador de la agresividad tumoral ha ganado aceptación progresivamente, al tiempo que han estado disponibles técnicas específicas y consistentes para su determinación con resultados reproducibles.

Se mide con el sistema de gradación Nottingham (llamado también modificación de Scarff-Bloom-Richardson) que caracteriza el grado de diferenciación del tumor por el porcentaje de formación de túbulos, pleomorfismo nuclear, y la actividad mitótica (65). A cada una de las categorías se asigna una puntuación del 1 al 3; una puntuación de "1" significa que las células y el tejido del tumor se parecen más a las células y el tejido normales, y con una puntuación de "3" se verían la mayoría anormales. Las puntuaciones para las tres categorías se suman dando un resultado del 3 al 9. Hay tres grados posibles: grado I (puntuación total de 3 a 5, grado bajo o bien diferenciado), grado II (puntuación total de 6 a 7, grado intermedio o moderadamente diferenciado), grado III (puntuación total de 8 a 9, grado alto o mal diferenciado).

Existen ciertas limitaciones pronósticas cuando se caracteriza a un tumor grado II, probablemente, porque se componen de una mezcla de los tumores biológicamente bajo y alto grado (69).

V. METÁSTASIS

La presencia de enfermedad metastásica es un factor de mal pronóstico (69).

Lógicamente, el estadio engloba el tamaño, la afectación axilar y las metástasis a distancia por lo que las tres variables juntas pronostican la supervivencia. Así, la supervivencia a 5 años es (80) (tabla 1):

Tabla 1: Porcentaje de supervivencia a 5 años en función del estadio (80).

Estadio	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
Supervivencia (%)	95%	85%	70%	52%	48%	18%

VI. INVASIÓN LINFOVASCULAR PERITUMORAL

La presencia de invasión linfovascular parece ser un indicador de mal pronóstico, especialmente en los tumores de alto grado, a los que frecuentemente se asocia (69). Su mayor utilidad reside en los tumores con ganglios negativos, en donde si existe invasión linfovascular empeora el pronóstico.

1.8.1.3. MARCADORES TISULARES

I. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA

Los receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RPg) son proteínas de membrana nuclear implicadas en rutas de señalización intracelular. Son reguladores esteroideos bien conocidos que modulan, entre otros aspectos, el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células epiteliales mamarias. Además de ser de gran importancia en los tumores en mujeres en edad reproductiva, la aromatización local de los andrógenos adrenales provee estrógenos adicionales tras la menopausia. Los estrógenos y progesterona actúan a través de sus receptores nucleares respectivos para regular la transcripción de los genes diana (81).

La sobreexpresión de los RE es un factor pronóstico pero también predictivo ya que determinará si son candidatas a recibir tratamiento hormonal. Generalmente, los tumores RE-positivos se asocian con crecimiento tumoral lento y de bajo grado histológico y por lo tanto, con mejor pronóstico (69). Los tumores RE positivos suelen ser histológicamente bien diferenciados, y muy frecuentemente son HER2, p53 y EGFR negativos (82).

Más del 90% de los tumores lobulillares son RE-positivos; mientras que el carcinoma inflamatorio y el medular son predominantemente RE-negativos. Los tumores hormonales negativos generalmente se asocian a enfermedad agresiva siendo su índice de recidiva mayor a cinco años que los receptores hormonales positivos (69).

Las metástasis de los tumores RE positivos suelen ser en hueso, tejidos blandos u ovarios. En cambio, los tumores con receptores hormonales negativos suelen metastatizar en cerebro o hígado (82).

La supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, el tiempo hasta el fracaso del tratamiento, la respuesta a la terapia endocrina, y el tiempo hasta la recidiva se asociaron positivamente con los niveles de RE.

Por último, los receptores de progesterona parecen ser un factor pronóstico independiente; su ausencia implica un mal pronóstico (83). Esto se demostró en un estudio de cohortes de base poblacional grande que incluyó a más de 1.000 mujeres con cáncer de mama inicial, cuyo tratamiento inicial fue la cirugía. Tras ésta, se dio quimioterapia (29% de los casos) y tratamiento hormonal (80,5% de los casos). En el análisis multivariante se vio que el RPg es un factor predictivo independiente de supervivencia libre de enfermedad (OR 1,94; IC del 95% 1,32 a 2,85) y de supervivencia (OR 2,12; IC del 95%: 1,34 a 3,38). Estos datos son compatibles con el hallazgo de que las pacientes que, teniendo RE positivo, pero RPg negativos, tienen un subtipo más agresivo de cáncer de mama que aquellos que tienen RPg positivos; este subgrupo se denomina luminal B (84) como se verá más adelante.

II. HER 2

También conocido como *c-erbB-2* o *neu*, es un protooncogén que codifica una proteína transmembrana con dominio intracelular tirosinquinasa que pertenece a la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se sobreexpresa en aproximadamente el 15-20% de los cánceres de mama. La amplificación y/o sobreexpresión del HER2, en ausencia de terapia antiHER2, se asocia a menor tiempo libre de enfermedad en pacientes tanto con ganglios positivos como negativos (69,85).

La sobreexpresión de HER2 es un factor pronóstico negativo pero a la vez, es factor predictivo positivo por la respuesta a los tratamientos anti-HER2 disponibles actualmente (Trastuzumab, Lapatinib, Pertuzumab, T-DM1). Mención especial merece Trastuzumab, anticuerpo monoclonal humanizado, indicado tanto en adyuvancia como en neoadyuvancia y enfermedad avanzada) que, combinado con la quimioterapia, ha cambiado el pronóstico de las pacientes tanto en estadios iniciales como en avanzados. Los demás fármacos se sitúan de momento en el escenario de las pacientes con enfermedad metastásica HER2+ y han contribuido a la obtención progresiva de mayores supervivencias (86-90).

1.8.1.4. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El índice de proliferación celular en el cáncer de mama parece ser pronóstico. Y aunque hay una variedad de métodos amplios para evaluar éste, el método más estudiado es llevar a cabo la inmunohistoquímica del antígeno nuclear Ki-67.

I. Ki-67

El Ki-67 es una forma de medir la proliferación celular del tumor utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Es una proteína que ha demostrado tener un papel importante en la regulación del ciclo celular, ausente en las células estacionadas o sin replicación (fase G0), y que alcanza niveles máximos de expresión durante la mitosis. El gen del Ki-67 está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10. En el cáncer de mama, la mayoría de los estudios muestran una fuerte correlación estadísticamente significativa con la supervivencia (71,73,91).

Actualmente está claro el valor del Ki-67 como factor predictivo ya que altos niveles de Ki-67 predicen una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia (92). En cuanto a su papel como factor pronóstico, altos niveles de Ki-67 se asocian a mayor probabilidad de recaída en cáncer en estadios tempranos, independientemente de la afectación axilar (91). Pese a todo ello, y aunque los valores extremos están claros, aún no se ha establecido un punto de corte óptimo (92). De hecho, en el Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen de 2013 (93) y posteriormente el del 2015 (92), se incluye el nivel de expresión de Ki-67 como marcador fenotípico para diferenciar entre los subtipos moleculares del cáncer de mama como se expondrá en el siguiente apartado. Para la extensión de su aplicación rutinaria a nivel universal, es indispensable la determinación sistemática de la expresión del Ki-67, con normas unificadas para su obtención en laboratorio e interpretación (71).

II. p53

Las mutaciones en el gen supresor de tumores p53 (*TP53*) se encuentran en el 20-30% de los cánceres de mama. Este gen tiene un rol fundamental en la regulación del ciclo celular. La proteína p53 actúa como un freno para el crecimiento celular en las células que han sufrido un daño en el ADN ("es el guardián del genoma"). Una expresión elevada de p53 (determinada por IHQ) se asocia a peor pronóstico en tumores de mama sin afectación axilar que no han recibido tratamiento adyuvante (69,85).

III. Otros

Se han propuesto muchos otros marcadores de invasión y potencial metastásico. Algunos de ellos son: el activador del plasminógeno, la E-cadherina, las catepsina-D, los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, el antígeno prostático específico, la osteopontina, etc... Todos ellos sin una clara validez clínica.

Por otro lado, los linfocitos tumorales infiltrantes (TILs o tumour-infiltrating lymphocytes) no han sido de momento aceptados como factor pronóstico o predictivo. Aunque se encuentran con más frecuencia en tumores triple negativo y HER2-positivo (92).

1.8.1.5. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

La circulación de las células tumorales en el torrente sanguíneo y su identificación en la médula ósea se puede detectar precozmente y se cree que son un indicador temprano de diseminación del tumor (69). Varios estudios han demostrado que entre los pacientes con cáncer de mama en estadio precoz, la presencia de células tumorales en la médula ósea (células tumorales diseminadas) y sangre periférica (células tumorales circulantes) coloca a las pacientes en mayor riesgo de recaída y menor supervivencia (69,94). No obstante, en algunos estudios, la presencia de micrometástasis de médula ósea estaba vinculada a otras características de mal pronóstico como el tamaño del tumor, grado y estado ganglionar, por lo que no era un factor independiente en el análisis multivariante.

Así, las recomendaciones de expertos no apoyan la idea de utilizar este marcador como factor pronóstico ya que se necesitan más estudios (69).

1.8.1.6. PERFILES GENÉTICOS. CLASIFICACIÓN MOLECULAR. GRUPOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

La heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama y el gran número de genes implicados en el control del crecimiento, diferenciación celular y en la apoptosis hacen necesario estudiar las posibles alteraciones genéticas. Así, el avance en la caracterización molecular del cáncer de mama ha sido posible gracias al desarrollo, desde finales del pasado siglo, de sofisticadas tecnologías como los *microarrays* de expresión génica que permiten analizar simultáneamente la expresión de miles de genes para crear un “retrato” molecular del tumor (95). Este tipo de evaluación génica ofrece una caracterización más precisa de la biología tumoral que permite, por un lado pronosticar y por otro predecir con mayor precisión el comportamiento clínico del cáncer de mama y por tanto, su respuesta al tratamiento.

Los estudios pioneros prácticamente paralelos de dos grupos, uno estadounidense (Perou y Sorlie)(96,97) y otro holandés (Van't Veer y cols.) (98) han permitido cambiar radicalmente el tratamiento del cáncer de mama ya que con estas tecnologías se ha establecido una nueva clasificación atendiendo al perfil génico de cada tumor (69,73,99). Se identifican cinco subtipos

principales de cáncer de mama (96,97): basal-like, HER2 puro (sobreexpresión HER2), luminal A, luminal B, y similar a la mama normal (figura 11).

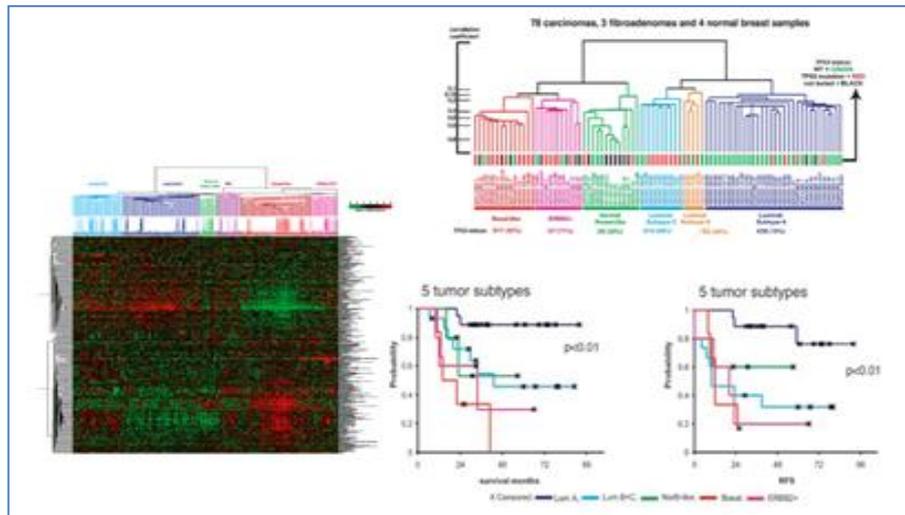


Figura 11: Variantes moleculares del cáncer de mama. Perou y Sorlie (96,97).

Como los estudios genómicos siguen evolucionando, es de esperar que surjan nuevos subgrupos. De hecho, recientemente, se han descrito nuevos grupos moleculares de cánceres RE negativos, como el subtipo “*Claudin-low*”, con propiedades biológicas similares a las de las células madre neoplásicas; el grupo “molecular apocrino”, que algunos expertos reconocen como un grupo similar al subtipo HER2 y el subtipo “interferón” que se caracteriza por la sobreexpresión de genes regulados por el interferón, como *STAT1* (cuadro 10).

Cuadro 10: Clasificación molecular del cáncer de mama (95).

Subtipo Molecular	Frecuencia	RE/RPg HER2	CKS/6 EGFR	Genes de Proliferación	Genes Característicos	Grado Histológico	Mutaciones de TP53	Pronóstico
Basal-like	8-20%	RE- RPg- HER2-	+	Alto	<i>KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2</i>	Alto	Alto	Malo
HER2-enriched	10-15%	RE- RPg- HER2+	+/-	Alto	<i>ERBB2, GRB7</i>	Alto	Alto	Malo
Normal breast-like	6-10%	RE-/+ HER2-	+	Bajo	<i>PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7</i>	Bajo	Bajo	Inter medio
Luminal A	55-60%	RE+ RPg+ HER2-	-	Bajo	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1</i>	Bajo	Bajo	Excelente
Luminal B	10-15%	RE+/- RPg+/- HER2-/+	-	Alto	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SOLE, LAPTM4B</i>	Intermedio/ Alto	Intermedio	Intermedio/ Malo
Claudin-low	5%	RE- RPg- HER2-	+/-	Alto	<i>CD44, SNAI3</i>	Alto	Alto	Malo

Llegados a este punto, es importante señalar que existe un importante solapamiento entre los subtipos moleculares y los grupos establecidos mediante inmunohistoquímica, por lo que muchas veces hablamos de ellos pasando de una a la otra clasificación. Pero conviene no confundir ambas terminologías; por ejemplo, un tumor triple-negativo no es lo mismo que un tumor *basal-like*. Dentro de los tumores triple negativos está el subgrupo *basal-like*, que representa el 70% de los triple negativos.

Hasta la fecha, el diagnóstico de los subtipos moleculares no ha podido aprovecharse desde el punto de vista terapéutico. En este sentido, las decisiones siguen tomándose en virtud de los factores clásicos: tamaño tumoral, estado de los ganglios axilares, expresión de receptores hormonales y sobreexpresión de HER2 y Ki-67. Por tanto, un tumor positivo para HER2 por inmunohistoquímica o por FISH será tratado con quimioterapia y tratamiento anti-HER2, independientemente del subtipo molecular al que pertenezca (74).

A continuación se describen las características más importantes de los principales subtipos moleculares:

1.8.1.6.1. SUBTIPOS LUMINALES

El nombre "luminal" se deriva de la similitud inmunofenotípica en la expresión de genes entre estos tumores y el epitelio luminal de la mama. Por lo general, expresan citoqueratinas (CK) luminales 8 y 18. Habitualmente son de bajo grado histológico y tienen mutación de p53 en menos del 20% (99,100). Estos son los subtipos más frecuentes, constituyendo la mayoría de los cánceres de mama RE positivos. A pesar de esto, los subtipos luminal A y luminal B tienen algunas distinciones moleculares y pronósticas de gran importancia (69,99).

Los tumores luminal A, que probablemente representan alrededor del 60% (30,99) de todos los cánceres de mama, por lo general tienen una alta expresión de genes relacionados con RE y RPg, baja expresión de HER2, y baja expresión de genes relacionados con la proliferación. Son los que tienen mejor pronóstico (69,97).

Los tumores luminales B suponen aproximadamente el 20%. Presentan niveles menores de receptores de estrógeno y altos niveles de genes de proliferación como MTK67 y Ciclina D1 (luminales *B-like*) (95); además un subgrupo pueden tener sobreexpresión HER2 (luminal *B-like*/HER2 positivo). Tienen peor pronóstico que los tumores luminales A (69,99) y se caracterizan por obtener menos tasas de respuesta a los tratamientos hormonales (Tamoxifeno, Inhibidores de la aromatasa y Fulvestrant). Cabe mencionar de forma especial en este escenario los nuevos

fármacos que han aparecido en los últimos años, que asociándolos a tratamientos hormonales son capaces de revertir la hormonorresistencia adquirida por los tumores luminales, como son el Everolimus y el Palbociclib (101,102).

En el consenso de Sant Gallen de 2013 (93), se utiliza los RPg y el Ki-67, como marcadores diferenciales entre los subtipos luminales: el Luminal A presenta un Ki-67 bajo o menor del 14%, mientras que el Luminal B presenta valores de Ki-67 altos $\geq 14\%$ (figura 12). No obstante, tanto en Sant Gallen 2013 como en 2015, se reconoce que hasta ahora siguen existiendo dificultades para establecer el punto de corte del Ki-67, teniendo claro que niveles de $Ki-67 > 30\%$ son altos y niveles $Ki-67 < 10\%$ son bajos (92,93) (cuadro 11).

Luminal A	RE +, HER2 -, RPg $\geq 20\%$, Ki67 < 14%
Luminal B HER 2-	RE +, HER2 - y: RPg < 20% ó Ki67 $\geq 14\%$
Luminal B HER 2+	RE +, HER2 +, Cualquier Ki67, Cualquier RPg
HER2	RE - /RPg -, HER2 +
Basal like (triple negativo)	RE - /RPg -, HER2 -

Figura 12: Características de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, St. Gallen 2013 (93)

De hecho, existen autores como Maisonneuve et al (103) (cuadro 12) que proponen una clasificación diferente a la de St. Gallen de 2013 (93) (figura 12), más cercana a la realidad clínica. En este estudio, realizado en el Instituto Europeo de Oncología (IEO), se reclutaron 9.415 mujeres operadas entre entre los años 1994 y 2006, por carcinoma de mama RE positivo/HER2 negativo en estadios iniciales, una mediana de seguimiento de 8,1 años. Se evaluó la supervivencia libre de enfermedad a distancia de pacientes con Ki-67 "bajo" (<14%), "intermedio" (14% a 19%) o "alto" ($\geq 20\%$) y se estratificó la expresión de los RPg (negativa o baja versus alta a partir del 20%). Los resultados fueron que los $RPg < 20\%$ se asociaron con peores resultados sólo para pacientes con un Ki-67 intermedio ($p < 0,001$). Los 4.890 pacientes (51,9%), con bajo nivel de Ki-67 (cualquier nivel de expresión RPg) o con Ki-67 intermedio y RPg elevados habían tenido comparativamente

buenos resultados y por lo tanto, esta clasificación parece más ventajosa al representar más la realidad clínica.

Cuadro 11: Clasificación según subgrupos de cáncer de mama orientada al tratamiento, St. Gallen 2015 (92).

Clinical grouping	Notes
Triple negative	Negative ER, PgR and HER2
Hormone receptor-negative & HER2-positive	ASCO/CAP guidelines
Hormone receptor-positive & HER2-positive	ASCO/CAP guidelines
Hormone receptor-positive & HER2-negative – luminal disease as a spectrum	ER and/or PgR positive $\geq 1\%$ ¹
<ul style="list-style-type: none"> high receptor, low proliferation, low tumour burden (“luminal A-like”) 	Multi-parameter molecular marker “favourable prognosis” if available. High ER/PgR and clearly low Ki-67 ² . Low or absent nodal involvement (N 0-3), smaller T size (T1 T2)
<ul style="list-style-type: none"> intermediate 	Multi-parameter molecular marker “intermediate” if available ² . Uncertainty persists about degree of risk and responsiveness to endocrine and cytotoxic therapies.
<ul style="list-style-type: none"> low receptor, high proliferation, high tumour burden (“luminal B-like”) 	Multi-parameter molecular marker “unfavourable prognosis” if available. Lower ER/PgR with clearly high Ki-67 ³ . More extensive nodal involvement, histological grade 3, extensive lymphovascular invasion, larger T size (T3)

¹ER values between 1% and 9% were considered equivocal. Thus endocrine therapy alone cannot be relied upon for patients with these values.

²Not all multi-parameter molecular marker tests report an intermediate score.

³Ki-67 scores should be interpreted in the light of local laboratory values: as an example, if a laboratory has a median Ki-67 score in receptor-positive disease of 20%, values of 30% or above could be considered clearly high; those of 10% or less clearly low.

Esta clasificación la recoge en su bibliografía el Consenso de St. Gallen 2015 (92); sin embargo, no establece claramente punto de corte para Ki-67, dejando de nuevo una “laguna” abstracta para los luminales con valores del Ki-67 intermedios (Cuadro 11).

Cuadro 12: Propuesta de clasificación para subtipo receptores hormonales positivo, HER2 negativo, Maisonneuve et al, 2014 (103).

Intrinsic subtypes	Clinicopathological surrogate definitions
Luminal A	<p>"Luminal A-like"</p> <p><i>All of:</i></p> <p>ER-positive</p> <p>HER2-negative</p> <p><i>And at least one of:</i></p> <p>Ki-67 low expression (<14%)</p> <p>Ki-67 intermediate expression (14% to 19%) and PgR high expression (≥20%)</p>
Luminal B (HER2-negative)	<p>"Luminal B-like (HER2-negative)"</p> <p><i>All of:</i></p> <p>ER-positive</p> <p>HER2-negative</p> <p><i>And at least one of:</i></p> <p>Ki-67 intermediate expression (14% to 19%) and PgR negative or low expression (<20%)</p> <p>Ki-67 high expression (≥20%)</p>

^aER, Estrogen receptor; HER2, Human epidermal growth factor receptor 2; PgR, Progesterone receptor.

1.8.1.6.2. SUBTIPO SOBREEXPRESIÓN HER2

Representa aproximadamente el 10-15% de los cánceres de mama y se caracteriza por la sobreexpresión y/o amplificación del HER2 (genes localizados en el cromosoma 17q). El HER2 es un protooncogén que cuando está sobreexpresado y/o amplificado, se asocia a mal pronóstico ya que suelen tener alto grado histológico (75% de los casos), baja expresión de RE y RPg, y mala respuesta a la quimioterapia. Igualmente suelen ser altamente proliferativos y más del 40% tienen mutaciones de *TP53*. Por último, se asocian frecuentemente a carcinoma ductal in situ (69,95). Sin embargo, no se ha encontrado asociación entre este subtipo y la raza, la edad o cualquier otro factor de riesgo (30).

La existencia HER2 positivo no es sinónimo de pertenecer a este grupo, ya que como se ha explicado anteriormente, un subgrupo de luminales B pueden ser HER2 positivos (69,100).

Los tratamientos basados en el anticuerpo monoclonal recombinante (Trastuzumab/ Herceptin®) producen una mejoría significativa en las pacientes. Este hecho, ha implicado un cambio radical en el pronóstico de la historia natural de este grupo (95). La amplificación de HER2 y la sobreexpresión de su proteína HER2/neu puede ser evaluada con precisión mediante FISH o

inmunohistoquímica. Los nuevos protocolos definen como negativo la tinción 0 ó 1+ y positivo 3+, requiriendo confirmación de la amplificación por FISH a los casos 2+ (equivocos) (99).

1.8.1.6.3. SUBTIPO BASAL-LIKE

En este perfil genómico se incluyen varios subtipos, como el Claudina baja, o el que sobreexpresa interferón, entre otros. La mayoría de ellos entran en la categoría de los cánceres de mama triple negativo (aproximadamente el 70%), ya que también son RE, RPg y HER2 negativos (69). Constituyen alrededor del 15-20% de los cánceres de mama y alrededor de un tercio de los tumores RE-negativos (95). Suelen presentarse en la premenopausia y en raza afroamericana (30).

El subtipo de tipo basal es llamado así debido a cierta similitud en la expresión génica a la de las células epiteliales basales de tejido mamario normal. Existen células luminales normales que expresan CK 5/6 las cuales actúan como células madre. Estas células, bajo transformación maligna, originan el fenotipo basal del cáncer de mama (100). El perfil inmunohistoquímico característico conocido como Core-Basal se caracteriza por 5 marcadores: ausencia de expresión de RE, RPg, HER2, y por la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, también llamado HER1), y/o CK 5/6. Además, suelen tener un alto índice de proliferación con Ki-67, presenta mutaciones en el gen oncosupresor *TP53* y suelen tener un alto grado histológico (95,104). Por esta razón, estos tumores son típicamente llamados “triple negativo”. Sin embargo, triple negativo no es sinónimo de basal-like, ya que existe un 9% de los tumores basal-like que expresan receptores hormonales y un 10% sobreexpresa HER2 (95).

El 80% de las mujeres que nacen con mutaciones de inicio temprano en *BRCA1* desarrollan el subtipo basal, aunque estos casos corresponden a un pequeño porcentaje del total de estos tumores, ya que la mayoría son esporádicos (99,100).

Pese a que son quimiosensibles, y tener una menor afección ganglionar según el tamaño tumoral en comparación con los otros subtipos, son los de peor pronóstico ya que se trata del subtipo más agresivo (95,99,100).

1.8.1.6.4. CÁNCER DE MAMA SIMILAR A LA MAMA NORMAL (*NORMAL-LIKE*)

Suponen un 6-10% de todos los cánceres de mama y están mal caracterizados. En el estudio inmunohistoquímico son definidos como triple negativos, pero también son negativos a CK5/6 y a EGFR. Éste es un claro ejemplo de que no todos los triple negativo son basal-like. Su pronóstico es ligeramente mejor aunque no suelen responder a la quimioterapia neoadyuvante. El significado clínico está aún por determinar (95).

1.8.1.6.5. CLAUDINA BAJA

Este subtipo se encuentra próximo al subtipo basal-like ya que ambos comparten algunas características de expresión génica como una baja expresión de HER2 y del grupo de luminales (RE, GATA3, CK8/18). Además, suelen ser triple negativos. Lo que caracteriza a este grupo es una baja expresión de los genes relacionados con las uniones estrechas y la adhesión intercelular (claudin-3, -4, -7, E-cadherina) y una elevada expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune y de la matriz extracelular. Estos tumores son poco proliferativos.

Son tumores poco frecuentes (12-14%) y la mayoría suelen ser ductales infiltrantes con diferenciación metaplásica y medular. Clínicamente se caracterizan por su mal pronóstico (95).

1.8.1.7. SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE RIESGO DE RECIDIVA

Las plataformas génicas tienen la capacidad de medir simultáneamente la expresión de miles de genes, permitiendo el desarrollo de diferentes perfiles moleculares pronóstico que nos ayudan en la práctica clínica. Estos perfiles han sido validados, pero no sustituyen los factores clínicos clásicos, sino que los complementa para ayudar en la toma de decisiones clínicas (69,93). Lógicamente, cuando los tumores son grandes o existen metástasis en varios ganglios axilares o no expresan receptores, no cabe duda la necesidad de quimioterapia. Las dudas acerca de la necesidad de administrar quimioterapia surgen en aquellos tumores pequeños, con receptores hormonales positivos y ganglios negativos. Es aquí donde los perfiles génicos pronósticos nos pueden ayudar en la toma de decisión.

Los test genómicos (perfiles moleculares) pronósticos más utilizados son: OncotypeDX[®], Mammaprint[®] y el PAM50[®]. A continuación se describe brevemente cada uno de ellos:

8.1.7.1. OncotypeDX[®]:

Este test cuantifica la expresión de 21 genes (de un *screening* inicial de 250 genes) asociados al cáncer de mama, fundamentalmente de proliferación celular (95). Esta puntuación de recidiva (o *recurrence score*, RS) varía entre 0-100 y se divide en tres grupos de riesgo: bajo (≤ 18), intermedio (18-30), y alto riesgo de recidiva (≥ 31). Así, proporciona información pronóstica del riesgo a 10 años de recidiva a distancia. Y tiene valor predictivo del posible beneficio de la quimioterapia tras 5 años de tratamiento con tamoxifeno para pacientes con cáncer de mama, receptores de estrógeno positivo y HER2 negativo, sin afectación ganglionar o con 1-3 ganglios positivos, ya sea pre o postmenopáusica (69,85). La supervivencia libre de eventos a 3 años para las pacientes con resultado $RS \leq 11$ que no recibieron quimioterapia es del 98% (85). Se está

evaluando el beneficio potencial de la quimioterapia en dos estudios prospectivos: TAILORx (pacientes sin afectación ganglionar) y RxPONDER (pacientes con afectación axilar) (105,106).

8.1.7.2. MammaPrint®:

Es una firma de 70 genes (realizado en Amsterdam), relacionados con la regulación de la proliferación, invasión, metástasis, integridad del estroma y angiogénesis (107). A pesar de que fue aprobada originalmente para su uso con el tejido en fresco, actualmente se puede utilizar también con parafina. Este análisis calcula una puntuación que estratifica las pacientes como de mal o buen pronóstico (69). En el grupo de bajo riesgo las pacientes tienen un riesgo de recaída a distancia inferior al 10%, a pesar de no recibir quimioterapia adyuvante, con lo cual se admite que pueden prescindir de dicho tratamiento. Este instrumento ha sido validado de forma retrospectiva en diferentes poblaciones de pacientes con y sin afectación ganglionar, y se ha utilizado en un estudio aleatorizado prospectivo conocido como MINDACT (Microarray In Node-Negative Disease may Avoid Chemotherapy) (108).

8.1.7.3. PAM50-base Prosigna®:

Es una prueba de 50 genes que se caracteriza porque fue diseñado para determinar el subtipo intrínseco de cáncer de mama y calcular así el riesgo de recidiva. Los resultados de PAM50 se utilizan para generar el riesgo de recidiva a los 5 años que puede estratificar a los pacientes con enfermedad RE+ en riesgo de recidiva alto, medio y bajo. El ROR (así llamado el riesgo de recidiva) fue significativamente pronóstico entre los pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos (69).

En el último consenso de Sant Gallen 2015 (92) se consideraron semejantes en resultados a 5 años las tres plataformas anteriormente comentadas; sin embargo, más allá de 5 años, PAM50 fue la que demostró mayor nivel pronóstico.

1.8.2. FACTORES PREDICTIVOS

Como ya se ha explicado anteriormente, muchos factores pronóstico son a su vez predictivos. Los únicos marcadores predictivos bien establecidos en el cáncer de mama no metastásico son el estatus de los receptores hormonales, HER2 y el índice de recidiva.

1.8.2.1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS COMO PREDICTORES DE RESPUESTA A LA TERAPIA ENDOCRINA

Además de su papel como marcador pronóstico, la expresión de RE, predice las pacientes que se beneficiarán de la terapia endocrina. No parece que los RPg tengan un valor predictivo independiente (69,82).

El valor predictivo de los receptores de estrógenos se demuestra claramente por el Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG), en un meta-análisis de 20 ensayos (con una n=21.457) sobre el tamoxifeno en terapia adyuvante (109). En pacientes con RE, el tamoxifeno reduce significativamente el riesgo de recidiva en un 39% y disminuye la mortalidad en un 30% en 15 años de seguimiento. Este beneficio fue independiente del RPg, la edad, el estado ganglionar o el uso de la quimioterapia adyuvante. En contraste, el tamoxifeno no tuvo impacto en las tasas de recaída o de supervivencia entre los pacientes con cáncer de mama RE-negativos.

1.8.2.2. HER2 COMO PREDICTOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB

Tras la presentación del Trastuzumab, y demás terapia antiHER2, HER2 se utiliza principalmente como factor predictor, identificando así a las pacientes que podrían beneficiarse de estos tratamientos, tanto en el cáncer localizado como en la enfermedad metastásica (69).

1.8.2.3. ÍNDICE DE RECIDIVA COMO PREDICTOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA

Múltiples estudios sugieren que un alto índice de recidiva (*Recurrence Score* o RS) predice aquellas pacientes que se beneficiarán de la quimioterapia en el contexto de un cáncer de mama ya sea con afectación axilar o sin ella (69). La capacidad predictiva del RS dio lugar a su incorporación en el algoritmo de toma de decisiones para el tratamiento adyuvante en el cáncer de mama con RE positivos sin afectación axilar, como lo sugiere la ASCO (110), la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guías de Práctica Clínica para el cáncer de mama (111) y el Consenso Internacional de Expertos St. Gallen (92,93).

Adjuvant! Online es una herramienta que sirve de apoyo en la toma de decisiones para el cáncer de mama inicial. A través de su página web, se introducen los datos característicos del tumor y la paciente, se obtiene un riesgo de recidiva y mortalidad a 10 años (112). Otro índice similar es el Nottingham, del que su reciente actualización NPI+ distingue entre siete tipos moleculares en función de 10 biomarcadores (74,113).

1.9 Tratamiento

El tratamiento del cáncer de mama ha experimentado un cambio radical en el último siglo. Así, se sabe que es una enfermedad sistémica y como tal requiere un tratamiento sistémico y locoregional.

El tratamiento locoregional del cáncer de mama ha ido disminuyendo de forma progresiva en extensión y agresividad, de tal forma que hoy en día no es tolerable la realización de una mastectomía tipo Halsted (que incluía la extirpación de la mama, y la piel que la recubre, ambos músculos pectorales y todo el componente linfograso axilar). Esta afirmación también incluye el abordaje de la axila, sobre todo desde la introducción del concepto de biopsia selectiva del ganglio centinela, y del desarrollo de los tratamientos complementarios como la radioterapia, la quimioterapia y las terapias biológicas.

Dado que el tratamiento del cáncer de mama no es el objetivo del presente trabajo, se expondrá brevemente este apartado.

Con todo, la cirugía es el tratamiento fundamental para el control locoregional de la enfermedad. El ensayo NSABP B042 (114) demostró, con 25 años de seguimiento que, en pacientes con ganglios negativos, no había diferencias en supervivencia libre de enfermedad entre mastectomía radical, mastectomía simple con irradiación axilar, o mastectomía simple, lo que hacía innecesaria la mastectomía radical. Ensayos posteriores (Milan I con Veronesi (115), NSABP B06 (116), Fisher (117) y otros) compararon la mastectomía radical modificada con la tumorectomía +/- irradiación. Ambas modalidades de tratamiento tienen tasas de supervivencia equivalentes.

El último Consenso de Sant Gallen 2015 (14ªed) (92) aboga aún más si cabe por cirugías más conservadoras, y apoya firmemente que el margen quirúrgico mínimo aceptable es el que no esté en contacto con la tinta, tanto en in situ como en infiltrantes. Esta conclusión se aplica independientemente de las características del tumor (histología lobulillar, componente intraductal extenso, multifocalidad o multicentricidad, o subtipo biológico desfavorable) o de la edad de la mujer.

Por otro lado, en la década de los 90, el desarrollo de la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) dio lugar al concepto de cirugía conservadora de la axila. La BSGC se ha convertido en el método más sensible de estadificación axilar cuando no existen ganglios

patológicos clínicos o radiológicos (N0), con el mismo riesgo de recaída regional que cuando se realiza una linfadenectomía y con menor morbilidad (118).

En las pacientes con afectación del GC la recomendación ha continuado siendo la realización de la linfadenectomía axilar hasta hace unos años. El punto de inflexión lo estableció el grupo de Giuliano en 2011 con el estudio ACOSOG Z0011 (119), que aunque controvertido, abrió un debate aún no cerrado en torno a este tema. En este trabajo, se estudió las pacientes con cáncer de mama cT1-2, N0 con ganglio centinela positivo (hasta 2 ganglios afectos macro o microscópicamente) y tratadas con cirugía conservadora más radioterapia y, bien seguimiento, bien linfadenectomía, sin encontrar diferencias en la supervivencia global. Otros estudios posteriores se han realizado, como el IBCSG 23-01 (120), el estudio AATRM 048/13/2000 (121) (con enfermedad micrometastásica ganglionar), y el estudio AMAROS (122), y en ninguno de ellos se objetivó diferencias significativas en la tasa de recidiva axilar.

Con ellos, podemos concluir que las pacientes con axila clínicamente negativa previa a la cirugía, con pN1mi en el GC no necesitan nada más y que los que tienen un pN macroscópica tienen unos resultados con radioterapia adyuvante que son comparables a la linfadenectomía y con menor morbilidad (118). De hecho, el Grupo de Consenso de Sant Gallen de 2015 establece que ante 1 o 2 ganglios centinelas positivos para macrometástasis, si la paciente se le ha realizado una mastectomía y no va a recibir radioterapia, se debe realizar una linfadenectomía axilar; pero, en cirugías conservadoras que van a recibir radioterapia local, no es necesario realizar una linfadenectomía axilar (92).

Estudios recientes aconsejan una revisión de los criterios diagnósticos del GC para la indicación de la linfadenectomía axilar, mostrando que el valor de la «carga tumoral» es más predictivo de afectación axilar que los grupos pronósticos definidos en el TNM-7ª edición (65) (células tumorales aisladas, micrometástasis y macrometástasis)(118).

Por otro lado, la terapia sistémica (quimioterapia, la hormonoterapia y las terapias dirigidas) es aquella que afecta a todo el organismo en contraste con un tratamiento local como la cirugía o la radioterapia. Este tipo de terapia se da tanto en estadios precoces (adyuvante) como en la enfermedad metastásica.

La decisión para indicar un tratamiento adyuvante se fundamenta en la estimación del riesgo de recidiva ante la presencia de un conjunto de variables (tamaño tumoral, afectación de ganglios linfáticos o la inmunohistoquímica) que se asocian con un mayor o menor riesgo de recaída como ya se ha comentado en apartados anteriores.

La mayor parte de los datos relativos al beneficio de la quimioterapia adyuvante proceden de los ensayos clínicos más recientes y de los metaanálisis del *Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group* (EBCCG). Hay varios esquemas de tratamiento quimioterápico adyuvante, la mayoría son combinaciones de antraciclinas (doxorrubicina o epirrubicina) y taxanos (paclitaxel o docetaxel) (123) ya que han demostrado una mayor eficacia. No obstante, se estima que aproximadamente el 70-80% de los pacientes a los que se prescribe quimioterapia podría sobrevivir sin ella (124).

La hormonoterapia se indica cuando existen receptores hormonales positivos y se administra durante 5 años (habitualmente se inicia al finalizar la quimioterapia). Para mujeres premenopáusicas una opción es el tratamiento con tamoxifeno que reduce, a 15 años, un 33% el riesgo de recurrencia y un 9% la mortalidad por cáncer de mama independientemente de la edad, la afectación o no de adenopatías axilares y del hecho de recibir o no quimioterapia (124).

Para las mujeres postmenopáusicas el tratamiento hormonal se basa en el uso de inhibidores de la aromatasa ya que han demostrado su superioridad, o como poco igualdad, frente al tamoxifeno. Así el estudio ATAC (125) comparó el anastrozol frente al tamoxifeno, el BIG 1-98 (126) el letrozol frente al tamoxifeno, el estudio TEAM (127) comparó el exemestano con el tamoxifeno, y el ensayo MA-17 (128) analizó dar tras 5 años de tamoxifeno un inhibidor de la aromatasa frente a placebo. Todos concluyen con la efectividad de los inhibidores de la aromatasa, disminuyendo el riesgo de recidiva local, a distancia y la aparición de cáncer de mama en la mama contralateral en comparación con el tamoxifeno.

En las mujeres premenopáusicas de alto riesgo que han completado 5 años de tamoxifeno, podría continuarse el tratamiento 5 años más. Algo similar ocurre en mujeres que han tomado 5 años un inhibidor de la aromatasa, aunque hay menos evidencia para alargar la terapia endocrina en estas pacientes (85,92).

En cuanto a las terapias dirigidas, el punto de inflexión en el tratamiento de mujeres con cáncer de mama HER2 positivo ha sido el trastuzumab (129).



2. Justificación.

Situación actual

El cáncer de mama tiene una larga historia natural todavía no bien conocida. A lo largo de los años se han postulado diversas teorías. Así, la mayor parte del siglo XX estuvo dominada por la teoría de Virchow y Halsted que postulaba que el cáncer de mama se extendía de una forma ordenada. Según Halsted, el tumor se originaba en el epitelio glandular de la mama donde se mantenía localizado durante un tiempo. Después invadía estructuras vecinas, posteriormente los ganglios linfáticos y finalmente el torrente circulatorio produciendo metástasis a distancia. La teoría de Halsted fue la base de los tratamientos locales agresivos. Pese a estos tratamientos agresivos, sólo un 25% de las mujeres operadas sobrevivían a los 10 años (130).

La teoría del cáncer de mama como enfermedad sistémica desde fases muy precoces, es desarrollada por B. Fisher en las décadas de los 70-80 y supone una gran revolución en el tratamiento del cáncer de mama. Fruto de esta teoría son los tratamientos adyuvantes, que han conseguido aumentar la supervivencia y disminuir la morbilidad de las pacientes por un lado, y el tratamiento local con radioterapia además de la cirugía por otro (130).

El cáncer de mama consiste en la proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Son células que han aumentado enormemente su capacidad reproductiva. Esta capacidad evidenció la presencia en la mama de células con características de células madre y de diferenciación a células mioepiteliales y células lumbinales (131,132). Debido a su larga vida, las células madre tienen el potencial de sufrir mayor número de mutaciones y por tanto de perder sus propiedades y dar origen a un tumor. La identificación y caracterización de las células madre de mama han proporcionado una nueva visión de la cancerogénesis. Estas células pueden ser responsables de la iniciación y la progresión del tumor, así como del desarrollo de las resistencias a diferentes tratamientos (132).

En general, la primera alteración es presentar una respuesta anormal a los factores de crecimiento (como por ejemplo, los RE). Posteriormente, las células dejan de responder de forma normal a la apoptosis, pierden la función supresora tumoral y presentan una función anormal de oncogenes. Por otro lado, presentan una inestabilidad genética con cambios en el estroma formándose neoangiogénesis. Finalmente, invaden el tejido circundante por aumento de la actividad de las células malignas (133).

En este contexto evolutivo acerca de la historia natural del proceso oncogénico del cáncer de mama, desde hace algunas décadas se ha desarrollado una corriente investigadora para intentar aclarar el posible papel de los virus en general, y del virus del papiloma humano en particular, en el cáncer de mama.

2.1 Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es reconocido hoy en día como el agente causal para el desarrollo de carcinoma de cérvix y de sus lesiones precursoras. Si bien es cierto que, aunque en 1976 se descubrió que diversos tipos de VPH estaban involucrados en el desarrollo de cáncer de cérvix, no fue hasta 1991-1996 cuando Zur Hausen demostró por primera vez la fuerte relación que había entre cáncer de cuello uterino y VPH a través de la identificación, clonación y secuenciación de los dos tipos más importantes de VPH: el 16 y el 18 (134,135). Gracias a estos hallazgos le concedieron el Premio Nóbel de Medicina en 2008.

Posteriormente se ha establecido también la relación de este virus con otros cánceres de diversas regiones anatómicas como la orofaríngea, el esófago, la región anal, la vulva o la vagina.

Los papilomavirus, miembros de la familia papillomaviridae, son pequeños virus (aproximadamente 52-55 nm) y están constituidos por una cápside proteica icosaédrica (con 72 capsómeros pentaméricos) que contiene una doble cadena de ADN circular de 8000 pares de bases. La mayoría de los papilomavirus se caracterizan por presentar tropismo por determinados tejidos y afectan de forma específica a las células de epitelios escamosos, cutáneos o de mucosas, dando lugar a lesiones proliferativas de origen epitelial (136).

Su estructura genómica es compartida por más de 200 tipos secuenciados hasta la fecha y consta de 3 regiones (136):

- I. Una región de control LCR (*long control region*). Esta región no codifica proteínas pero contiene elementos necesarios para la replicación y la transcripción del virus.
- II. Región de genes de expresión temprana (*early*) cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral. Son 6: E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Contiene los denominados marcos abiertos de lectura (ORF, *open reading frames*) que son las unidades específicas donde actúa la ARN polimerasa. Se encuentran solamente en las regiones temprana y tardía.
- III. Región de genes de transcripción tardía (*late*): L1 y L2, cuya expresión genera proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside. Son expresados sólo en las células altamente diferenciadas, donde se produce y libera las partículas virales (137).

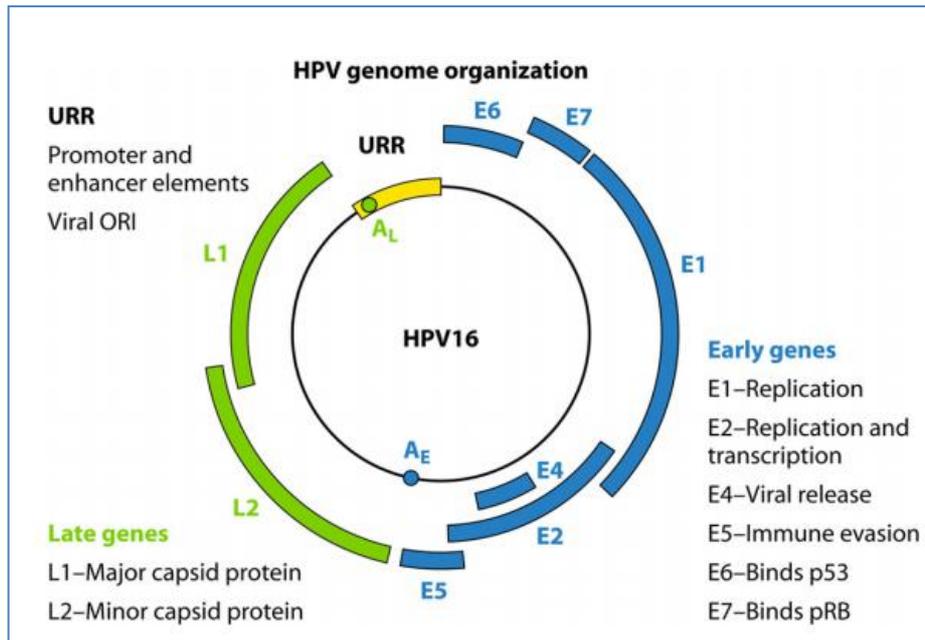


Figura 13: Alfapapillomavirus. Estructura (138).

Mientras que los genes de expresión temprana difieren en la estructura entre los diferentes tipos de VPH, los genes de expresión tardía, y más específicamente L1 que es la mayor proteína de la cápside viral, mantienen muchas similitudes, lo que le hace que sea la diana perfecta para la búsqueda del ADN viral en los métodos de consenso. No así en la búsqueda específica que lo que hacen es localizar E6-E7 (139).

2.1.1. TIPOS DE VPH

Actualmente, la clasificación taxonómica del VPH se basa en las diferencias en la región L1 dado que es la que mejor se conserva dentro del genoma (140). De hecho, De Villiers propone un modelo filogenético que podría explicar las diferencias clínicas de los diversos VPH.

Así, según su grado de similitud en la región de lectura abierta L1, se clasifican en:

- I. Géneros: comparten menos de un 60% en común, por ejemplo los alfapapillomavirus, de gran importancia clínica, pues agrupan a los virus asociados con lesiones mucosas, genitales y no genitales; y los beta, gamma y mu papilomavirus, que agrupan a los VPH asociados a lesiones cutáneas (140).
- II. Especie: comparten entre un 60-70% en común.
- III. Tipo: comparten entre un 71-89%.
- IV. Subtipos: comparten entre un 90-98%.

- V. Variantes: también denominados *linajes*, cuando comparten entre un 98-99%, como por ejemplo la variante europea (E) del VPH 16, y
- VI. Sublinajes: cuando comparten más de un 99%.

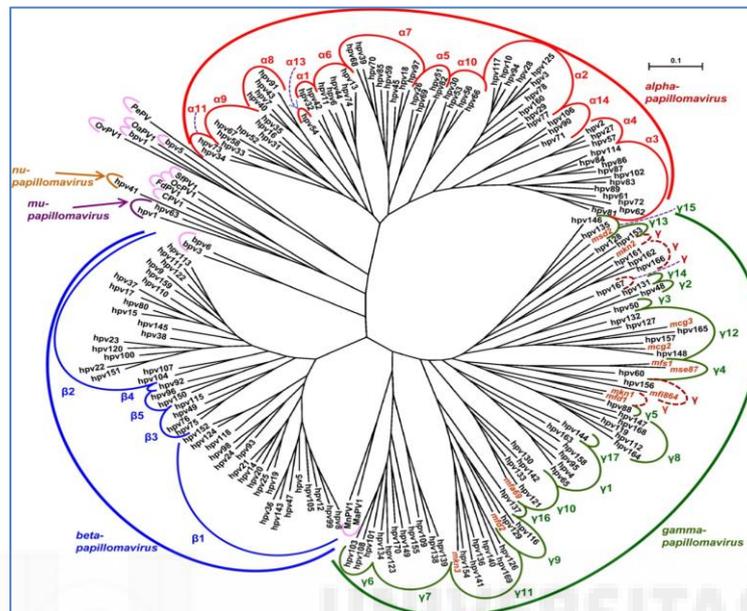


Figura 14: Clasificación taxonómica del VPH en base a proximidad genética en el gen L1, de acuerdo con la evolución del VPH. De Villiers (140).

Los diferentes tipos de VPH, también se pueden clasificar según su tropismo por los epitelios cutáneos o ano-genitales. Así, podemos clasificarlos en los siguientes grupos:

- I. Grupo cutáneo: los virus se aíslan en verrugas cutáneas plantares. A este grupo pertenecen los tipos: 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 26-29, 38, 41, 49 y 65.
- II. Grupo asociado a epidermodisplasia verruciforme: se aíslan en estos pacientes o en inmunodeprimidos. Son los tipos: 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 47, 50.
- III. Grupo ano-genital: son virus de transmisión sexual con tropismo por las mucosas. Este grupo además, se clasifica en alto y bajo riesgo oncogénico según el IARC 2012 (141).
 - ✚ Los virus de bajo riesgo (VPH-BR) más representativos son el 6 y el 11, y suelen identificarse en verrugas genitales (responsables del 90% de los condilomas) y lesiones de bajo grado en el cuello uterino. Los tipos son: 6, 11, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 64, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 87, 89 y 91.
 - ✚ Dentro de los virus de alto riesgo (VPH-AR) se diferencian 12 tipos virales que se clasifican consistentemente como VPH-AR que son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (IARC de clase 1). El VPH 68 se ha clasificado como de probable alto

riesgo oncogénico (IARC de clase 2A) y otros siete tipos (VPH 26, 53, 66, 67, 70, 73 y 82) que se han catalogado como de posible alto riesgo oncogénico (IARC 2B). Este grupo de VPH-AR se asocia a carcinomas genitales como cérvix, vulva, vagina o pene pero también a otros órganos como la cavidad faríngea, laringe o esófago (136,142,143). También se consideran 2B los VPH basados en su analogía filogénica con virus oncogénicos de suficiente o limitada evidencia en humanos: 30, 34, 69, 85 y 97.

Los subtipos de alto riesgo causan lesiones epiteliales escamosas que son las que pueden progresar a cáncer de células escamosas. De hecho, la mayoría de los cánceres de cérvix son producidos por VPH-AR. El VPH-16 es el más frecuentemente encontrado en ellos, seguido del VPH-18 y del VPH-31 (144). Además, aproximadamente el 20% de los cánceres orales son también positivos al VPH-AR en especial el cáncer de orofaringe (137).

2.1.2. CICLO VIRAL

El primer paso para que se produzca la infección, es la existencia de microtraumatismos del epitelio, o que sean delgados o inmaduros, para que el virus acceda al epitelio basal (136).

Una vez allí, entra en contacto con las células basales y la proteína L1 del VPH se une a su receptor específico de la membrana basal de la célula huésped, lo cual induce un cambio en la conformación de la estructura de la cápside viral que expone a las proteínas L2. En esta etapa el virus sólo infecta las capas metabólicamente activas de la membrana basal del epitelio. Las cápsides del virus, a través de un receptor específico del queratinocito, penetran en las células huésped. El genoma viral se introduce en la célula y se establece una infección episómica (ADN no integrado en el genoma celular). Así, las células basales infectadas forman “el reservorio de la infección”, y en estas células, el genoma viral se mantiene con un bajo número de copias (145). En esta etapa, las células son todavía competentes y capaces de replicarse. Esta primera etapa se denomina fase “no productiva de la infección” (141).

Tras ésta, la siguiente etapa en el proceso de la infección viral es el estatus mantenido, que puede persistir largos periodos de tiempo, de la infección no productiva y por tanto inactiva (pilar importante de la oncogénesis del VPH). La denominada “fase de latencia” viral sólo indica que el virus no puede detectarse ni mediante medios moleculares ni citológicos.

Cuando se produce la replicación viral independientemente de la síntesis del ADN cromosómico del huésped, es cuando se inicia la infección productiva del virus. Para ello, necesita

como sustrato la maduración del epitelio escamoso. A medida que las células se dividen, se producen células hijas que son “empujadas” hacia afuera, hacia la superficie epitelial.

En la infección viral productiva, el VPH, ya integrado en el ADN, induce la síntesis de ADN en las células escamosas del huésped pero, como estas células son maduras y sin capacidad para dividirse, debe reactivar el ciclo mitótico en las mismas. El VPH activa el ciclo celular interfiriendo en las funciones de dos genes celulares: *Rb* y *TP53* (genes supresores de tumores). Para ello el ADN vírico produce dos proteínas fundamentales: E6 y E7. La proteína E7 se une a Rb, de forma que la célula está en constante división. La proteína E6 se une a p53 impidiendo que la célula revise su ADN y por tanto impide la apoptosis manteniendo así el estado inmortal de las células que contienen secuencias de VPH (ciclo de las células marcadas con núcleos rojos en la figura 15)(56,136,145).

Además, estas células expresan la proteína E4 viral y están típicamente en las fases S o G2 del ciclo celular (presencia de E4 marcada en verde, con núcleos rojos que indica la replicación, en la figura 15). En las capas epiteliales superiores, las células dejan el ciclo celular, y en un subconjunto de las células E4-positivos, se realizan las proteínas L2 y L1 del virus, permitiendo de envasado de los genomas virales amplificados (145,146). El sitio de expresión de los diferentes productos de genes virales se muestra a la izquierda de la imagen, con las etapas clave durante la infección productiva (145). Así, es la integración del ADN del VPH en el ADN celular del huésped el factor determinante para que se inicie el proceso de oncogénesis (147).

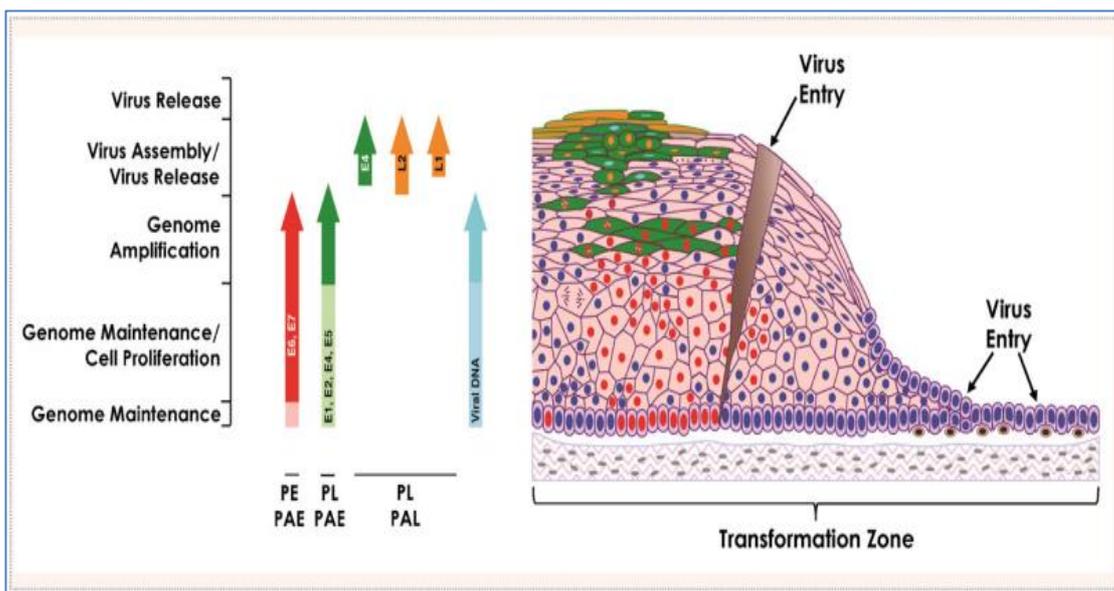


Figura 15: Ciclo viral del VPH-AR en el epitelio cervical, cedido por Doobar (145).

2.1.3. CARCINOGENESIS

En un momento determinado, y sin conocer con exactitud a qué es debido, una infección productiva puede convertirse en infección con capacidad de transformación en un proceso oncogénico. En este proceso, se inhibe la expresión de los genes tardíos y el ensamblaje del virión y los genes E6 y E7 se sobreexpresan. Como consecuencia de esto, se produce una alteración de los reguladores del ciclo celular y de los mecanismos de reparación del ADN.

No obstante, la infección por VPH en el epitelio cervical no es causa suficiente para producir cáncer de cérvix, sino que necesita de otros factores concomitantes (cofactores como el tabaco, infecciones repetidas, la presencia de estrógenos y progesterona, etc) para que se produzca la transformación neoplásica del epitelio cervical (43). Por otro lado, existen factores de riesgo de transmisión del VPH como la edad temprana en la primera relación sexual, una pareja con muchos compañeros sexuales, etc.

La infección por el virus de papiloma humano es la más común de las infecciones de transmisión sexual, pudiendo ocurrir con cualquier tipo de contacto, incluso sin llegar al coito, como por ejemplo con contacto de mucosa-mucosa o de piel con piel (148,149). Las zonas más estudiadas y con mayor riesgo de transformación neoplásica son el cuello uterino y la línea pectínea del canal anal. Ambas zonas se caracterizan por un epitelio donde se encuentra presente la unión escamo-cilíndrica. Las partículas virales infectan las células germinales de la capa basal del epitelio presumiblemente por contacto directo a través de pequeñas lesiones de la mucosa (148), como ya se ha explicado en el apartado anterior.

Este virus es un patógeno que provoca infecciones transitorias, asintomáticas o subclínicas, sin una consecuencia clínica necesaria en los pacientes inmunocompetentes. La respuesta inmunitaria frente a este virus es lenta y débil, y esto juega un papel fundamental en la regresión y la persistencia de los VPH, especialmente en los genotipos más oncogénicos (150).

Se estima que el 80% de las mujeres contactan con el virus a lo largo de la vida. Tanto la incidencia como la prevalencia de la infección se incrementan con la actividad sexual. De hecho, durante los primeros años de vida sexual se observa una elevada incidencia de infección, pero más del 90% de estas infecciones son transitorias y desaparecen espontáneamente (151). Aproximadamente el 39-55% de las mujeres presentan la infección tras 24-36 meses de inicio de las relaciones sexuales (152,153).

En la historia natural de la infección por VPH, sólo una pequeña proporción de las personas expuestas al virus llega a desarrollar cambios celulares, verrugas genitales (VPH-6 y 11) o cáncer (137). Si bien es cierto que el cáncer de cérvix es el más estudiado, se ha descrito su relación con otros como el cáncer de vagina, de vulva, anal, de pene, así como de cabeza y cuello. Por otra parte, el VPH se ha detectado en otros tipos de cáncer, incluyendo el de células escamosas de esófago, de pulmón, próstata, ovario, mama, piel y del tracto urinario, aunque en estos casos la asociación es todavía controvertida (154,155).

2.1.4. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VPH

La prevalencia del VPH a nivel cervical varía mucho de unas regiones geográficas a otras (figuras 16 y 17). El estudio realizado en 2010 por Bruni et al (156) muestra las diferencias en la prevalencia del VPH en las diferentes regiones del mundo. Este estudio está realizado en los 5 continentes y destaca la alta prevalencia de VPH en el Caribe (35,4%) con respecto a por ejemplo el Oeste asiático con una prevalencia del 1,7% (Figura 17). En todas las regiones coincidieron los serotipos más prevalentes, estos fueron por orden decreciente: 16, 18, 52, 31, y 58.

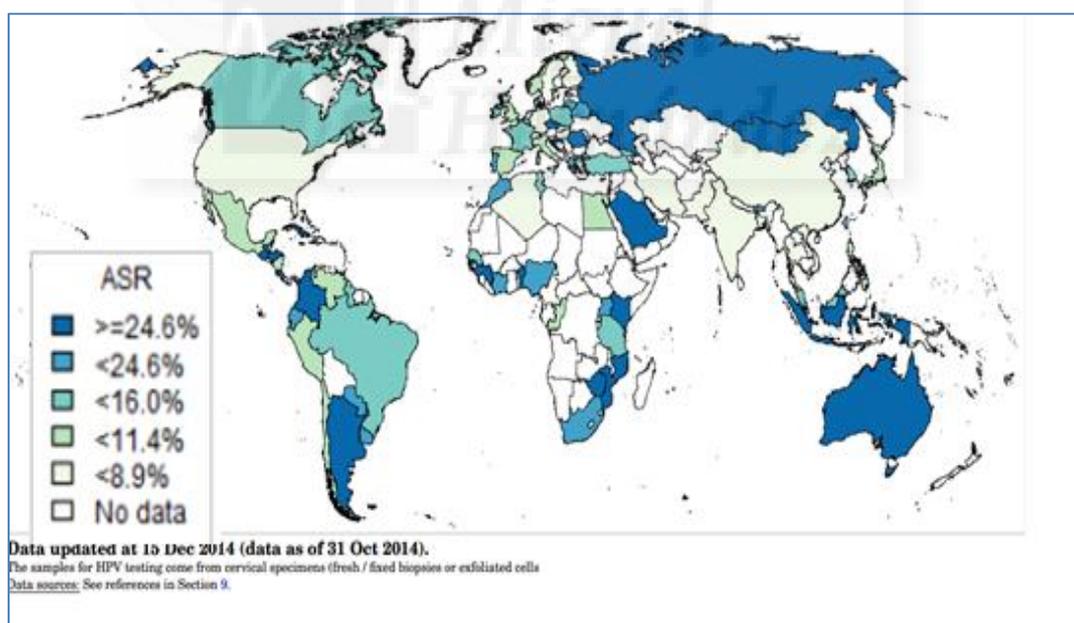


Figura 16: Prevalencia del VPH con citología normal (157).

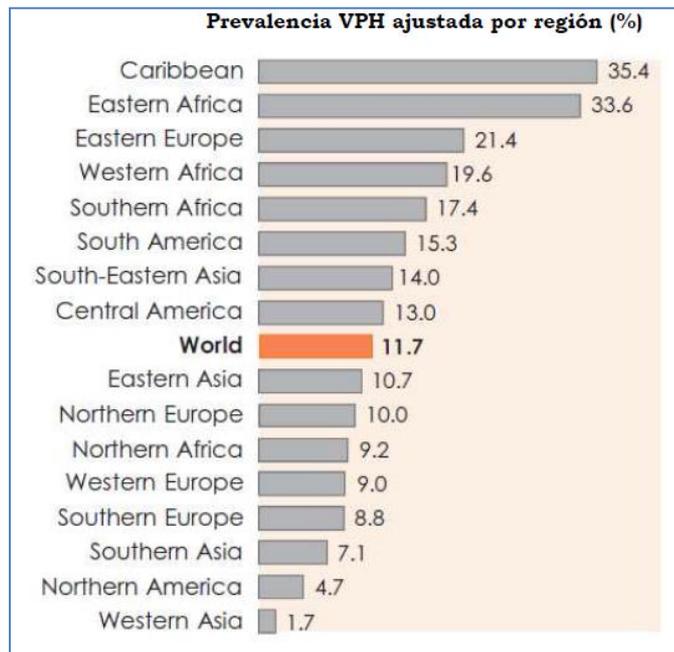


Figura 17: Prevalencia del VPH con citología normal, ajustada por región. Modificada de Bruni et al (156,158).

2.1.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VPH

El diagnóstico de infección por VPH clásicamente se ha basado en la identificación morfológica de la coilocitosis o atipia coilocítica en el contexto de los extendidos citológicos. Pero hoy en día se utilizan técnicas moleculares para su identificación. De los más de 100 test moleculares que existen en el mercado, sólo unos pocos están actualmente validados por las agencias internacionales para el control de los medicamentos (FDA...) para su uso en diagnóstico clínico. Los diferentes métodos tienen establecidos límites de sensibilidad y especificidad diferentes; además la calidad del análisis del ADN está condicionada también por una serie de factores técnicos y de conservación de la muestra que puede ser determinantes para los resultados.

La detección del ADN del VPH mediante técnicas de Biología Molecular, independientemente del método utilizado, se basa en la especificidad de la complementariedad entre los ácidos nucleicos. Una secuencia de ADN tiene la capacidad de hibridar específicamente con otros ADN o ARN de modo tan específico que a una determinada temperatura solamente se forman híbridos si el 100% de las bases son complementarios (136,159). Existen dos métodos fundamentales que se han convertido en referentes a nivel de diagnóstico: la captura de híbridos y la reacción en cadena de la polimerasa.

A continuación se exponen de manera breve los test más utilizados en función de si amplifican ácidos nucleicos (ADN o ARNmensajero) o bien amplificación de la señal.

2.1.5.1. HIBRIDACIÓN MOLECULAR

I. Captura de Híbridos

La captura de Híbridos (Hybrid Capture®2 o hc2) es el método más contrastado en la literatura. Su especificidad radica en que la detección de la señal amplificada se realiza con sondas específicas de ARN marcadas capaces de detectar diferentes tipos de VPH. Cuando existe infección vírica, las sondas de ARN forman un híbrido con el ADN del virus. El híbrido es capturado por el anticuerpo específico y detectado mediante ELISA (método luminescente). La captura de híbridos es el gold estándar en la detección del VPH-AR. Este método tiene una sensibilidad menor que la PCR pero adecuada al número de copias virales que se consideran relevantes a nivel diagnóstico y por tanto muy adecuado para el cribado clínico. El inconveniente es que no permite distinguir entre subtipos virales ni la presencia de infecciones múltiples (genotipos específicos). El análisis se realiza sobre las muestras cervicales utilizando un kit *Digene Cervical Sampler* (Qiagen, Gaihersburg, MD, EEUU). Esta prueba detecta 13 tipos de VPH-AR (-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 y -68) y 5 BR-tipos (-6, -11, -42, -43 y -44). La prueba puede realizarse con la sonda de bajo riesgo y/o de alto riesgo. Este método ha sido aprobado por la FDA en 2003. La sensibilidad de la técnica es de 1 pg de ADN de VPH-16 clonado por mililitro de muestra, lo que equivale a 100.000 copias del genoma viral. El límite de detección para los 18 tipos de VPH incluidos en las sondas de alto y bajo riesgo, según las instrucciones del fabricante, varía entre 0,62-1,39 pg/ml de muestra, con un valor promedio de 1,09 equivalente a 109.000 copias (136,151,159-161).

II. Cervista®

Cervista® VPH (Hologic, Inc., Cambridge, MA, EE.UU.) detecta la presencia de 14 tipos de VPH-AR (-16, -18, -31, -33, 35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 y -68). Esta prueba también utiliza un método de amplificación de señal para la detección del ADN. En comparación con hc2, se ha demostrado que Cervista® tiene mayor sensibilidad. Además, tiene menor tasa de falsos positivos y alta sensibilidad y especificidad para la genotipificación del VPH-16/18. Está aprobada por la FDA y posee la ventaja de necesitar menor cantidad de muestra, tener un control interno y baja reactividad cruzada para VPH-BR. Como desventaja, que sólo puede analizar muestras de citología líquida, de modo que no puede utilizarse en muestras tisulares. Existen dos tipos de

prueba Cervista®: en una, el resultado informa de la presencia o no de VPH-AR pero no de la carga viral; y en la otra hace una distinción del VPH-AR parcial (distingue 16, 18 del resto)(151,160-162).

2.1.5.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN VÍRICO

Están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es el sistema de amplificación molecular más utilizado en el laboratorio. Utiliza pequeñas sondas de ADN (que se denominan cebadores o “primers”) que hibridan específicamente en secuencias de ADN viral. Estas sondas son dobles y flanquean la región de ADN de interés. Tras una serie de reacciones de desnaturalización y copia de esa región de ADN viral en la muestra, se produce una amplificación en cadena de la región de interés que luego puede ser visualizada por diferentes técnicas (ELISA, electroforesis, detección láser, etc.). En este método se combinan, por una parte la especificidad de la unión de los cebadores y, por otra parte, la sensibilidad que resulta del proceso de amplificación (para regiones consenso de orden de picogramos de ADN viral y para regiones específicas de femtogramos de ADN. Detección real de 10 copias de ADN viral entre 1 millón de células).

Es una técnica extraordinariamente sensible, capaz de detectar la presencia de muy pocas copias de ADN del virus. Tras la amplificación del material a estudiar, la tipificación viral puede realizarse utilizando sondas específicas para cada virus con sondas que permiten diferenciar alto o bajo riesgo o con enzimas de restricción que proporcionan patrones diferentes para cada tipo (159), figura 18.

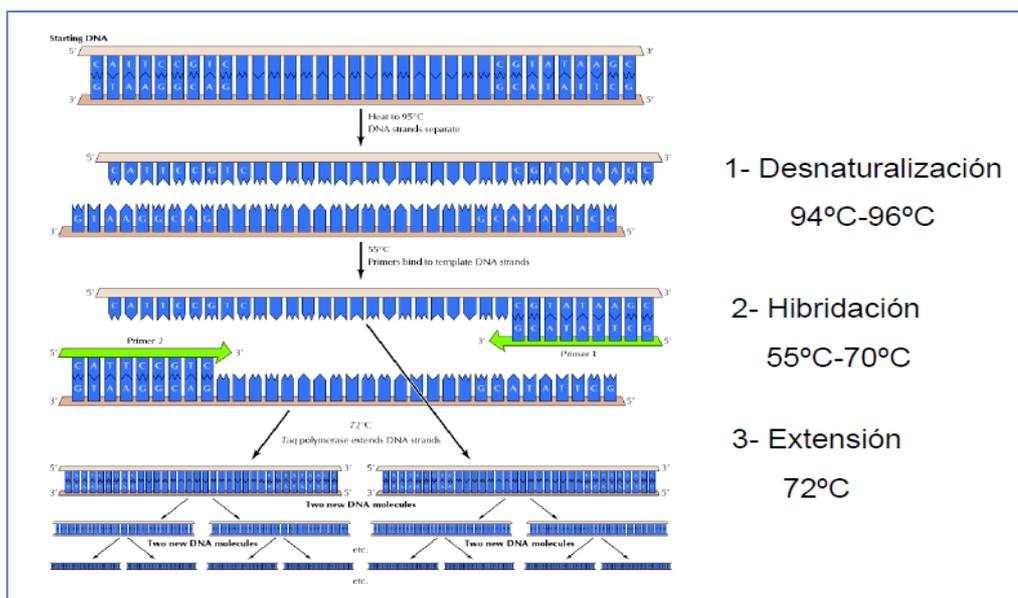


Figura 18: PCR o reacción en cadena de la polimerasa

Típicamente los procedimientos de PCR para la detección de VPH utilizan cebadores dirigidos al gen *L1* de la cápside viral (que es una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral), que pueden detectar la mayoría de los tipos de VPH que afectan a las mucosas. Estos cebadores son (136,151,159):

- ✚ Los primers PGMY09/11 son los clásicamente utilizados pero tienen en contra el gran tamaño del fragmento amplificado (450bp), lo que disminuye su sensibilidad debido a la fragmentación que, en ocasiones, presenta el ADN.
- ✚ Por el contrario los primers SPF10 amplifican un fragmento muy corto (65bp) lo que le hacen ideal en muestras con ADN parcialmente cortado, como las incluidas en parafina. El pequeño tamaño del amplificado favorece las contaminaciones y reduce la especificidad.
- ✚ Con un tamaño intermedio de amplificado (150-170bp), están los primers GP5+/6+. Estos cebadores disminuyen los inconvenientes que presentan los dos anteriores.

Las técnicas de PCR son rápidas, relativamente poco laboriosas y altamente sensibles. No obstante, no permite cuantificar la cantidad de ADN en la muestra salvo en los casos de Q-PCR o PCR cuantitativa. Puede existir falsos positivos por contaminación, aunque esto se ha reducido con la introducción de controles internos. Otro posible problema en la aplicación de la técnica es que el genoma del virus en ocasiones se integra en el genoma de la célula huésped, lo que implica una interrupción del genoma viral y podría afectar al proceso de amplificación.

I. Amplicor HPV test®

Consiste en la amplificación del ADN mediante PCR, seguido de hibridación de los ácidos nucleicos para la identificación de genotipos de alto riesgo oncogénico de VPH. Para ello, utiliza los cebadores PGMY09/11. Este test incluye una mezcla de sondas de 13 tipos de alto riesgo (sensibilidad analítica de 500 copias/ml) y coamplifica el gen de la β -globina como control de la calidad de la muestra. Los resultados son cualitativos no dando genotipado del VPH (136,159).

II. Cobas 4800®

Esta prueba, que lee el anterior sistema, combina la extracción automatizada de muestras combinada con la tecnología en tiempo real de la PCR para detectar 14 tipos de VPH-AR. En caso de dar positivo informa si es el VPH-16, VPH-18 o alguno de los otros 12 tipos de alto riesgo. Sólo puede utilizarse material conservado para citología en medio líquido, no pudiendo utilizar material histológico conservado en parafina. Esta técnica también está aprobada por la FDA (151,160,161).

III. Real Time HR-HPV Abbott®

Se trata de una técnica basada en el genotipado individual concurrente para VPH 16/18 y la detección combinada de otros 12 VPH de alto riesgo mediante PCR en tiempo real. Utilizando como cebadores GP5+/GP6+. También utiliza como control interno la β -globina (159).

IV. Linear Array VPH Genotyping Test®

Consiste en la hibridación reversa de productos de amplificación obtenidos por PCR, sobre un soporte sólido de nitrocelulosa. Utiliza el cebador PGMY09/11. Es capaz de identificar 37 tipos de VPH, 18 de ellos son VPH-AR. Como control interno utiliza la β -globina (136,159).

V. INNO-LiPA VPH Genotyping Extra®

Esta prueba amplifica el ADN del VPH con cebadores SPF10 en la región L1 y puede distinguir 28 tipos de VPH, 18 de ellos son de alto riesgo. Al tener una alta sensibilidad lo hace especialmente indicado para su uso en material de biopsia fijado. Una de las ventajas de este método es que son capaces de distinguir infecciones múltiples y el uso de más de un sistema de PCR es más robusto a la hora de detectar infecciones múltiples. Como control interno utiliza HLA-DBP1 (159,163). Sin embargo, en contra está el hecho de que es muy sensible a la contaminación.

VI. HPV Genotyping RH®

Basada en técnicas de hibridación reversa, este test está indicado cuando HC2 da positivo. Este test identifica 18 tipos de VPH-AR (159).

VII. CLART® Papillomavirus humano 2:

Es un sistema que permite el genotipado del VPH mediante identificación genómica para diagnóstico in vitro. La especificidad y la sensibilidad diagnóstica alcanza el 98 y el 100% respectivamente. El kit está basado en la amplificación de fragmentos específicos del genoma vírico y su posterior hibridación con sondas específicas para cada tipo de VPH. Es capaz de detectar infecciones y coinfecciones de hasta 35 genotipos (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89). Se puede utilizar distintos tipos de muestras (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina).

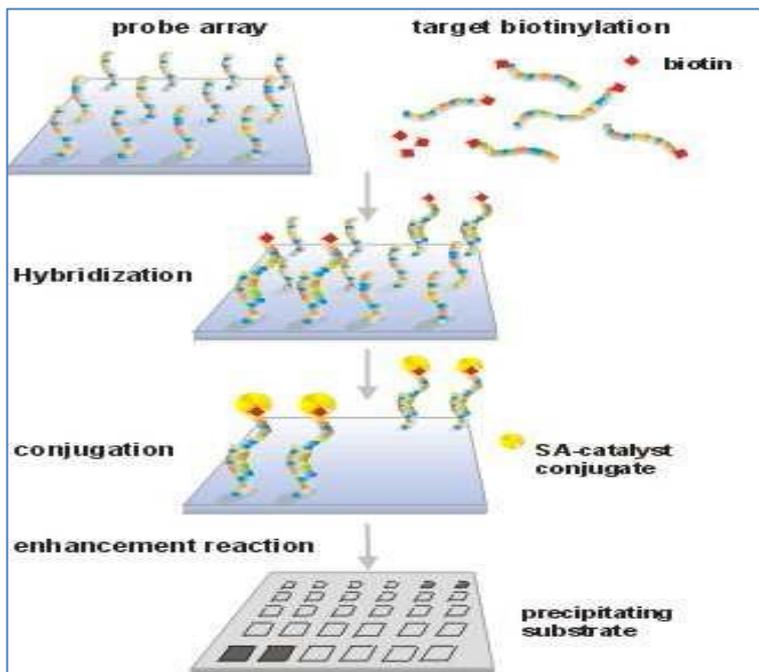


Figura 19: Esquema del método de visualización de CLART® (164): Las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano, *Horse Radis Peroxidase*). El sustrato o-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

VIII. HPV DIRECT FLOW CHIP

Este método identifica 36 genotipos (VPH-AR: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82, y VPH-BR: 6, 11, 40, 42, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84 y 89) por PCR directa e hibridación reversa dot blot. Tiene una sensibilidad analítica y especificidad del 100%, certificada por el *Panel de la OMS VPH LabNet Proficiency 2011 (165)*. Se puede usar tanto con muestras en fresco como fijadas en parafina.

2.1.5.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ARN-VÍRICO DEL VPH

Aptima®

Es un sistema automatizado que permite la detección de 14 tipos de VPH-AR (los mismos que Cervista®) mediante análisis de ARN mensajero viral de las oncoproteínas E6 y E7 en citologías en medio líquido. Medir la expresión de los genes E6 y E7 constituye un test indicativo de elevada carga viral de integración celular y tiene un valor predictivo positivo en las lesiones de bajo grado superior a la detección del ADN vírico. Está aprobada por la FDA. Existen dos ensayos

de Aptima®, una no discrimina entre subtipos de VPH-AR y la otra hace una distinción parcial (detecta 16,18 y 45 del resto) (151,160,161).

Cuadro 13: Métodos de detección del VPH

Nombre	Molécula diana	Amplificación muestra	Aprobación reglamentaria	VPH objetivo	Genotipado VPH
HC2® Qiagen	Genoma completo	Amplificación señal	FDA/CE-IVD	13 VPH-AR 5 VPH-BR	NO
Cervista HPV-16/18® Hologic	L1	Amplificación señal	FDA/CE-IVD	14 VPH-AR	Parcial (16,18)
Amplicor® Roche	L1	PCR con cebadores PGMY09/11	CE-IVD	14 VPH-AR	Parcial (16,18)
COBAS 4800 Automation	L1	PCR con cebadores PGMY09/11	FDA/ CE-IVD	14 VPH-AR	Parcial (16,18)
CLART-HPV2 (Genómica)	L1	PCR		35 genotipos: VPH-AR y VPH-BR	SI
Real Time HR-HPV Abbott®	L1	PCR con cebadores GP5+/GP6+	CE-IVD	14 VPH-AR	Parcial (16,18)
HPV Direct Flow Chip (Máster Diagnóstica®)	L1	PCR directa+ hibridación reversa dot blot	CE-IVD	18 VPH-AR 18VPH-BR	SI
Linear Array Genotyping Test® Roche	L1	PCR con cebadores PGMY (L1)	CE-IVD	18 VPH-AR TOTAL: 37	SI
INNO-LiPA Genotyping Extra® Innogenetics	L1	PCR con cebadores GP5+/GP6+	CE-IVD	18 VPH-AR TOTAL: 28	SI
HPV Genotyping RH® Qiagen	L1	PCR con cebadores GP5+/GP6+	CE-IVD	18 VPH-AR	SI
Aptima HPV-16/18/45 Genotype Assay® Hologic	E6/E7 ARNm	Amplificación de ARNm basada en la transcripción inversa	CE-IVD/FDA	14 VPH-AR	Parcial (16,18,45)

FDA: Foods and Drugs Administration; CE-IVD: Comunidad Europea- Diagnóstico in vitro; VPH-AR: VPH de alto riesgo oncogénico; VPH-BR: VPH de bajo riesgo oncogénico.

2.2 Cáncer de mama y virus: El VPH

Actualmente existen más de 300.000 artículos sobre cáncer de mama referenciados en Pub-Med (Octubre de 2015); sin embargo, todavía queda mucho por conocer sobre las causas que producen esta enfermedad. Un hecho irrefutable es que existen factores externos a los de base genética que influyen en el cáncer de mama, pero, ¿cuáles?...

Ya se han descrito los factores de riesgo conocidos como por ejemplo los diferentes patrones alimenticios, las características obstétrico-ginecológicas de las mujeres o las alteraciones del sistema inmunitario; pero así y todo, hay factores de los que aún no conocemos bien su posible papel oncogénico. Este es el caso de los virus (43).

A través de los años, el conocimiento científico también ha estado influenciado “por modas”. Así en la década de los 60-70 se estudió sobre todo los virus como posible causa; durante la década de los 80 se cuestionó sobre todo la dieta y el consumo de grasas. Y ya en la década de los 90 se centró el interés en los posibles genes como causantes del cáncer.

The International Agency for Research on Cancer (IARC), establece que el 18-20% de los cánceres en general tienen factores biológicos (virus) como carcinógenos (166). Aunque Bittner descubrió en 1943 el virus del tumor mamario del ratón (mice mammary tumor virus o MMTV) (41,60) como causante del cáncer de mama en ratones (primer indicio de que un virus era carcinógeno), fue en 1964 cuando se describió el primer virus implicado como agente etiológico en el cáncer humano, (virus Epstein-Barr en el linfoma de Burkitt). Posteriormente, se fueron descubriendo otros virus implicados (infecciones crónicas) en el cáncer, bien como iniciadores o como inductores de la carcinogénesis: VPH en el carcinoma cervical, VHB (virus hepatitis B) y VHC (virus hepatitis C) en el carcinoma hepatocelular, virus herpes-8 en el sarcoma de Kaposi, poliomavirus de células de Merkel en el carcinoma de células de Merkel, CMV en el glioma, etc... (143,167-169). Si bien es cierto que la mayoría de las personas que tienen infecciones por estos virus, por ejemplo VEB para el linfoma o el VPH para el cáncer cuello uterino, no desarrollarán nunca este cáncer (170).

Los mecanismos de carcinogénesis de estos virus son diferentes: así el VPH, el VEB o el virus de Kaposi codifican oncoproteínas que alteran la regulación normal de la célula; otros como el VHC o el VHB juegan su rol a través de la inducción de una inflamación crónica; por último el VIH juega un papel indirecto afectando al sistema inmunitario del huésped (168,169).

En el cáncer de mama se ha descrito la presencia de varios virus: virus del Epstein-Barr, el MMTV y el virus del papiloma humano (41,59,60,167,171). Todos ellos tienen algo en común: los mecanismos que pueden causar la iniciación y la progresión del cáncer de mama. En primer lugar, determinados productos génicos pueden afectar a la regulación del ciclo celular, inhiben la apoptosis, promueven la angiogénesis y activan el fenotipo metastásico. En segundo lugar, estos virus tienen la capacidad de ser inmunosupresores, lo que lleva a escapar de los mecanismos de vigilancia de las células huésped (59).

Así, varios autores realizan sus investigaciones buscando la asociación entre distintos virus como promotores del cáncer de mama.

Tsai en 2005 (172) buscó la posible relación causal de factores virales (virus herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, virus del papiloma humano, virus Epstein-Barr y herpesvirus tipo 8) con el cáncer de mama. Estudió 62 muestras con cáncer de mama y 16 con patología benigna de la mama (fibroadenomas, cambios fibroquísticos, etc...) encontrando positividad para alguno de estos virus en 52 de las 62 piezas de cáncer de mama: 12,9% de las piezas a VHS-1, 45,2% de las piezas a VEB, 75,8% de las piezas a CMV, 12,9% de las piezas a VPH, y 45,2% de las piezas a VHH-8. Excepto una muestra, el resto tenían infecciones múltiples, es decir de varios de estos virus. De las 16 muestras de patología benigna mamaria sólo se encontró en dos casos VPH (sin genotipar). Este autor concluye en este artículo, y posteriormente en 2007 (172,173), que el cáncer de mama tiene una relación significativa con la infección viral múltiple y que ésta influye además en la supervivencia global. Aún con todo esto, el estudio sólo demuestra significación estadística con el virus herpes tipo 8.

Posteriormente, en el estudio de 2012 de Glenn et al (171) se establece que existe una colaboración entre virus Epstein-Barr y VPH de tal manera que estos virus pueden interactuar en procesos oncogénicos. En la misma línea está Corbex (174) en 2014, que habla de esa misma colaboración y encuentra coinfección en el 2,4% de los casos con carcinoma infiltrantes en mujeres argelinas. Corbex estudia la existencia de varios tipos de virus (VPH, poliovirus y herpesvirus) en cánceres de mama. Encuentra significación estadística en su conjunto ($p=0,009$), si bien cuando desglosa por tipos de virus sólo existe significación para el virus del Epstein-Barr. Así, concluye que pueden ser tanto el VEB como el VPH cofactores en la carcinogénesis de los tumores de mama más agresivos.

Joshi et al (60) realiza un estudio descriptivo de los estudios publicados hasta 2012 de la presencia de VPH, virus del Epstein-Barr y MMTV en el cáncer de mama sin poder concluir una

relación causa efecto claro. Cabe señalar que el MMTV, en realidad es un virus propio de ratones como su propio nombre indica. Liu et al (168) consiguieron amplificar un virus humano que era 95% homólogo al MMTV por lo que lo llamaron Human Mammary Tumor Virus (HMTV). No obstante, en la literatura se sigue haciendo referencia al MMTV. El HMTV ha sido el centro de atención dado que es un virus reconocido en el ratón como agente causal del cáncer de mama, y ya se ha objetivado en la leche materna (175).

Por otro lado, en Argentina el grupo de Pereira había descrito también en 2010 la presencia de VEB en el 31% de las pacientes con carcinoma de mama. De hecho, en su estudio de 2013 donde buscan VPH, describen en 1 de las 61 muestras infección concomitante de ambos virus, señalando que ambos pueden contribuir en el proceso neoplásico (176). Aguayo et al (177) también encuentra coinfección ente VPH-16 y el VEB en 1 de los 46 casos.

De Paoli y Carbone (169) en 2013 realizan una revisión de los agentes virales implicados en el cáncer de pulmón, de colon y de mama. Concluyen que no hay evidencia suficiente en la literatura para establecer como agentes implicados en el cáncer de mama al VPH, VEB o al MMTV, pero que son necesarios más estudios.

En 2014, Bae (178) establece como posible hipótesis del pico de incidencia de cáncer de mama en mujeres coreanas entre 45-50 años la infección viral. Y ese mismo año, Akhter et al (168) expone que si bien se han descrito la presencia de varios virus en el cáncer de mama, no se puede determinar su relación causal.

En 2015, Fimereli (179) estudió 58 piezas de cáncer de mama con diferentes métodos moleculares buscando la presencia de virus en general (transcripción viral). Encontró mediante PCR dos muestras VPH-positivas (VPH-16 y la otra VPH-AR). Así mismo, encontró HHV-6 y poliovirus. Sin embargo, concluye que no existe suficiente número de secuencias virales para determinar a los virus como causa del cáncer de mama.

Con todo esto, si la presencia de los virus en la mama es casual y actúan como simples “pasajeros” o si tienen un rol importante en la génesis del cáncer, no está del todo claro. Lo cierto es que, a excepción del HMTV, el resto de virus descritos en el cáncer de mama, ya han sido descritos en otros cánceres. Por todo ello, la búsqueda de la causa viral como factor promotor del cáncer de mama sigue creando muchas controversias ya que la comunidad científica exige un mecanismo de carcinogénesis viral y no sólo la mera presencia del virus en el tejido afecto (43,60,168,171).

A colación de esto, para que un virus sea una de las causas de un cáncer determinado, deben darse una serie de premisas tal y como se establece en los criterios de Bradford Hill. Estos se exponen en el cuadro 14 (60,168,180).

Cuadro 14: Criterios de causalidad de Bradford Hill (60,168,180).

La presencia del marcador viral debe ser más frecuente en los casos que en los controles dentro de la misma región geográfica.
Debe existir una relación temporal, es decir la exposición al virus debe preceder a la enfermedad.
La presencia del virus y su relación con el cáncer debe ser evidenciada en varios estudios.
La prevalencia geográfica del virus y del cáncer debe de ser elevadas en las mismas regiones.
Debe haber una relación dosis-respuesta entre el nivel de exposición al virus y la incidencia de ese cáncer.
Debe existir una coherencia biológica: la causalidad viral debe tener sentido en términos de modo de transmisión, historia natural...
El virus debe tener capacidad oncogénica para infectar el epitelio.
La prevención de la infección por el virus debería disminuir la incidencia de cáncer.

De todas ellas, la primera premisa es la más importante ya que sin ella, no se pueden dar las siete restantes. Así, numerosos investigadores han adoptado un enfoque molecular para el primer criterio, en busca de evidencia de ADN de VPH en tejido tumoral mamario.

A partir de la búsqueda de esta evidencia, los estudios publicados sobre el virus del papiloma humano y el cáncer de mama son del todo contradictorios, siendo muy amplia la horquilla existente, con una prevalencia del VPH del 0% al 86.21% en las muestras de tejido con cáncer de mama (53-60). Además, estos estudios son muy heterogéneos en cuanto a metodología utilizada. Este tema ha tenido un interés creciente como se puede observar en la figura 20, donde se ven desglosados por años las publicaciones sobre VPH y cáncer de mama (excluyendo revisiones y metaanálisis).

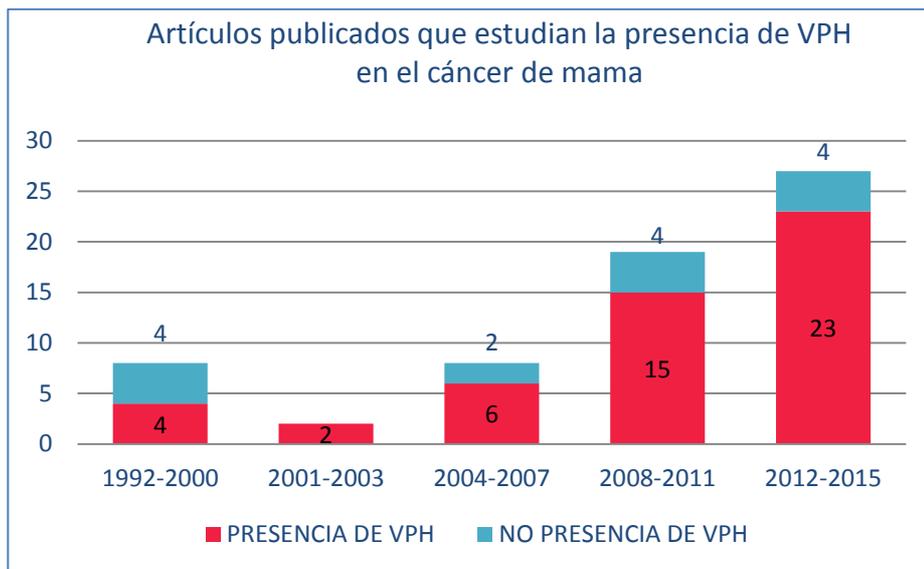


Figura 20: Artículos publicados sobre el VPH y el cáncer de mama.

Se puede observar cómo, aunque el primer trabajo de VPH en cáncer de mama es en 1992, no es hasta 2004 cuando cobra un interés que ha ido en aumento hasta nuestros días. Cabe señalar además que los estudios a favor de la presencia de VPH son cada vez mayores, si bien es cierto que en algunos trabajos la proporción de presencia del virus es baja (como se detallará más adelante) y por ello concluyen que no pueden determinar que exista o no una relación causal entre VPH y cáncer de mama.

De la revisión realizada sobre estudios que buscan la presencia de VPH en el cáncer de mama, se han seleccionado 64. De ellos, 28 son estudios que recogen casos y controles (aunque en la mayoría no sigue la metodología propia de dicho tipo de estudios, sino que realizan un estudio puntual en alguna muestra de tejido mamario no tumoral), mientras que 36 sólo realizan la búsqueda viral en casos afectos de neoplasia mamaria, siendo alguno de ellos de dudosa calidad metodológica (tabla 2).

Tabla 2: Descripción de los estudios sobre VPH y cáncer de mama.

Autor, año	País	Cons. Muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)	OR
Bratthauer, 1992 (181)	USA	Parafina	PCR/SB	L1 (6, 11, 16, 18)	0/28 (0%) Carcinoma papilares y CDI	0/15 (0%) Papiloma intraductal	-
Di Lonardo, 1992 (182)	Italia	Parafina	PCR	E6 (11, 16, 18)	5/17 (29,4%) CI	-	-
Wrede, 1992 (183)	Reino Unido	Parafina	PCR	L1 (GP) E7 (16,18)	0/80 (0%)CI	-	-
Czerwenka, 1996 (184)	Austria	Parafina	PCR/DBH	L1(MY)/(6,11,16,18,31,33,35)	0/20 (0%) Paget	-	-
Gopalkrishna, 1996 (185)	India	Fresco	PCR/SBH	E6 (16,18)	0/26 (0%) CI	0/4 (0%) Fibroadenoma	-
Hennig, 1999 (186)	Noruega	Parafina	PCR/ISH (1+)	GP5+/GP6+ E6 (11,16,18,33)	19/41(46,34%) ClconAPcx 0/8 ClsinAPcx	-	-
Yu, 1999 (187)	Japón China	Parafina	PCR/SBH	E6 (16, 18, 33)	18/52 (34,6% CDI y CDIS)	1/20 (5%) HDA, Papiloma, mastopatía	P=0,02
Yu, 2000 (188)	China	Parafina	PCR/SBH	E6 (16, 18, 33)	14/32 (43,8%) CDI	-	-
Liu, 2001 (189)	USA	Fresco	PCR/DBH	L1/E6-E7. ColE1/pBR322	6/17 (35,29%) CI	-	-
Li T., 2002 (190)	China	Parafina	PCR	E6/E7 (16,18)	19/28 (68%) CI	-	-
Damin, 2004 (191)	Brasil	Parafina Fresco	PCR/seq	E6(16,18)	25/101 (24,75%)CI	0/41 (0%)Mn-fibroadenomas	27,67 (1,64-466,13) P<0,001
Noguera, 2004 (192)	Argentina	Parafina	PCR	L1 (MY09/11)	0/40 (0%) CI	-	-
Widschwendter, 2004 (193)	Austria	Parafina	PCR/ISH	L1 /GP5+/GP6+ (16,18)	7/11 (63,6%) CI o ganglios + mujer con AP ca cx 1/11 CI sin APca cx	-	-
De Villiers, 2004 (194)	USA	Parafina	PCR/ISH	L1 (GP,Cp,FAP)	25/29 (86,21%) CI	20/29 (69%) Pezón	-
Kan, 2005 (195)	Australia	Congel.	PCR/seq	E6 (16,18,33)	24/50 (48%) CI	-	-

IMPPLICACIONES DEL VPH EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES

Autor, año	País	Cons. Muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)	OR
Tsai, 2005 (172)	Taiwan	Fresco	PCR	L1 (MY9/11)	8/62 (12,9%)CDI	2/60 (3,3%) Fibroadenomas, Mn, tumores tiroideos	-
Kroupis, 2006 (196)	Grecia	Congel.	PCR/RLFP	L1 (MY, GP) E6/E4(6/11,16,1 8,31,33,52,58)	17/107 (15,89%) CI	-	-
Gumus, 2006 (170)	Turquía	Fresco	PCR	L1 (MY) E6-E7 (11,16,18,33)	37/50 (74%) CI	16/50 (32%) mismas pac. Con CI pero Mn	P=0,000
Lindel, 2007 (197)	Suiza	Parafina	PCR	L1, SPF ½ (40 tipos VPH)	0/81 (0%) CI	-	-
Yasmeen, 2007 (198)	Canadá	Parafina	PCR	E6/E7 (16,18,31,33,35)	17/17 (100%) CI 6/10 (60%) CIS	2/18 (11%) Mn	-
Choi, 2008 (199)	Corea	Parafina	PCR/mycarray	Chip con 28 tipos	8/123(6,5%) CI	0/31 (0%) Papilomas	-
Akil, 2008 (200)	Siria	Parafina	PCR	L1 (PGMY09/11) E6/E7 (16,18,31,33,45)	69/113 (61,06%)CI y CIS	-	-
Duò, 2008 (201)	Italia	Parafina	PCR /LiPA	(MY09/11, GP5+/GP6+)	1/24 (4,16%)CI 1/28 (3,38%)C.Papilar	-	-
Khan, 2008 (202)	Japón	Parafina	PCR /LiPA	L1/SPF10/E6	23/99 (18,5%) CDI 3/25 (2,5%) CDIS	-	-
De Cremoux, 2008 (203)	Francia	Congel.	PCR	GP5+/GP6+ (16,18,33,45,6,1 1)	0/50(0%) CI	-	-
De León, 2009 (204)	México	Parafina	PCR/seq	L1 (MY, GP)	15/51 (29,4%) CI	0/43 (0%) Pbm	-
Mendizabal-Ruiz, 2009 (205)	Mexico	Parafina	PCR/seq	E1/ Cpl & CplIG	3/67 (4,47%) CI	0/40 (0%)Pbm	-
He, 2009 (206)	China	Congel.	PCR	E6	24/40 (60%) CI	1/20 (5%) Mn	P=0.,001
Heng, 2009 (207)	Australia	Parafina	PCR	L1 (MY, GP) PCR <i>in situ</i> E6 (16,18)	5/13 (39%) CDIS 3/13 (23%)CI	3/17(18%) Mn	-

Autor, año	País	Cons. Muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)	OR
Ong, 2009 (208)	Singapur	Parafina	PCR	GP5+/GP6+ FAB 59/64	0/92 (0%) CI 32/92 (35%)	-	-
Hachana, 2010 (209)	Túnez	Congel. Parafina	PCR ISH	L1 (GP, E1) E6/E7(16,18,31,33,52/58)(6,11,16,18,31,33)	0/123 (0%) CI 0/123 (0%) CI	-	-
Aceto, 2010 (57)	Argentina	Parafina	PCR	E6 (16,18)	3/5 CI CM juvenil	-	-
Yavuzer, 2010 (210)	Turquía	Parafina	PCR	MY/GP	0/84 (0%) CI	-	-
Antonsson, 2011 (211)	Australia	Congel.	PCR ISH	FAP 59/64 L1/Esp VPH-18	27/54 (50%) CI 0/27 (0%) CI	1/4 (25%) Mn	-
Aguayo, 2011 (177)	Chile	Parafina	PCR	L1/ Inno-Lipa (16/18)	4/46 (8,7%) CI	-	-
Ghaffari, 2011 (212)	Irán	Congel.	PCR	-	20/67 (30%) CI	-	-
Hedau, 2011 (58)	India	Congel.	PCR qRT-PCR	L1 (MY09/11, GP5+/GP6+) E6-E7 (16)	0/228 (0%) CI 0/142 (0%) Sangre	-	-
Mou, 2011 (213)	China	Fresco	DBH/seq	L1 (MY09/11, GP5+/GP6+)	4/62 (6,5%) CI	0/46 (0%) Mn	-
Silva, 2011 (214)	Brasil	Parafina	PCR	E1 (6,11,16,18)	0/79 (0%) CI	-	-
Baltzell, 2012 (215)	USA	Parafina	ISH PCR-IS	L1Específicos (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,66)	4/70 (5,7%) CI-CIS 2/70(2,9%) CI-CIS	-	-
Chang, 2012 (216)	China	Fresco	PCR/ISH	E6/E7 (6,11,16,18)	0/48 (0%) CI-CIS	3/30 (10%) Pbm	-
Glenn, 2012 (217)	Australia	Congel. Parafina	PCR PCR <i>in situ</i>	E6	25/50 (50%) CI 6/13 (46%) 4/14 (28%) CDIS-CDI	8/40 (20%) CELeche 3/18 (18%) Mn	P=0,000
Frega, 2012 (54)	Italia	Parafina	PCR (SPF10)	INNO-LiPA HPV	9/31 (29%) CI	0/12 (0%) Pbm	P<0,04
Herrera Romano, 2012 (218)	México	Parafina Congel.	PCR	L1 GP5/6 E6 VPH-16	0/118 (0%) CDIS 0/10 (0%) CDIS	0/2 (0%) Lesión pezón	-

IMPPLICACIONES DEL VPH EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES

Autor, año	País	Cons. Muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)	OR
Sigaroodi, 2012 (219)	Irán	Parafina	PCR	L1 GP5+/GP6+ CP FAP	15/58 (25,86%) CI	1/41 (2,41%) Fibroadenomas	OR: 13,95 (95%IC 1,762-110,526) P=0,002
Herrera-Goepfert, 2013 (220)	México	Parafina	PCR	L1 (C1/C2, MY09/11, GP5+/GP6+) E6	8/20 (40%) C.metaplásico	-	-
Hossein, 2013 (221)	Irán	Parafina	PCR	L1 MY09/11	52/150 (34,6%) CI	-	-
Kwong, 2013 (222)	China	Fresco	PCR-RT/seq	L1/E6 (VPH-16/18)	0/94 (0%) CDI 0/8 (0%) CDIS	-	-
Liang, 2013 (223)	China	Congel.	HC2 (13 serotipos VPH-AR)	-	48/224 (21,4%) CI-CIS	6/37 (16,2%) Fibroadenomas	P=0,468
Pereira, 2013 (176)	Argentina	Congel.	PCR RT-PCR	L1(MY09/11,GP5+/GP6+) E6-E7 (16)	16/61 (26%) CI	-	-
Ali, 2014 (224)	Iraq	Parafina	ISH	(16,18,31,33,35,45, 51,82)	60/129 (46,5%) CDI-CLI	3/24 (12,5%) Pbm 0/20 (0%) Mn	P<0,001
Ahangar, 2014 (225)	Irán	Parafina	PCR/seq	L1 (MY/GP5/GP6)	21/65 (32,3%) CI	0/65 (0%)Pbm	-
Corbex, 2014 (174)	Argelia	Parafina	PCR	Primer específicos	6/37 C. inflam. 7/86 C. no inflam. 6/25 CI TN (11,8%) 5/56 CI no TN	-	-
Manzouri, 2014 (226)	Irán	Parafina	PCR-INNO-LiPA	L1 GP5+/GP6+	10/55 (18,2%) CI ductal-lobulillar-medular	7/51 (13,7%) Pbm	P=0,53
Ohba, 2014 (227)	Singapur	Congel.	PCR-RTq	L1	65/209 (31,1%) CI	-	-
Lv, 2014 (228)	China	-	HC II		9/56 cáncer mama		-
Piana, 2014 (229)	Italia	Parafina	PCR	INNO-LiPA HPV (SPF10) L1	6/40 (15%) CI TN 0/40 CI noTN	-	P=0,026
Wang, 2014 (230)	China	Congel.	PCR/seq	Secuenciación masiva paralela	1/7 Cáncer mama	2/2	
Fernandes, 2015 (231)	Venezuela	Fresco	PCR INNO-LiPA	L1 SPF10	10/24 (41,67%) CDI-CDIS-CLI	-	-

Autor, año	País	Cons. Muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)	OR
Fimereli, 2015 (179)	Bélgica	Parafina	PCR+ISH	Secuencia VPH-AR	2/58 (3,4%) CI	-	-
Fu, 2015 (232)	China	Parafina	PCR	E7 de VPH-58	25/169 (14,79%)	1/83 (1,2%)	P=0,001
			ISH		17/169 (10,06%) CI	1/83 (1,2%) Pbm	P=0,008
Li J., 2015 (233)	China	Parafina	PCR	L1 (M09/11; GP5-6 E6/E7 de VPH-16,18	3/187 CI-CDI-CLI	0/92 (0%) Pbm	
Salehpour, 2015 (234)	Irán	Parafina	PCR	L1 GP5+/GP6+ Específicos (6,11,16,18,31)	54/206(26,7%) CI	-	-
Vernet-Tomas, 2015 (235)	España	Parafina	PCR	SPF-10 LiPA25	0/76 (0%) CI	0/2 (0%)	-

CI: carcinoma infiltrante; CIS: carcinoma in situ; CITN: carcinoma infiltrante triple negativo; CInTN: carcinoma infiltrante no triple negativo. Clcon APCx: carcinoma infiltrante de mama con antecedentes de lesión cervical. C. inflam.: carcinoma nflamatorio. C. no inflam.: carcinoma no inflamatorio. CEL: células epiteliales de la leche materna; Pbm: patología benigna de la mama: fibroadenomas, cambios fibroadenomatosos, adenosis esclerosante, papilomas, fibrosis estromal...LD: lavado ductal; C: calostro. PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ISH: hibridación in situ; SB: southern blot; seq: secuenciación; DBH: dot blot hibridación. Cong.=congelado; Cons.= conservación.

Los asiáticos son los que más estudios han realizado al respecto, seguido por los europeos y centro-sudamericanos.

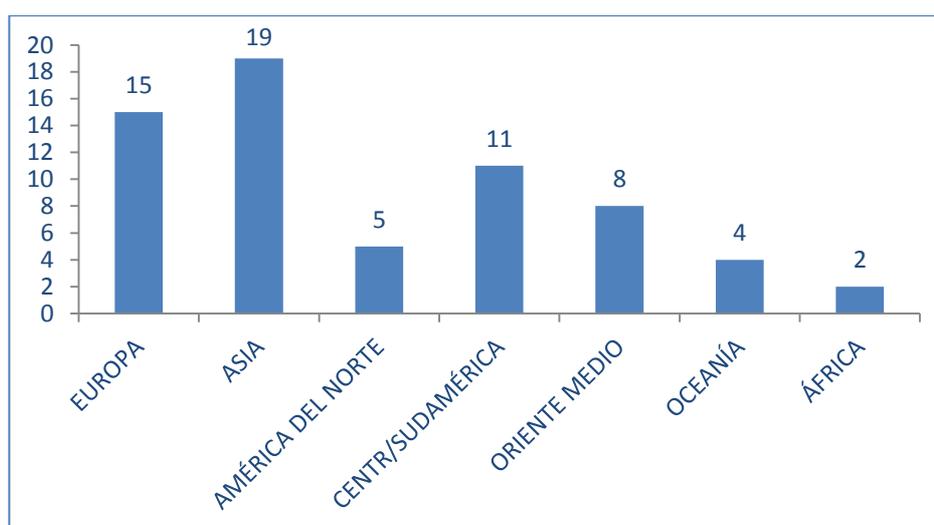


Figura 21: Número de artículos publicados acerca de VPH y cáncer de mama por zonas geográficas.

En cuanto a la prevalencia de VPH en las muestras de tejido mamario, tras la revisión realizada, también se observa una disparidad en los resultados según la región geográfica de que se trate. La principal causa de estas diferencias podría ser los tamaños muestrales recogidos en los mismos. Además, hay que tener en cuenta el reducido número de trabajos en algunas regiones.

Teniendo en cuenta todos los estudios revisados hasta la fecha, la prevalencia de VPH+ en tejido afecto de cáncer de mama es del 19,8% (n=970 VPH+/4.898 casos). Por otro lado, la prevalencia de VPH+ en los controles de los estudios revisados se sitúa en torno al 4,3% (n=36 VPH+/838 muestras de tejido no neoplásico). Desglosado por regiones, estas prevalencias se muestran en la figura 22, donde se aprecia que es Oceanía la región con mayor prevalencia con un 45,41% (n=94/207), seguida de Oriente Medio con un 35,7% (n=301/843) y América del Norte con una prevalencia del 33,92% (n=58 VPH+/171 casos). Asia se sitúa en un 16,25% siendo su tamaño muestral el más amplio de todos, habiendo recogido un total de 1.871 muestras de casos de las cuales 304 son VPH+. Centro-Sudamérica y Europa van parejas, con un 13,5% (n=84/622) y un 12,25% (n=105/857) respectivamente. Por último, se sitúa África con una prevalencia de los casos de 7,3% (n=24 VPH+/327).

En cuanto a los controles, la prevalencia de VPH también difiere. Si había diferencia en los tamaños muestrales de los casos, aquí se hace aún más grande la brecha, ya que por ejemplo en África no hay estudio alguno con controles. La región con mayor número de controles es Asia con 425 controles y la prevalencia en este caso se sitúa en el 3,76% (n=16). Prevalencia parecida a la de Oriente Medio con un 5,47% (n=11 VPH+/201 controles). La prevalencia más alta de VPH+ en los controles la tiene América del Norte con un 35,5%, aunque su tamaño muestral es muy pequeño (n=62). Además, que dentro de los estudios de Norteamérica está el de De Villiers (194), el cual utiliza como control el pezón de la misma mama (dudosa calidad del control) por lo que si se elimina estos controles se obtiene una prevalencia del 6,1% (2/33).

Oceanía tiene un 17,95% (n=7 de 39) de controles con VPH positivo y Europa un 25% (n=64 controles, 16 con VPH+); sin embargo Gumus et al (170), utiliza como controles la mama de la misma paciente pero sin ser tejido afecto de tumor (como de Villiers), por lo que si se excluyen dichos controles la prevalencia en Europa es del 0%. En Centro-Sudamérica no se encontrado VPH+ en sus controles (n=128).

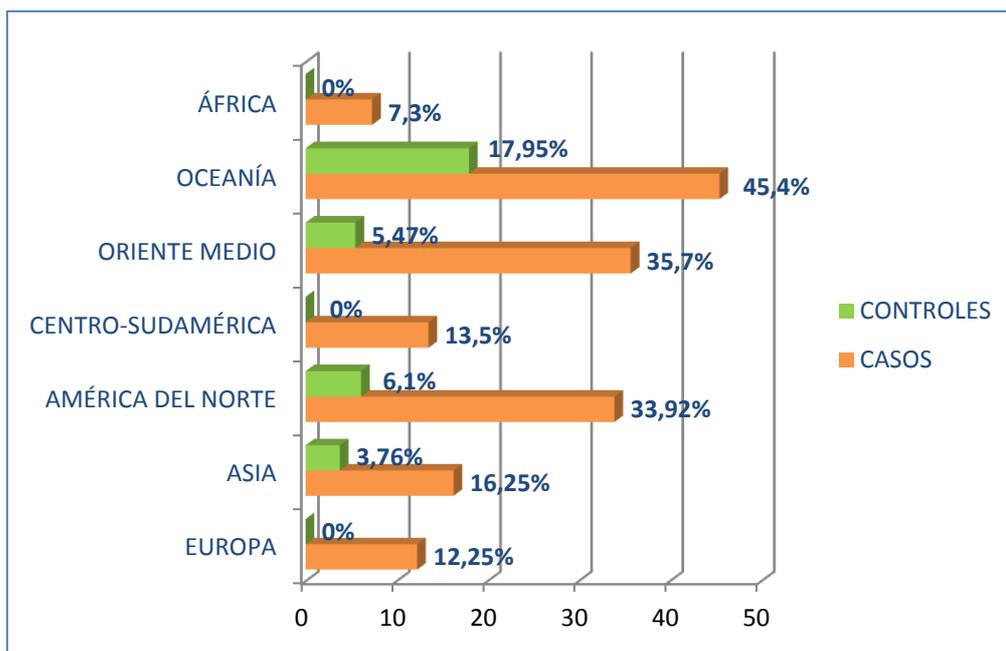


Figura 22: Prevalencia en porcentaje del VPH en las muestras de los casos y de los controles por zonas geográficas.

De la revisión realizada, la mayoría de los estudios no pueden dar una evidencia convincente de la presencia del virus del papiloma humano en el tejido afectado por cáncer de mama. La causa de esto es, en la mayoría de las ocasiones, por los déficits metodológicos como el pequeño tamaño muestral, ausencia de controles, la no descripción de la metodología, etc., lo que hace muy pobre la validez de estos resultados.

Así, dentro de los casos es cierto que la mayoría son carcinomas infiltrantes, pero no definen criterios de inclusión o exclusión. Además, unos estudios incluyen carcinomas in situ (171,187,198,200,202,207,215,216,218,222,223,231,233) y otros no los incluyen o ni siquiera lo especifican. Hay unos pocos que se centran en determinados subtipos histológicos: papilares (181,201), metaplásico (220), o incluso Paget (184). Algunos, buscan la presencia de VPH dividiendo su estudio en dos grupos dependiendo de los antecedentes de patología cervical de las mujeres: son los casos de Hennig o Widschwendter (186,193).

En cuanto a los controles, existe una gran variedad de tejidos utilizados: desde patología benigna de la mama hasta tejido normal bien de la mama, bien del pezón, pasando por células epiteliales de la leche materna.

En cuanto a los serotipos encontrados en todas las zonas geográficas aparece el 16 como el más frecuente, coincidiendo por tanto con el serotipo más frecuente también en el cáncer de cérvix. En la tabla 3 se puede ver los serotipos más frecuentes encontrados por regiones.

Tabla 3: Serotipos de VPH más frecuentes encontrados en tejido mamario en los estudios revisados

Región geográfica	Serotipos más frecuentes
Europa	16, 33
Asia	16, 33
América del Norte	16, 11
Centro-sudamérica	16,18
Oceanía	18
África	16,31
Oriente Medio	16,18,31

Es evidente el interés que suscita el posible rol del virus del papiloma humano en el cáncer de mama, no sólo por su importancia clínica, que la tiene, sino que además implicaría una gran repercusión en el tratamiento, dado que actualmente disponemos de herramientas de prevención primaria contra el VPH. De hecho, recientemente ha renacido el interés debido a la posible prevención del mismo usando la vacuna contra el VPH que se utiliza actualmente como prevención del cáncer de cérvix (137). Además, a pesar de extensas y constantes investigaciones, los factores de riesgo para una proporción significativa de cánceres de mama permanecen sin identificar. Y por otro lado, la exposición de los conductos mamarios al medio ambiente externo aumentaría el riesgo de infección por VPH, porque estos pueden ejercer de “tuberías abiertas”.

En el servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario de Alicante, se abordan en el contexto de la Unidad de Patología Mamaria, entre 190 y 210 carcinomas infiltrantes e in situ al año. Entre las distintas líneas de investigación que dicha unidad está llevando a cabo, parece más que justificado verificar si en nuestro material se cumplen algunos de los criterios de Bradford Hill (60,180) y muchos o pocos de los hallazgos encontrados en la bibliografía revisada.



3. Hipótesis de estudio.

Objetivos

3.1 Hipótesis

Existe una relación entre la presencia de VPH en el tejido mamario y el desarrollo del cáncer de mama.

3.2 Objetivo Principal

Verificar la existencia del virus del papiloma humano en las muestras obtenidas tras cirugías de la mama en el Hospital General Universitario de Alicante, estimando la fuerza de asociación (OR) entre la presencia de VPH en tejido tumoral benigno de mama y el cáncer de mama, durante los años 2006-2012.

3.3 Objetivos secundarios

- 3.3.1. Investigar la presencia de ADN del VPH en lesiones benignas de la mama.
- 3.3.2. Investigar la presencia de ADN del VPH en los cánceres infiltrantes e in situ.
- 3.3.3. Estimar la posible relación entre aquellos cánceres de mama VPH positivos y las diferentes variables anatomopatológicas: tamaño tumoral, grado histológico, estado axilar, invasión linfovascular, metástasis a distancia, estadio tumoral, presencia de neoadyuvancia, receptores hormonales, HER2 y Ki-67.
- 3.3.4. Estimar la potencial correlación del VPH con determinados subtipos inmunohistoquímicos de cánceres de mama (luminal A, luminal B/HER2+, luminal B/HER2-, HER2 puro y triple negativo).
- 3.3.5. En caso de presencia viral, estimar cuál es el serotipo más prevalente en la población estudiada.



4. Material y métodos

4.1 Lugar de realización. Entorno

En la Unidad de Patología Mamaria del Hospital General Universitario de Alicante se diagnostican cerca de 200 casos nuevos de cáncer de mama al año.

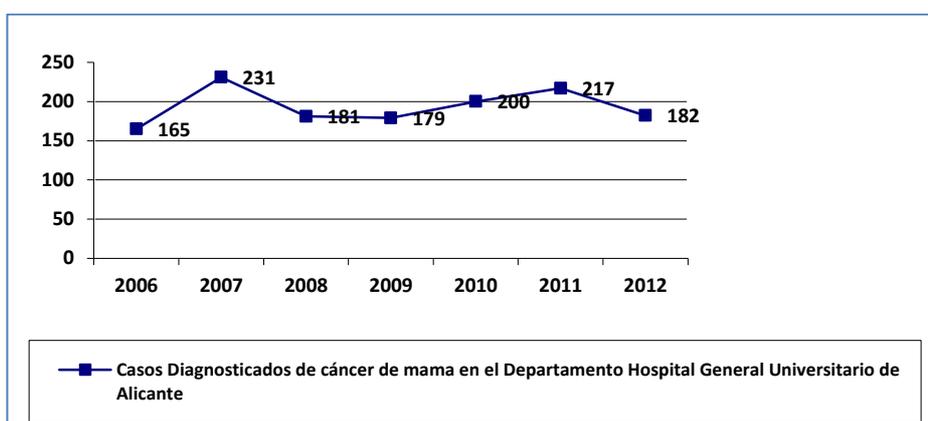


Figura 23: Incidencia de cáncer de mama en el Hospital General Universitario de Alicante 2006-2012.

Una vez que se diagnostica un nuevo caso de cáncer de mama o patología de riesgo, y previo al inicio de cualquier tratamiento, se presenta en el Comité de Tumores de la Unidad donde se toma de manera consensuada una decisión de la actitud terapéutica a seguir. Dicho Comité está formado por médicos especialistas en Radiología, Anatomía Patológica, Ginecología, Oncología y Cirugía Plástica. Además, se informa de los resultados y la evolución de las pacientes con los distintos tratamientos dados.

El estudio se ha llevado a cabo en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario de Alicante, que pertenece al Departamento de Alicante-Hospital General (C/Pintor Baeza s/n 03010, Alicante, España) del Sistema sanitario de la Comunidad Valenciana.

4.2 Diseño del estudio

Para poder comprobar nuestra hipótesis se ha diseñado un estudio observacional controlado, de casos y controles independientes, con estudio ciego de las muestras (el laboratorio donde se realizó la búsqueda del ADN viral no supo si eran casos o controles).

4.2.1. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para establecer el tamaño muestral en un estudio de casos y controles con una proporción uno a uno, hemos de establecer la presencia de la exposición en ambos grupos así como el nivel de confianza y la potencia deseada. Partiendo de una presencia de exposición (presencia de VPH) en los casos del 25% y una proporción del 14% de los controles expuestos, un nivel de confianza del 95% y una potencia de 85%, se necesitaría un tamaño muestral de 250 individuos por grupo para detectar un valor del OR superior a 2. El tamaño de la muestra se ha calculado con el programa Epidat 4.0.

Además, si se estima un 10% de pérdidas de muestras (falta consentimiento, muestra insuficiente por criterio de exclusión o en mal estado, pérdida, etc.) será necesario elevar este tamaño hasta un total de 275 muestras cada grupo.

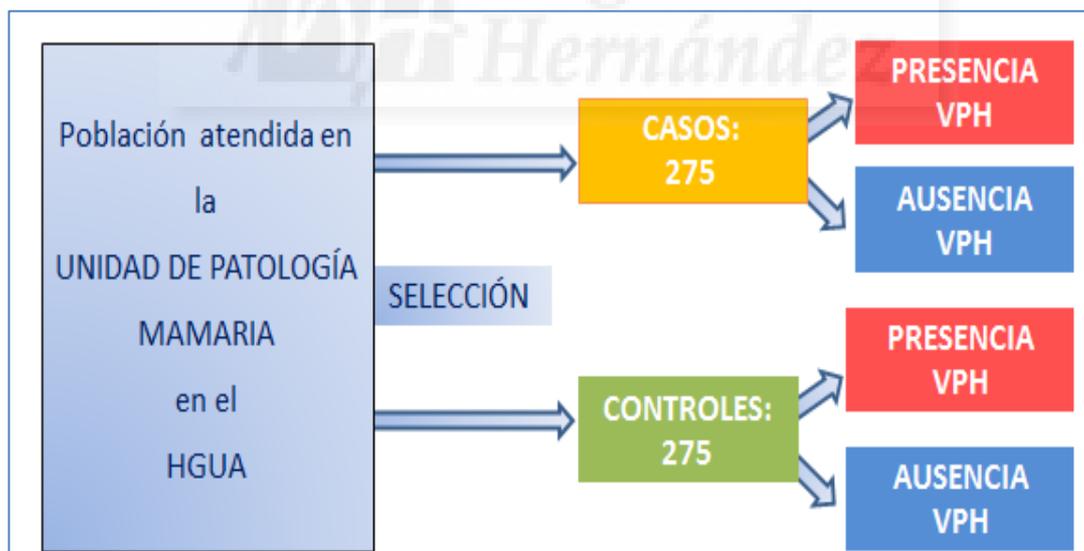


Figura 24: Diseño inicial del estudio

Se ha de tener en cuenta que el cálculo del tamaño muestral se realizó en 2013, cuando se diseñó el estudio, los porcentajes de exposición al VPH en casos y controles se realizaron en base a la literatura existente hasta entonces.

4.2.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

Las muestras de los casos son todas las pacientes operadas en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del HGUA durante los años 2006 al 2012 por patología mamaria maligna que cumpliera criterios de inclusión y no los de exclusión. Los casos fueron obtenidos de la colección del Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante (ver el apartado de consideraciones éticas), iniciando la selección de la muestra en 2012 y avanzando retrospectivamente hasta alcanzar la n calculada. Obviamente, en la selección del Biobanco se tuvieron en cuenta por parte del patólogo aspectos como la cantidad del material conservado y calidad de la muestra. De esta manera, desde el Biobanco de Tumores, en Anatomía Patológica, se seleccionaban las muestras para el corte del bloque de parafina.

Después, se revisaba la historia clínica (con el Consentimiento de Biobanco en la Historia Clínica).

Por otro lado, las muestras de los controles fueron todas las pacientes operadas por patología benigna que cumplieran los criterios de inclusión y no los de exclusión desde 2009 al 2012. De la misma manera que los casos, se inició la selección en 2012 y se fueron seleccionando los controles de manera secuencial retrospectiva hasta alcanzar la n calculada (ver el apartado de consideraciones éticas).

I. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para los casos:

- ✚ Pacientes operadas de un carcinoma infiltrante o in situ de mama en los años 2006 a 2012.
- ✚ Mayores de 18 años.
- ✚ Que el bloque de parafina de la pieza quirúrgica, guardado en el Biobanco de tumores del Hospital General Universitario de Alicante, se encuentre en adecuadas condiciones y en cantidad suficiente para poder obtener la muestra para el estudio. Este punto lo determinó la Médico Especialista en Anatomía Patológica.
- ✚ Disponer del consentimiento informado (Consentimiento de Biobanco de Tumores del Hospital General Universitario de Alicante) para acceder a su historia clínica y entrevista en caso de datos insuficientes en la historia clínica escrita.

Para los controles:

- ✚ Pacientes sometidas a cirugía para resección de lesión benigna entre años 2009 a 2012.
- ✚ Mayores de 18 años.
- ✚ Que el bloque de parafina de la pieza quirúrgica se encuentre en adecuadas condiciones y en cantidad suficiente para poder obtener la muestra para el estudio. Este punto lo determinó la Médico Especialista en Anatomía Patológica.
- ✚ Disponer del consentimiento informado (mediante llamada telefónica, descrito anteriormente) para acceder a su historia clínica y entrevista.

II. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✚ Ser varón.
- ✚ No obtención de los controles de calidad mínimos en las muestras de ADN analizadas.

4.2.3. RECOGIDA DE DATOS

Se diseñó una *base de datos* (Access®) para registrar los resultados de todas las variables.

Cuadro 15: Ventana del formulario de la base de datos para la introducción de datos.

La obtención de los datos se llevó a cabo a través de la historia clínica, y si se precisaba también, la entrevista personal a la paciente bien telefónica o bien presencial (a elegir por ella).

4.2.4. ANÁLISIS DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS

Las piezas quirúrgicas de mastectomía o tumorectomía se fijaron en formol al 10%, y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Para el estudio histológico, se cortaron secciones de 4 micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El estado de la expresión de receptores de estrógenos (RE), de progesterona (RPg), del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y Ki-67 se evaluaron con métodos inmunohistoquímicos (IHQ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, de forma automatizada (Techmate-500), con sistema de visualización de alta sensibilidad Envision FLEX® (DakoCytomation).

Los anticuerpos son: RE (Dako, clon 1D5), RPg (Dako, clon RPg 636), Ki-67 (Dako, clon MIB-1) y Herceptest® (Dako). Para Ki-67 se utilizó el anticuerpo MIB1 (valoración semicuantitativa, de núcleos positivos, en al menos 3 campos de gran aumento (x400). El estudio de los niveles de expresión para RE y RPg se determinó evaluando el porcentaje de núcleos de células neoplásicas teñidas y la intensidad de tinción, de acuerdo con las guías de la Sociedad Americana de Oncología Clínica del 2010 y las directrices del Colegio Americano de Patólogos (236). Se considera positivo si >1% de RE o RPg. Se determinó el estado de HER2 de acuerdo con la Sociedad Americana de Oncología Clínica del 2007 y las directrices del Colegio Americano de Patólogos (237). Un resultado IHQ positivo fue una tinción de 3+ (uniforme, intensidad de la tinción de la membrana de más del 10% de las células tumorales infiltrantes) y un resultado inmunohistoquímico negativo era 0 o tinción 1+. Aquellos tumores con expresión de HER2 de 2+ o "equivocos" (expresión de membrana leve/moderada incompleta o completa en >10% de las células o 3+ en <10%), fueron confirmados con técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH; IqFISH; DakoCytomation) y clasificados como positivo (amplificado) o negativo (no amplificado).

4.2.5. OBTENCIÓN DE ADN VIRAL

Los cortes de los bloques de parafina archivados en el Servicio de Anatomía Patológica del HGUA y en el Biobanco de Tumores del HGUA fueron realizados por una técnico de Anatomía Patológica perteneciente al Biobanco de Tumores, previa selección de los bloques "aptos" (que cumplieran criterios de inclusión) por parte de una Médico Especialista en Anatomía Patológica.

La búsqueda del ADN viral se realizó en un laboratorio externo. Para la obtención del ADN viral en la parafina, se realizaron cortes de 10µ del área tumoral del bloque de parafina por medio de un microtomo. Estas muestras se introdujeron en un tubo eppendorf rotulado con un código

de identificación. Una vez identificadas correctamente, se enviaron a temperatura ambiente (no requiere conservación en frío), cumpliendo todos los requisitos de manipulación de tejidos biológico en transporte seguro al laboratorio de referencia. Cabe señalar que el laboratorio donde se realizó el estudio no supo en ningún momento si las muestras eran casos o controles.

Para evitar la contaminación entre varios ejemplares, se tuvo especial cuidado en la manipulación y corte de las muestras extremando las precauciones de limpieza de cuchillas para evitar la contaminación. Así mismo, como control de calidad interno, se seleccionaron 20 muestras al azar (previamente ya analizadas), 6 meses después del primer análisis, para volver a realizar un segundo análisis y comprobar que los datos fueran semejantes, como así sucedió.

El laboratorio externo es el Instituto de Estudios Celulares y Moleculares, sita en Edificio-CEI NODUS-T5. Avenida de la Coruña, 500. 27003. Lugo. Email: www.e-icm.net. Se ha decidido trabajar con dicho laboratorio dada la amplísima experiencia en estudios moleculares y genéticos. La persona de referencia en dicho laboratorio es el Dr. Alfonso Alba Menéndez.

El procedimiento fue el siguiente:

A. Desparafinación

Se introdujeron 4 o 5 cortes de tejido incluido en parafina en un tubo de 1,5ml, se añadió 1mL de xileno y se mezcló vortexeando 10 segundos, tras incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Después de descartar el sobrenadante, se añadió 1ml de etanol absoluto y se centrifugó 2 min a 13000 rpm, el sobrenadante se desechó una vez más. Se repitió este paso de lavado con etanol todavía una vez más. Por último se incubó, la muestra a 56°C durante 15 minutos para eliminar los restos de etanol.

B. Extracción del ADN

Finalizado el proceso de desparafinación, se agregó 500 µL de buffer de lisis (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5%SDS o dodecilsulfato sódico) y 10µl de proteinasa K (20mg/mil), se mezcló con vórtex y se sometió a incubación en baño con agitación a 56°C durante toda la noche. La proteinasa K fue inactivada mediante incubación a 95°C durante 10 minutos.

Se añadió un volumen equivalente de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) agitando suavemente por inversión, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga.

Se añadieron 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10M. El ADN fue precipitado añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto vortexeando 5 segundos, incubando a -20°C durante 30 minutos y posteriormente centrifugando a 10000 rpm 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μl de etanol al 70% frío, se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm. Después de desechar nuevamente el sobrenadante se secó el precipitado a temperatura ambiente durante 20 minutos. El ADN fue resuspendido en 50 μl de solución TE (Tris-Edta).

C. Cantidad y calidad del ADN

Todas las muestras de ADN fueron analizadas mediante un equipo *Nanodrop 1000*, que permitió calcular la concentración de ADN obtenido y la relación A260/A280 y A260/A230, que informa el nivel de la pureza de la molécula.

D. Capacidad amplificable del ADN

La integridad del ADN extraído fue evaluada mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen del metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

E. Detección y genotipado del VPH

Las muestras fueron sometidas a tres métodos diferentes de detección de VPH:

1.- Amplificación de VPH utilizando los cebadores consenso GP5+/GP6+:

La presencia de ADN de VPH se evaluó mediante PCR utilizando los cebadores GP5+/GP6+ (150 pb), cebadores consenso para el gen VPH L1. La reacción PCR se realizó a partir de 5 μl de ADN en un volumen de reacción total de 50 μl que contenía 25 μl de DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (ThermoFisher Scientific), 1 μM de cada cebador, 0.2mM de DNTPs y 2mM de MgCl_2 . La amplificación se llevó a cabo con la activación inicial de la enzima a 95°C durante 2 min, seguido de 45 ciclos con las siguientes condiciones: 30 segundos a 95°C , 2 min a 40°C y 1,5 min a 72°C ; con un paso de elongación final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en 2% de gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio mediante electroforesis.

2.- Kit de Amplificación CLART HPV2 (GENOMICA)

CLART® Papillomavirus humano 2 detecta la presencia de los 35 virus de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89).

La detección se lleva a cabo mediante la amplificación de un fragmento de unos 450 pb dentro de la región L1 del virus por tratarse de una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH. Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo de virus con sondas específicas. 5µl de ADN de cada muestra se sometieron a PCR utilizando el kit de amplificación CLART HPV2 (Genómica): 1 ciclo 95°C 5 minutos, 40 ciclos 94°C 30 segundos/55°C 60 segundos/72°C 90 segundos, 1 ciclo 72°C 8 minutos. Los productos de PCR fueron desnaturalizados a 95°C durante 10 minutos y colocados en un recipiente con hielo. La hibridación se realizó utilizando 10µl del producto de PCR desnaturalizado en el microarray CLART, y la visualización posterior se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.- Kit HPV Direct Flow CHIP(MASTER DIAGNÓSTICA)

El sistema HPV Direct Flow CHIP permite la detección del virus VPH y el genotipado de 36 tipos de VPH. Se basa en la amplificación del ADN vírico seguido de hibridación Flow-Through en membrana mediante dot blot reverso de los productos amplificados. Tipos de VPH detectados:

- ✚ Alto riesgo u oncogénico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82).
- ✚ Bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84 y 89 (CP6108).

Se amplificaron 6µl de ADN purificado de cada muestra mediante PCR siguiendo las condiciones: 1x ciclo 98°C 5 minutos, 5x ciclos 98°C 5 segundos/42°C 5 segundos/72°C 10 segundos, 45x ciclos 98°C 5 segundos/60°C 5 segundos/72°C 10 segundos, 1x ciclo 72°C 1 minuto. Se mantuvieron los tubos refrigerados a 8-10°C hasta su posterior procesamiento. Se desnaturalizaron los productos de PCR calentando a 95°C 5 min (en termociclador) y se enfriaron rápidamente en hielo durante 2 min.

La hibridación e interpretación de los resultados se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante.

Todas las muestras fueron sometidas a las tres técnicas para aumentar la sensibilidad.

4.2.6. DEFINICIÓN DE VARIABLES

Son 23 variables. Por bloques se dividen en:

A. Variables sociodemográficas:

- ✚ Edad en años al diagnóstico de la patología a estudio.
- ✚ Año del diagnóstico de la patología a estudio.

B. Variables clínicas:

- ✚ Antecedentes personales de cáncer: esta variable se recoge específicamente para cada cáncer; pero posteriormente, para un mejor manejo estadístico, se ha reagrupado en: cáncer de mama si o no.
- ✚ Tabaco: si ha fumado en los 10 años anteriores al diagnóstico de la patología mamaria.

C. Variables obstétrico-ginecológicas:

- ✚ Número de hijos: considerado como número de partos a partir de la 24 semana de gestación.
- ✚ Lactancia materna: medido como el número total de meses que una mujer ha dado lactancia al total de sus hijos.
- ✚ Edad de la menopausia: edad a la que tuvo su última menstruación.
- ✚ Existencia de patología cervical previa, clasificada como: negativa para patología cervical previa, patología cervical previa de bajo grado (ya sea CIN I o L-SIL, presencia de VPH-BR o VPH-AR, ASC-US), patología cervical previa de alto grado (CIN II+), cáncer. Posteriormente se ha reagrupado como negativa o positiva para un mejor manejo estadístico.

D. Variables tumorales:

- ✚ Patología mamaria actual (objeto de este estudio): carcinoma infiltrante, carcinoma in situ, patología con atipia, patología proliferativa sin atipia, patología no proliferativa.
- ✚ Tamaño tumoral: medido en milímetros en la pieza quirúrgica.
- ✚ Grado tumoral (I, II, III).
- ✚ Estadio tumoral. Según la clasificación descrita en el presente trabajo.
- ✚ Porcentaje de positividad de receptores hormonales (estrógenos y progesterona). Estratificado en tres grupos: negativo 0%, 1-19%, y $\geq 20\%$.
- ✚ Ki-67: medido en porcentaje. Estratificado en tres grupos: bajo $< 14\%$, intermedio entre 14-19%, y alto $\geq 20\%$.
- ✚ HER2: medido según lo descrito en análisis de piezas quirúrgicas.

- ✚ Fenotipo inmunohistoquímico (Luminal A, luminal B HER2+, Luminal B HER2-, HER2 puro, triple negativo). Tal y como se ha explicado en el capítulo de factores pronósticos y predictivos, existen todavía dudas acerca del punto de corte del Ki-67 a partir del cual un tumor lo podemos considerar luminal A o luminal B a nivel de inmunohistoquímica, junto a la variable RPg. Por tanto, y tras la exposición dada en dicho apartado, se ha considerado clasificar estos subtipos teniendo en consideración la clasificación de St. Gallen 2015 (92) y de Maisonneuve (103). En la figura 25 se refleja la clasificación utilizada.
- ✚ Neoadyuvancia: si previo a la cirugía ha recibido tratamiento neoadyuvante: si o no.
- ✚ Existencia de ganglios afectados: si tenía o no uno o más ganglios positivos para metástasis.
- ✚ Existencia de metástasis a distancia: si o no.

E. Variables resultado:

- ✚ Existencia de VPH en la muestra: si o no.
- ✚ Serotipos detectados de VPH: según genotipado.
- ✚ Existencia de infección múltiple: si se ha detectado más de un serotipo en cada una de las muestras estudiadas, o no.

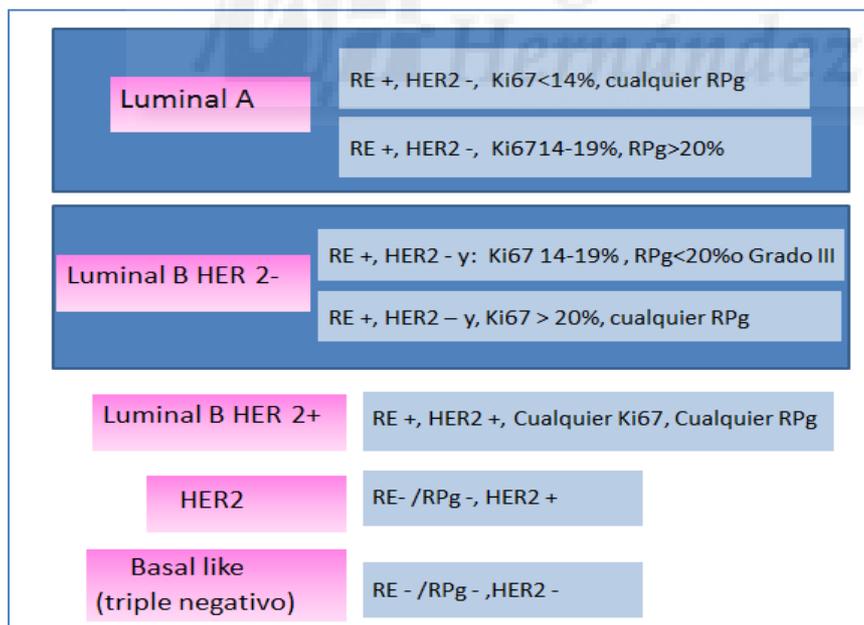


Figura 25: Clasificación IHQ seguida en este estudio.

4.2.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Primero, se ha realizado un análisis descriptivo de todas las variables, calculando tablas de frecuencia y diagramas de barras para las variables cualitativas, y valores mínimo, máximo, medio y desviación típica para las variables cuantitativas tanto para los casos como para los controles.

Para analizar la homogeneidad de ambos grupos, casos y controles, ante las variables que por la literatura se suponen se asocian con el cáncer de mama, se ha procedido de diferentes maneras según la naturaleza de la variable; cualitativa o cuantitativa. En el caso de las variables cuantitativas, como la edad o el número de hijos, se han calculado medias para ambos grupos y comparado mediante el test t-student. Para las variables cualitativas, como el tabaco o tener la menopausia, se han confeccionado tablas de doble entrada y medida su asociación mediante el test chi-cuadrado.

Además, si una de las variables, cualitativa o cuantitativa, se mostraba no homogénea en los casos y los controles, se ha tenido en cuenta a la hora de explicar la falta de homogeneidad para las otras variables. Para ello, se ha calculado la fuerza de la asociación entre los casos y los controles con la variable en cuestión en presencia de aquellas variables que ya han demostrado la falta de homogeneidad en ambos grupos. Este proceso se realizó mediante un modelo de regresión logística binaria que permite explicar la probabilidad de pertenencia al grupo de casos o controles en función de varias variables, ya sean cualitativas o cuantitativas.

Para establecer el grado de asociación entre la exposición al VPH y el cáncer de mama, se ha calculado una tabla de doble entrada entre ambas variables, estimando la magnitud de la asociación mediante el cálculo de Odds Ratio (OR) de aparición de cáncer de mama, y un intervalo de confianza (IC) al 95%.

Sin embargo, el principal problema de los estudios de casos y controles radica en que ambas muestras no provengan exactamente de la misma población y que éstas no sean homogéneas en variables asociadas con la enfermedad. Esto nos puede llevar a pensar que las causas de desarrollar la enfermedad no se deban a la exposición, en este caso al VPH, sino a las propias diferencias en la construcción de los controles. Este sesgo es conocido como sesgo de selección. Por tanto, el control de la falta de homogeneidad se hace fundamental para establecer la correcta asociación entre la exposición y la enfermedad.

En este estudio los controles son tejidos de patología benigna de la mama, y se ha examinado la presencia o no del VPH de igual forma que en los casos (patología maligna de la

mama). Como se constata en la bibliografía revisada y en el estudio de homogeneidad de los casos y los controles, algunas de las variables que se asocian actualmente con el cáncer de mama presentan diferencias entre ambos grupos, principalmente la edad, que afectará a la falta de homogeneidad en otras variables asociadas con el cáncer de mama pero que, al mismo tiempo, también están asociadas con la edad, como por ejemplo el tabaco, el número de partos, ser nulípara o tener la menopausia entre otras. Por tanto, todas ellas serán variables de confusión que hay que controlar ya que afectarán al grado de asociación entre la exposición y la enfermedad.

Es obvio que, por cuestiones éticas, no se puede extraer de manera aleatoria tejido sano (controles) para ser examinado de la población de donde provienen los casos, por lo que éticamente es imposible obtener dos grupos de casos y controles homogéneos. Sin embargo, mediante las herramientas estadísticas disponibles, como es la regresión logística binaria, se puede controlar todos estos efectos de la falta de homogeneidad de los casos y los controles, en variables que se presumen asociadas al cáncer. Además, el modelo de regresión logístico proporciona las OR asociadas a cada variable, por lo que esta herramienta estadística está especialmente indicada para estudios de casos y controles.

La finalidad del modelo de regresión logística binaria consiste en explicar la probabilidad de pertenencia al grupo de casos (tumor maligno de la mama) o controles (tumor benigno) en función de la exposición al VPH y las variables de confusión. Para confeccionar un primer modelo logístico binario y obtener las OR ajustadas por las variables de confusión se trabajó con la técnica de pasos sucesivos hacia delante, introduciendo en el modelo las variables con una significación por debajo de 0,05 y saliendo del modelo si se sobrepasa el 0,10. En una segunda fase para obtener el modelo definitivo, con las variables resultantes del primer modelo que se consideraron significativas, se añadieron las interacciones 2 a 2 entre estas variables.

Se utilizó como soporte informático el programa IBM SPSS Statistics 20.

4.2.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y FINANCIACIÓN

El presente trabajo de investigación respeta en todo momento los principios éticos básicos de la declaración de Helsinki y la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal.

Además, ha pasado el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante y la Gerencia del Hospital (ver anexo 1 y 2).

Para la obtención de los casos, se solicitó consentimiento por parte del CEIC (anexo 3), para que el Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante, nos cediera las muestras de tejido. Para revisar la historia clínica se comprobó en primer lugar, la presencia del Consentimiento de Biobanco en la Historia Clínica. Cabe señalar que en los casos, el Consentimiento de Biobanco permitió el análisis de las muestras sin nuevo consentimiento por parte de la paciente. Este consentimiento de Biobanco se inició en el HGUA a partir de 2009. Por otro lado, antes del 2007 están exentos de petición de Consentimiento de Biobanco (Anexo 4). Por este motivo es por lo que no hay casos del 2008.

Como nota aclaratoria, los Biobancos se definieron por primera vez en el año 2007, en la Ley de Investigación Biomédica (238), como estructuras responsables de almacenar, gestionar y suministrar muestras biológicas de calidad a la comunidad científica para la investigación con el objetivo de preservar los derechos del paciente.

La selección de los controles se inició solicitando a la paciente su consentimiento para poder entrar en el estudio (ya que en estas patologías no se incluyen en el Biobanco). Por tanto, fueron llamadas por teléfono para pedir expresamente su consentimiento y completar la historia clínica mediante preguntas cerradas una vez que aceptaron formar parte del estudio. Para dar el consentimiento informado (anexo 5), debían acudir al Hospital para la firma del mismo. Dado que se trataba de mujeres sanas, la localización por un lado, y que acudieran expresamente a firmar el consentimiento, por otro, fue dificultoso. Finalmente, el CEIC concedió la exención de obtención de consentimiento informado firmado (aceptando el consentimiento telefónico) para este grupo de pacientes (anexo 6), dadas las dificultades y características particulares de estas mujeres (la mayor parte de ellas con vida laboral activa).

Por último, esta tesis recibió financiación por parte de la Asociación de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario de Alicante, para la búsqueda de ADN viral en las muestras de tejido.

4.3 Descripción de la muestra obtenida

El tamaño muestral final del estudio ha sido 437 muestras de las cuales:

- ✚ 251 casos (lo que supone el 57,4% de la muestra) y,
- ✚ 186 controles (que supone el 42,6% de la muestra estudiada).

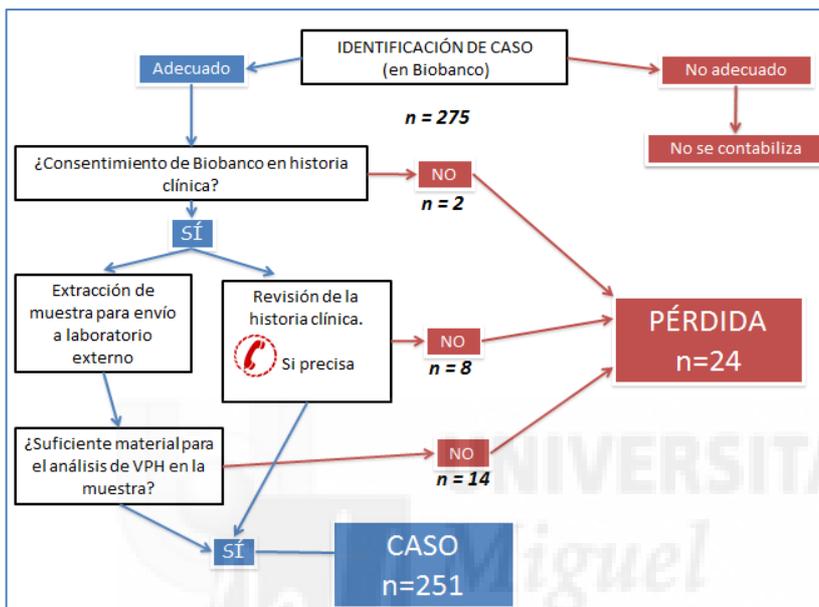


Figura 26: Flujo de casos.

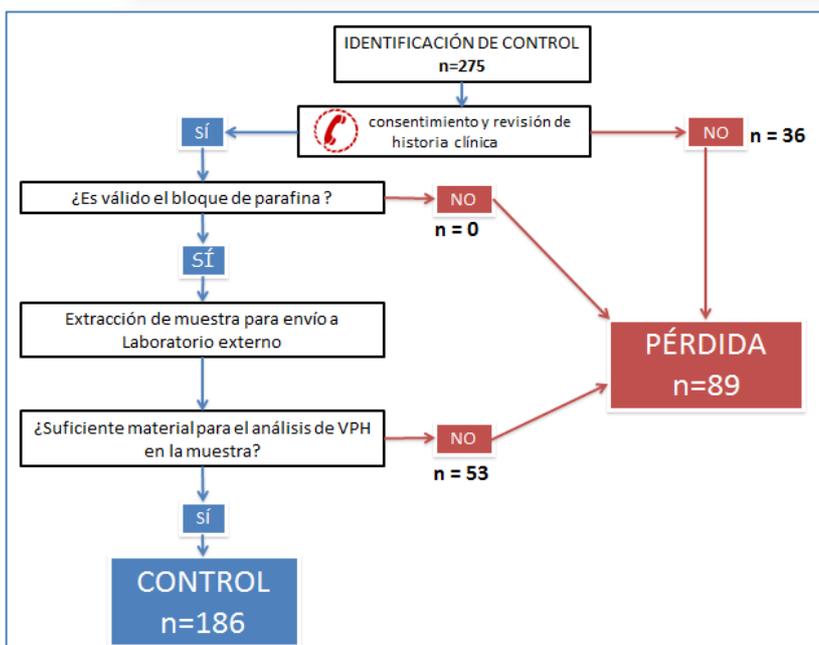


Figura 27: Flujo de controles.

La diferencia en las pérdidas entre los controles y los casos es evidente y tiene sentido ya que se trata de dos perfiles de mujeres totalmente diferentes (figuras 26 y 27).

Los casos requieren un seguimiento en la Unidad de Patología Mamaria (ya sea por parte de Ginecología o por parte de Oncología) y por tanto, son más fácilmente accesibles, sus historias suelen estar más completas y la cantidad de muestra obtenida es mayor. De hecho, sólo fueron 10 muestras las pérdidas por ausencia de datos en la historia clínica, falta del Consentimiento del Biobanco en papel en la Historia Clínica, o no localizada telefónicamente si el caso lo requería (figura 26).

En cuanto a la falta de ADN celular en la muestra remitida al laboratorio externo, fueron 14 las muestras que se procesaron y no se obtuvo material celular alguno (muestra en blanco) y por tanto, no se contabilizaron para evitar posible falso negativo (criterio de exclusión).

Los controles suelen ser mujeres más jóvenes (como más adelante se demuestra), que han tenido este problema de salud (patología mamaria benigna) de manera puntual y, por tanto, más difíciles de localizar. Así, hubo 36 pérdidas en los controles debido a: 2 de ellas no dieron su consentimiento, 2 de ellas fueron desestimadas por incapacidad para comunicarse (1 no hablaba nada de español y la otra era sorda por lo que hablaba a través de su familiar), las 32 restantes no se pudo contactar con ellas, bien porque no respondían el teléfono, bien porque los teléfonos que figuraban (en la historia clínica en papel o en la historia clínica informatizada) no se correspondían con esa paciente, bien porque en el momento del estudio residían en el extranjero y no se les pudo contactar. Además, las muestras guardadas de patología benigna en Anatomía Patológica (no en Biobanco), suelen tener menor cantidad de tejido celular, de ahí que haya muchas más pérdidas en este grupo por material para análisis insuficiente (n=53), ya que no existía en la muestra remitida ADN celular y no pasaba el control interno de calidad (figura 27).

4.3.1. DESCRIPTIVO DE LOS CASOS

En la población estudiada hay 251 casos. La edad media de los casos es de 56,32 años y tienen 1,9 hijos de media. La media, en meses, de lactancia materna ha sido 8,65 meses. La edad media de la menopausia 48,89 años. Por último, el valor medio del tamaño tumoral ha sido de 29,49mm (tabla 4).

Tabla 4: Descriptivo de las variables cuantitativas de los casos.

	N	Media	IC 95%	
			Inferior	Superior
Edad	251	56,32	54,76	57,88
Nº de hijos	250	1,92	1,76	2,09
Lactancia (meses)	191	8,65	7,16	10,15
Edad Menopausia	140	48,89	48,16	49,61
Tamaño tumoral (mm)	249	29,49	26,99	31,99

En cuanto a las variables cualitativas analizadas (tabla 5), dentro de los carcinomas infiltrantes, 197 (78,5%) fueron carcinoma infiltrante de tipo no especial (ductal), 27 (10,8%) carcinomas infiltrantes lobulillares y 27 (10,8%) carcinomas ductales in situ (figura 28).

Tabla 5: Descriptivo de las variables cualitativas de los casos.

		Frecuencia	Porcentaje
Patología mamaria	CDI	197	78,5%
	CLI	27	10,8%
	C in situ	27	10,8%
Tabaco	Si	93	37,7%
	No	154	62,3%
Antecedentes personales de cáncer de mama	Si	12	4,8%
	No	239	95,2%
Número de hijos	Nulipara	46	18,4%
	Uno	31	12,4%
	Dos	106	42,4%
	Tres o más	67	26,8%
Lactancia materna en meses	Si	157	82,2%
	No	34	17,8%
Mujer menopáusica	Si	152	62%
	No	93	38%
Patología cervical	Negativa	156	95,7%
	Riesgo	7	4,3%

Tabla 5 (continuación): Descriptivo de las variables cualitativas de los casos.

		Frecuencia	Porcentaje
Grado histológico	Grado I	30	12%
	Grado II	105	42,2%
	Grado III	114	45,8%
Invasión linfovascular	Si	43	17,1%
	No	208	82,9%
Neoadyuvancia	Si	33	13,1%
	No	218	86,9%
Ganglios axilares positivos	Si	104	41,4%
	No	147	58,6%
Metástasis	Si	10	4%
	No	241	96%
Estadio	0	25	10,2%
	IA	51	20,7%
	IB	1	0,4%
	IIA	78	31,7%
	IIB	45	18,3%
	IIIA	32	13%
	IIIC	3	1,2%
	IV	11	4,5%
Receptores de estrógenos	0	39	15,7%
	1-19%	4	1,6%
	≥ 20%	205	82,7%
Receptores de progesterona	0	51	20,6%
	1-19%	37	14,9%
	≥ 20%	160	64,5%
HER2	Postivo	43	17,7%
	Negativo	200	82,3%
Ki-67	< 14	84	34,1%
	14-19	71	28,9%
	≥ 20	91	37%
Fenotipo inmunohistoquímico	HER2 +	12	4,8%
	LUMINAL A	88	35,1%
	LUMINAL B HER2-	83	33,1%
	LUMINAL B HER2+	35	13,9%
	TRIPLE NEGATIVO	24	9,6%

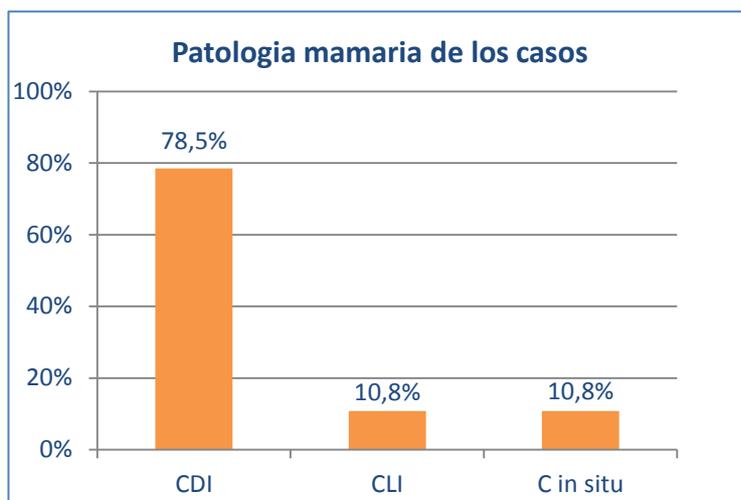


Figura 28: Decriptivo de la variable patología mamaria de los casos.

El 37,7% de los casos fuma. Dentro de los casos, hay 12 mujeres (4,8%) que han tenido el antecedente de cáncer de mama. De esas, cinco habían tenido previamente un in situ, tres fueron nuevos cánceres primarios (una de estas muestras es un medular), una muestra fue un cáncer contralateral (BRCA2 positivo) y tres de ellas fueron recidivas.

La mayor parte de la muestra de los casos ha tenido 2 hijos (42,4%), tres o más hijos un 26,8% y por último las nulíparas y las que han tenido un hijo, el 18,4 y 12,4% respectivamente. El 82,2% de las mujeres de los casos han dado lactancia materna en algún momento de su vida. La mayoría son menopáusicas (62%). Por último, de las mujeres que se habían hecho alguna vez una citología, el 95,7% no ha tenido patología cervical alguna.

Dentro de las variables específicas de los casos se encuentran el grado histológico, la invasión linfovascular, la afectación ganglionar, las metástasis a distancia, la neoadyuvancia, los receptores hormonales, el Ki6-67, el estadio y el fenotipo inmunohistoquímico (tabla 5).

✚ GRADO HISTOLÓGICO

Dentro de la variable grado histológico, el 12% fueron grado I, el 42,2% fueron grado II y el 45,8% fueron grado III. Dentro de los carcinomas infiltrantes, la mayoría fueron grado II y III. Dentro de los in situ los de grado III fueron los más frecuentes (figura 29).

Tabla 6: Descriptivo de la variable grado histológico estratificado en carcinomas in situ e infiltrantes.

	N (%)	C. Infiltrante		C. in situ	
		n	%	n	%
Grado I	30(12%)	22	9,9%	8	29,6%
GRADO Grado II	105 (42,2%)	98	44,1%	7	25,9%
Grado III	114 (45,8%)	102	45,9%	12	44,4%

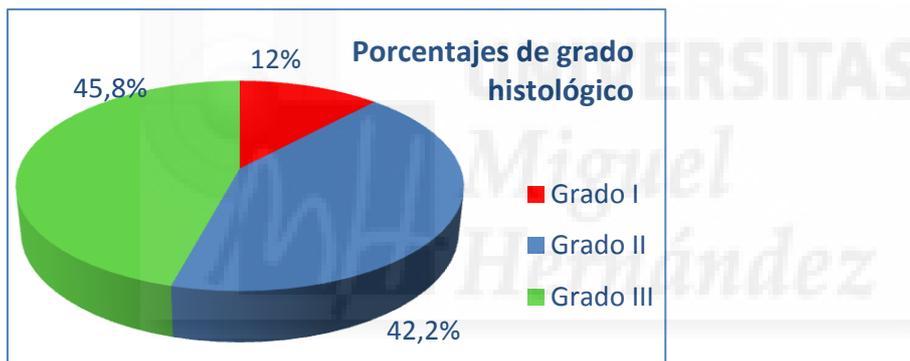


Figura 29: Descriptivo de la variable grado histológico.

- ✚ INVASIÓN LINFOVASCULAR, AFECTACIÓN GANGLIONAR, METÁSTASIS A DISTANCIA Y NEOADYUVANCIA (tabla 5).

El 82,9% (n=208) de los casos de la muestra, no presentaron invasión linfovascular, mientras que el 17,1% (n=43) sí que la presentaron (figura 30). En cuanto a la neoadyuvancia, el 13,1% de los casos (n=33) llevaron quimioterapia neoadyuvante previa a la cirugía (figura 31). El 58,6% (n=147) no presentaron afectación axilar tras la cirugía (detectada ésta mediante ganglio centinela o bien linfadenectomía axilar) (figura 32). Por último, sólo el 4% (n=10) de las pacientes presentaron metástasis al diagnóstico tal y como se representa en la figura 33.

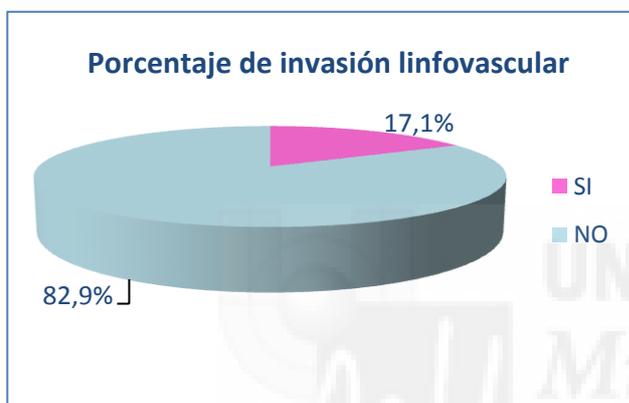


Figura 30: Porcentaje de invasión linfovascular en la muestra.

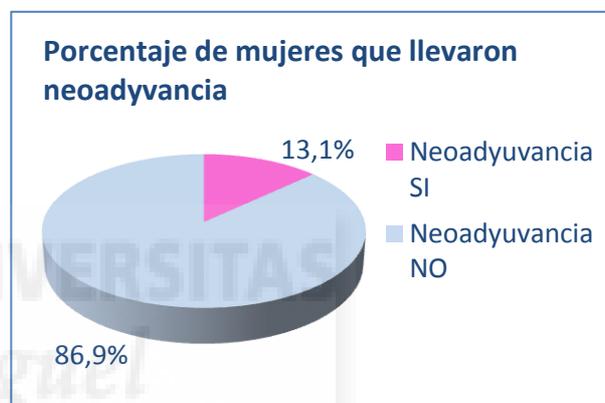


Figura 31: Distribución de los casos según hubiera llevado tratamiento neoadyuvante.

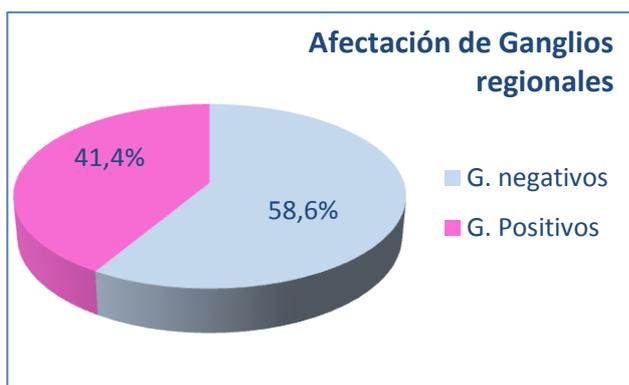


Figura 32: Distribución de los casos según la afectación axilar.

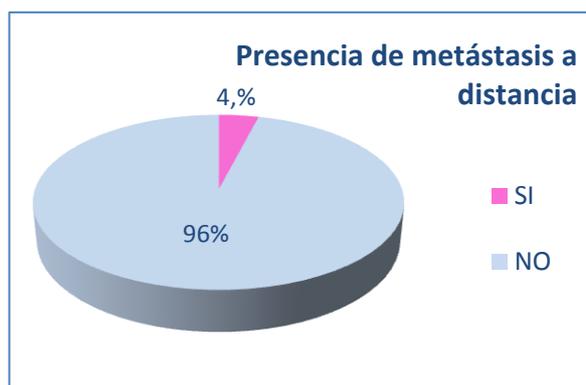


Figura 33: Distribución de los casos con metástasis a distancia.

✚ ESTADIO

En la tabla 5 y figura 34, se observa la distribución de los casos según estadio tumoral según St. Gallen 2013 (93). El estadio más frecuente al diagnóstico fue el IIA, seguido del IA y del IIB, todos ellos dentro de la enfermedad inicial.

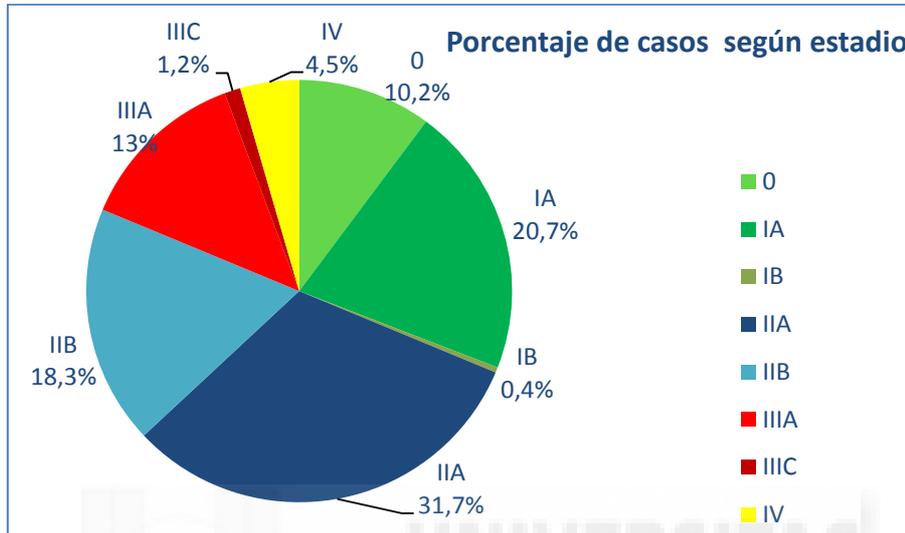


Figura 34: Distribución de los casos por estadio tumoral.

✚ BIOMARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICA: RE, RPg, HER2 Y Ki-67.

Para las variables receptores de estrógenos y receptores de progesterona se ha estratificado en tres grupos: receptores negativos, receptores positivos de 1-19%, y receptores hormonales positivos >20%. Así, como se puede observar en la tabla 5 y figura 35, la mayoría de los tumores expresan receptores hormonales.

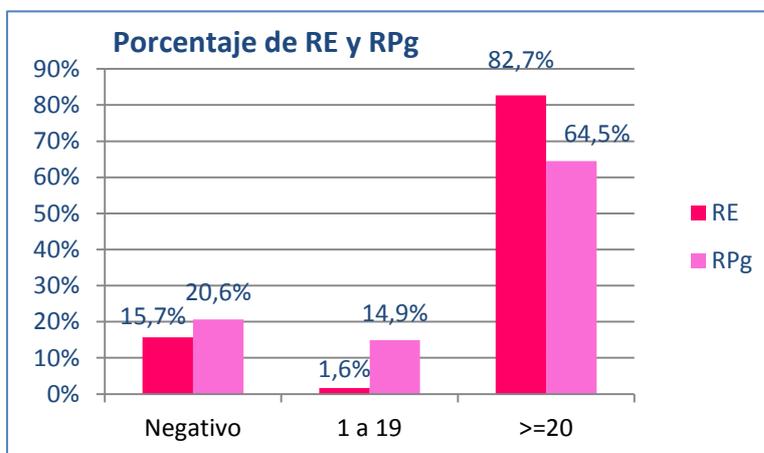


Figura 35: Representación de los porcentajes de Receptores de estrógenos y progesterona en la muestra.

En cuanto a la expresión de HER2, un 17,7% de las muestras de los casos fueron positivas (sobrexpresión o amplificación) (tabla 5, figura 36). Cabe recordar que no todos los cánceres HER2 positivo se incluyen en el grupo HER2 puro ya que hay un subgrupo que coexpresan receptores hormonales.

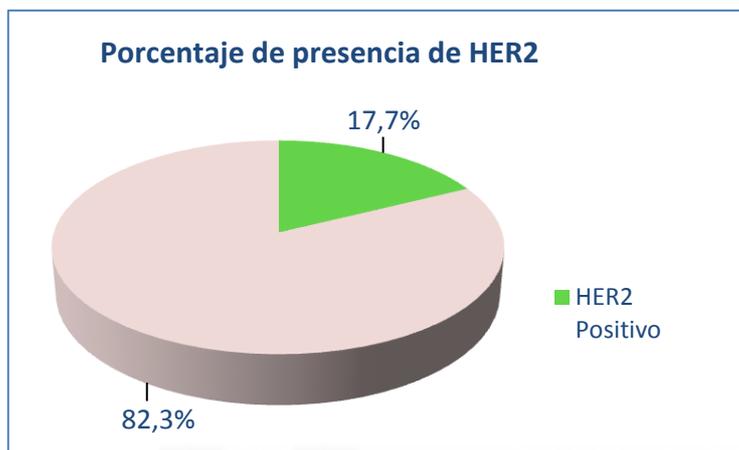


Figura 36: Representación de la presencia del HER2 en la muestra.

Por último, está el índice de proliferación celular reflejado por la expresión de Ki-67, que se ha estratificado en tres grupos (tabla 5) como se muestra en la figura 37: el 34% (n=84) presentaron un Ki-67 bajo (Ki-67<14%), en el 28,7% (n=71) presentaron un Ki-67 intermedio (Ki-67=14-19%), y un 37,2% (n=92) presentaron un Ki-67 alto (>20%).

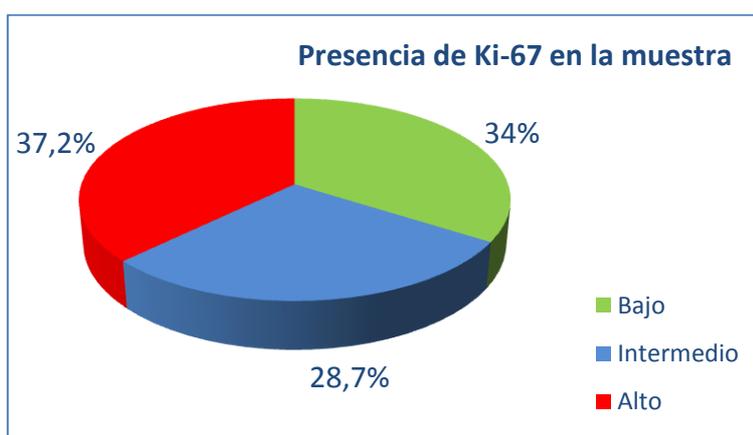


Figura 37: Representación de los porcentajes de Ki-67 en la muestra.

✚ FENOTIPO INMUNOHISTOQUÍMICO

En la tabla 5 y figura 38, se observa la distribución de los casos según perfil inmunohistoquímico. Como es de esperar, la mayoría de los tumores son luminales, si bien es cierto que existe un porcentaje no desdeñable de luminales B. Probablemente sea debido a la clasificación aplicada en el presente estudio tal y como se ha explicado en apartados anteriores.

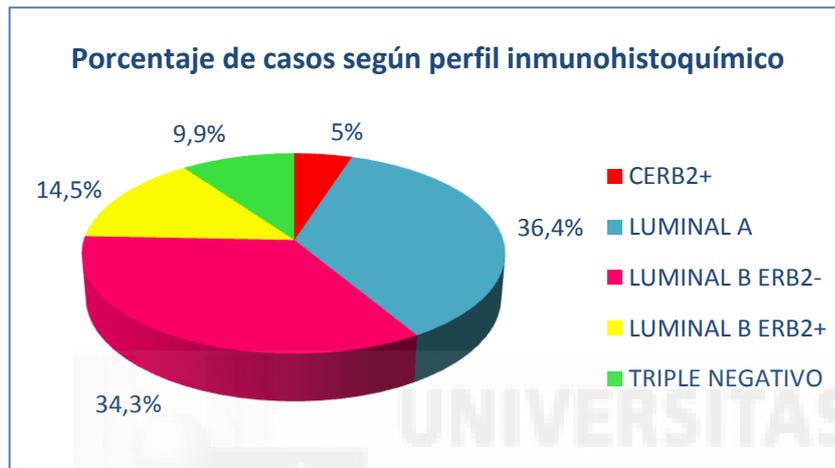


Figura 38: Distribución de los casos según perfil inmunohistoquímico.

4.3.2. DESCRIPTIVO DE LOS CONTROLES

Por otro lado, se han recogido 186 controles. La edad media de los casos es de 40 años y tienen 1,3 hijos de media. La media en meses de lactancia materna ha sido 9,42 meses. La edad media de la menopausia 48 años. Por último, el valor medio del tamaño tumoral ha sido de 31,83mm (tabla 7).

Tabla 7: Descriptivo de las variables cuantitativas de los controles.

	N	Media	IC 95%	
			Inferior	Superior
Edad	186	40,08	38,3	41,86
Nº de hijos	185	1,3	1,11	1,50
Lactancia (meses)	115	9,42	6,92	11,92
Edad Menopausia	36	48	46,47	49,53
Tamaño tumoral (mm)	98	31,83	29,31	34,34

Tabla 8: Descriptivo de las variables cualitativas de los controles.

		Frecuencia	Porcentaje
Patología mamaria	L. prol. atipia	18	9,7%
	L. prol no atipia	54	29%
	L. no prol no pat	114	61,3%
Tabaco	Si	103	56,3%
	No	80	43,7%
Antecedentes personales de cáncer de mama	Si	1	0,5%
	No	185	99,5%
Número de hijos	Nulipara	65	35,1%
	Uno	44	23,8%
	Dos	51	27,6%
	Tres o más	25	13,5%
Lactancia materna en meses	Si	94	81,7%
	No	21	18,3%
Mujer menopáusica	Si	36	19,7%
	No	147	80,3%
Patología cervical	Negativa	146	91,8%
	Riesgo	13	8,2%

En cuanto a las variables cualitativas analizadas (tabla 8), de los 186 controles, 18 (9,7%) son lesiones proliferativas con atipia, 54 son lesiones proliferativas sin atipia (29%) y 114 (61,3%) son lesiones no proliferativas (figura 39).

El 55,4% de los controles fuma. Dentro de los controles, hay 1 mujer (0,5%) que ha tenido el antecedente de cáncer de mama (carcinoma ductal in situ). En cuanto al número de hijos, el grupo más numeroso son las nulíparas (35,1%).

El 81,7% de las mujeres de los controles donde se ha recogido la variable lactancia, han dado lactancia materna en algún momento de su vida. La mayoría no son menopáusicas (80,3%). Por último, el 91,8% de las mujeres de los controles que se habían hecho alguna vez alguna citología, no han tenido patología cervical alguna (tabla 8)

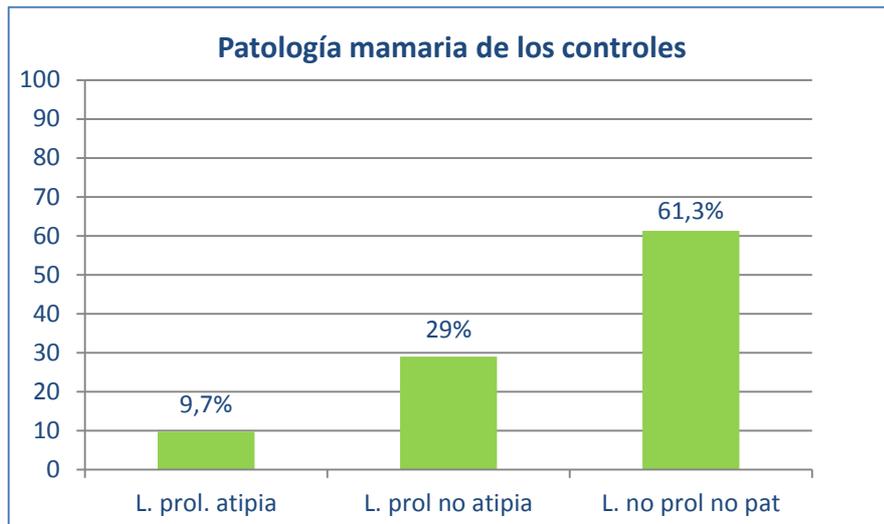


Figura 39: Descriptivo de la variable patología mamaria de los controles.

Entre las patologías de los controles, tabla 9, las más significativas fueron por orden decreciente (figura 40): los fibroadenomas, las galactoforitis, hiperplasias con atipia, hiperplasias sin atipia, las cicatrices radiales y los fillodes.

Tabla 9: Descriptivo de la patología mamaria de los controles desglosada por patología.

LESIÓN MAMARIA BENIGNA	N	Porcentaje
Adenoma	1	0,5%
Cicatriz radial	15	8,1%
Esteatonecrosis	1	0,5%
Fibroadenoma	78	41,9%
Fibrosis/inflamación crónica	4	2,15%
Fillodes	13	7%
Galactoforitis	22	11,8%
Harmatoma	1	0,5%
Hiperplasia sin atipia	18	9,68%
Hiperplasia con atipia	18	9,68%
Mama supernumeraria	2	1,1%
Mastopatía	1	0,5%
Papiloma intraductal	7	3,8%
Quiste infundibular	5	2,7%

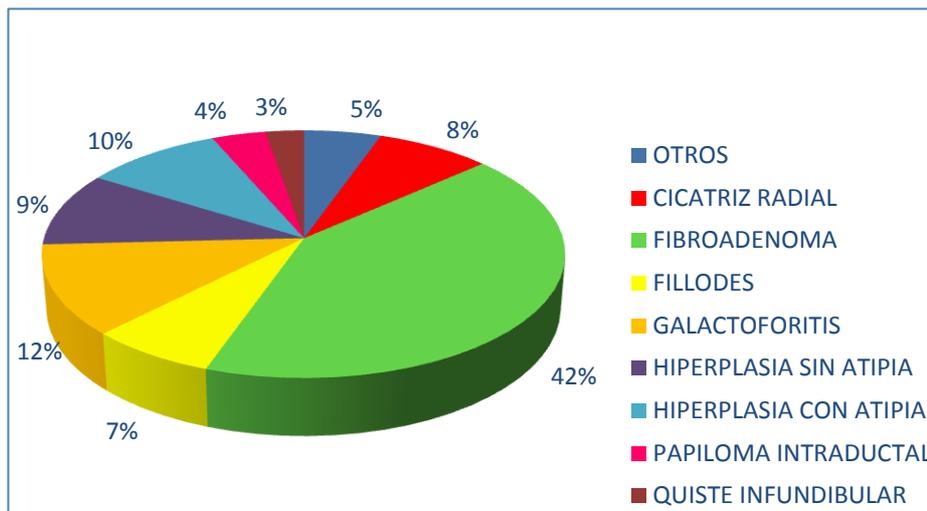


Figura 40: Distribución en porcentaje de las diferentes patologías benignas en el grupo de control de la muestra a estudio.

4.3.3. HOMOGENEIDAD DE CASOS Y CONTROLES

a. EDAD

La edad media del grupo de los casos (n=251) es de 56,3 años y la de los controles fue de 40,1 años (n=186), es decir 16 años más joven, existiendo diferencias significativas ($p < 0,001$). Por tanto, no son homogéneos. Tiene sentido, ya que como se ha explicado en el apartado de factores de riesgo para el cáncer de mama, éste aumenta con la edad (casos), mientras que la patología benigna de la mama (grupo control) suele darse en mujeres más jóvenes (ver tabla 10 y figura 41) y por tanto no se puede homogeneizar los grupos.

Tabla 10: Distribución de la muestra de estudio por la variable edad.

	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Media	Diferencia de medias	p-valor
EDAD	Caso	251	23	88	56,3	16,2	< 0,001
	Control	186	18	76	40,1	16,2	

Si se estratifica esta variable por grupos de edades, también existen diferencias significativas (tabla 11) entre los casos y los controles. Esto es así dado que la historia natural del cáncer de mama no es semejante a la de la patología benigna. Como se ha citado anteriormente, a mayor edad, mayor riesgo de cáncer de mama y por tanto mayor prevalencia de esta enfermedad. Sin embargo, se puede observar en las figuras 41 y 42 cómo las curvas del cáncer de

mama y de patología mamaria benigna por edad descritas por la OMS son superponibles al estudio presentado.

Tabla 11: Distribución de la muestra de estudio por la variable edad estratificada.

Grupos de edad	Casos			Controles		p-valor
	N	n	%	n	%	
< 40 años	109	19	7,6%	90	48,4%	<0,001
40-49 años	119	60	23,9%	59	31,7%	
50-59 años	97	72	28,7%	25	13,4%	
≥ 60 años	112	100	39,8%	12	6,5%	

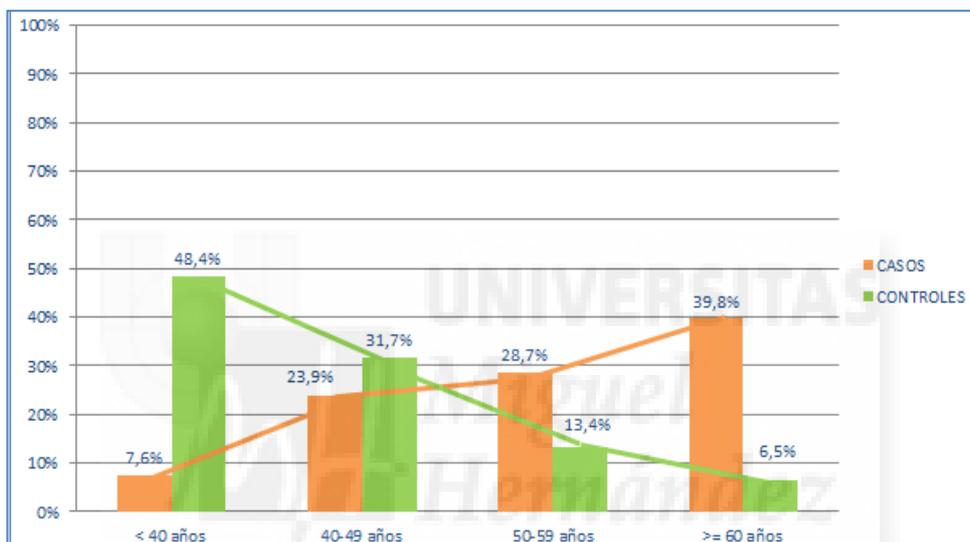


Figura 41: Distribución de la población del estudio casos/controles por franjas de edad.

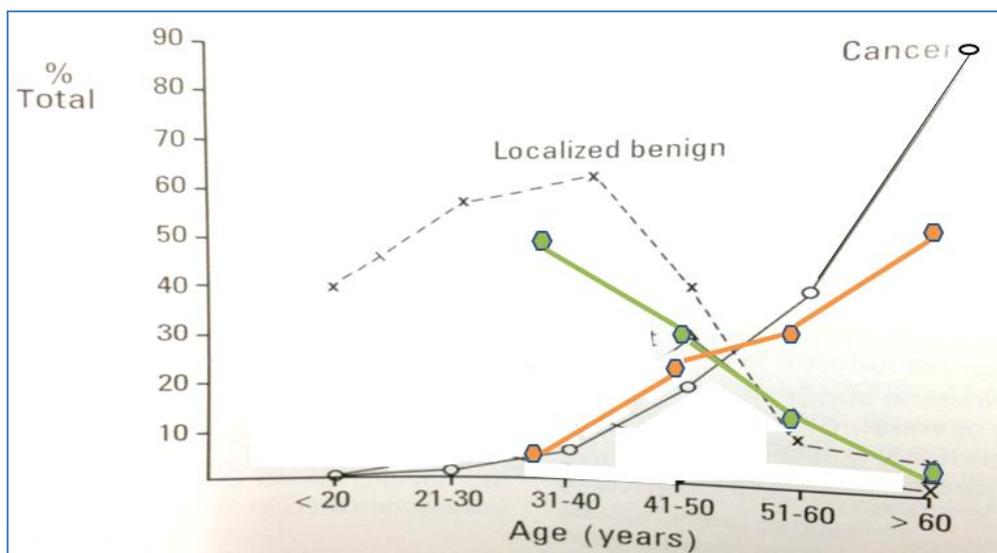


Figura 42: Distribución en porcentaje por edad de las patologías mamarias según la OMS 2012 (4).

b. TABACO

Tabla 12: Exposición al tabaco de los casos y controles.

Tabaco		Casos			Controles		p-valor	P ajustada a la edad
		N	n	%	n	%		
Tabaco	Si	196	93	37,7%	103	56,3%	<0,001	0,446
	No	234	154	62,3%	80	43,7%		

Existe una mayor proporción de fumadoras entre los controles (56,3%, n=103) que entre los casos (37,7%, n=93) tal y como se muestra en la tabla 12 y figura 43. Este resultado significativo estadísticamente hablando, pierde su significación cuando se ajusta a la edad (medida tanto en variable continua como estratificada). Quizás esto se debe a que la población de controles es más joven que la de los casos como ya se ha demostrado.

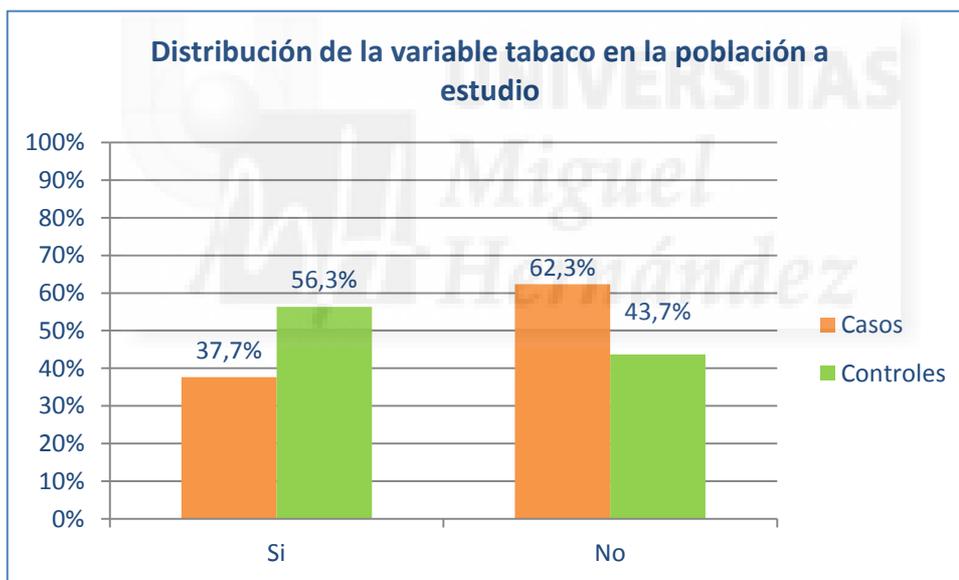


Figura 43: Distribución de la variable tabaco en la población a estudio.

Según el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, en su Informe a las Cortes Generales de evaluación del impacto sobre la Salud Pública de la Ley 42/2010 (239), la población joven fuma más que la más mayor. De hecho, el pico de máxima prevalencia de población fumadora o exfumadora se da entre los 45-54 años siendo del 54,5% la población fumadora. A partir de aquí, entre los 55 y 64 años la prevalencia cae a un 34,7% y a partir de 65 años cae a un 13,2%. Como se puede observar en la figura 44, las curvas de la población estudiada (casos en

naranja y controles en verde obtenido a partir de la tabla 13) son semejantes a la población española (línea azul obtenida del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad).

Tabla 13: Exposición al tabaco de los casos y controles estratificada por edad.

Grupo	Tabaco	GRUPOS DE EDAD (frecuencias)			
		< 40 años	40-49 años	50-59 años	≥ 60 años
Controles	Si	51	39	12	1
	No	38	19	12	11
Caso	Si	9	35	33	16
	No	10	25	39	80

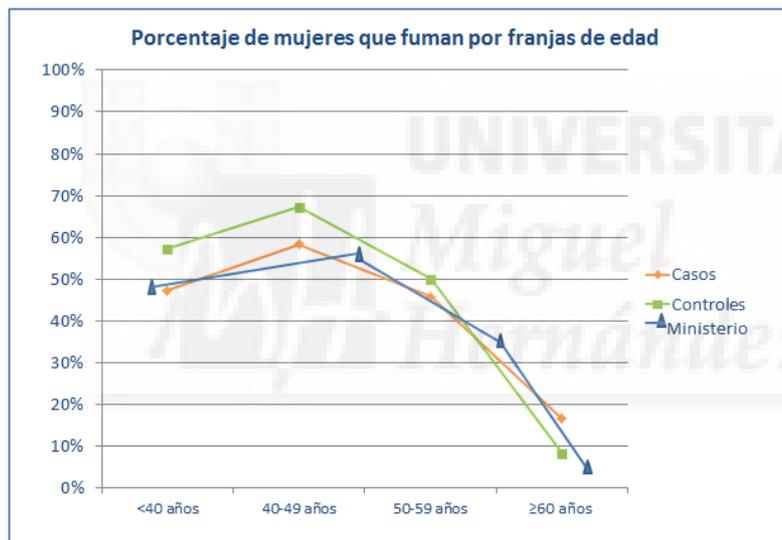


Figura 44: Porcentaje de mujeres fumadoras o exfumadoras de los casos, de los controles y de la población española obtenida del Ministerio de Salud, Servicios Sociales e Igualdad, 2011 (239).

c. ANTECEDENTES PERSONALES DE CÁNCER DE MAMA

El 4,8% (n=12) de los casos ha tenido previamente cáncer de mama mientras que sólo el 0,5% (n=1) de los controles había padecido previamente este carcinoma, siendo las diferencias estadísticamente significativas (p=0,009), (tabla 14, figura 45). Aplicando un modelo logístico ajustado a la edad, pierde significación (p=0,086).

Tabla 14: Distribución en la población a estudio de los antecedentes personales de cáncer de mama.

Antecedentes Personales de cáncer de mama	Casos			Controles		p-valor	P ajustada a la edad
	N	n	%	N	%		
Si	13	12	4,8%	1	0,5%	0,009	0,086
No	424	239	95,2%	185	99,5%		

Estas diferencias casan dentro de la literatura existente dado que haber padecido cáncer de mama aumenta el riesgo de padecer otro cáncer de mama o de recidiva.

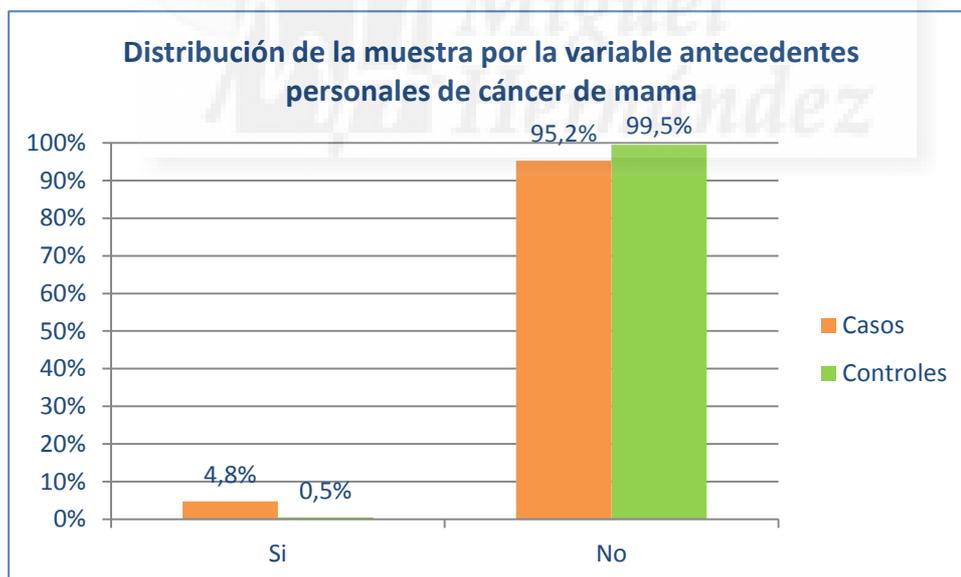


Figura 45: Distribución de la población de estudio por antecedentes personales de cáncer de mama.

d. NÚMERO DE HIJOS

En la población del estudio, la media del número de hijos de los casos es superior a la de los controles con significación estadística. Esta significación se pierde al ajustarlo por edad (tabla 15).

Tabla 15: Comparación de las medias del número de hijos entre casos y controles.

	Grupo	N	Media	Diferencia de medias	p-valor	P ajustada a edad
Número de hijos	Casos	250	1,92	0,621	<0,001	0,463
	Controles	185	1,3	0,621		

Transformando esta variable en dicotómica (nulípara o 1 o más hijos), la proporción de mujeres con cáncer de mama que han tenido algún hijo es mayor (81,7%, n=205) que en los controles, donde el 65,1% (n=121) han tenido uno o más hijos (tabla 16 y figura 46). Estas diferencias también son significativas.

Todo esto induciría a pensar que hay mayor proporción de cáncer de mama entre las mujeres que han tenido hijos que entre las que no, y por tanto iría en contra de la literatura existente donde se sabe, tal y como se ha expuesto en apartados previos, que la nuliparidad es un factor de riesgo.

Estos resultados se pueden explicar porque las edades medias entre los casos y controles no son homogéneas tal y como se ha explicado previamente. En el grupo de los casos, la edad media es 16 años mayor que los controles y por tanto habrá más carcinoma de mama ya que va implícito a la edad. De hecho, al aplicar un modelo logístico ajustado a la edad, pierde la significación.

Además, como se expuso anteriormente, ser nulípara supone factor de riesgo con respecto aquellas mujeres que han tenido hijos (riesgo relativo de 1,16). Sin embargo, el efecto protector del embarazo no se inicia hasta 10 años después del primer parto (28,32). Esto junto con alguna otra variable, como la edad a la que se tuvo el primer hijo, puede haber influido en los resultados.

Tabla 16: Distribución de la población de estudio según paridad.

Nº partos		Casos			Controles		p-valor	P ajustada a edad
		N	n	%	N	%		
	Nulípara	111	46	18,3%	65	34,9%	< 0,001	0,465
	Uno o más	326	205	81,7%	121	65,1%		

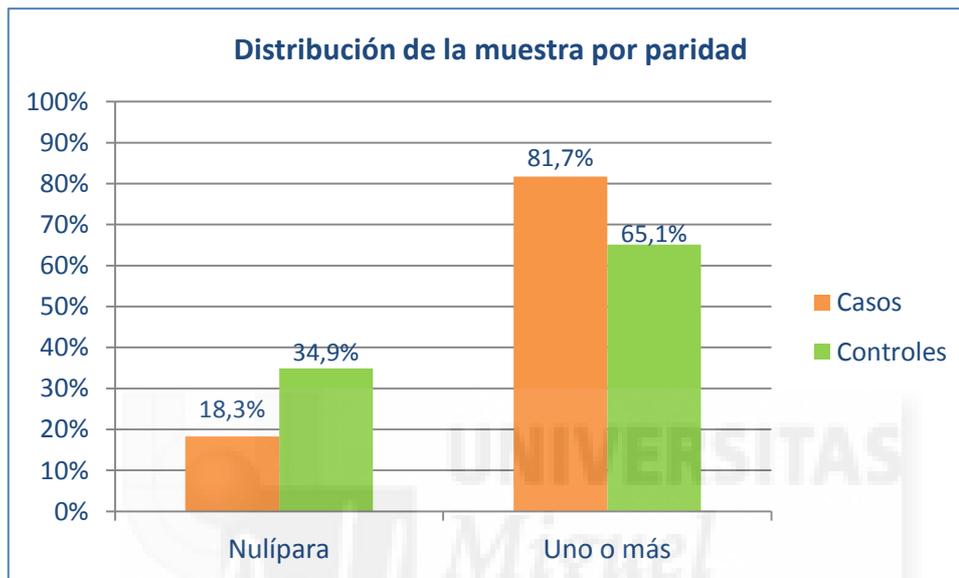


Figura 46: Distribución de la población de estudio según paridad.

e. LACTANCIA

Los casos han lactado de media casi un mes menos que los controles sin que los resultados sean significativos (tabla 17). Como se ha expuesto en el apartado de introducción, la lactancia materna tiene un efecto protector sobre el cáncer de mama, sobre todo a partir de los 12 meses de lactancia. En el presente trabajo no se ha encontrado tal efecto protector entre los casos y los controles siendo los grupos homogéneos (tabla 18). Los porcentajes de mujeres que han dado lactancia materna entre los casos (82,2%, n=157) y los controles (81,7%, n=94) son muy similares. Esta variable tampoco sale significativa cuando se estratifica en menos de 12 meses o más de 12 meses de lactancia, si bien es cierto que la p disminuye mucho al ajustarlo por edad (tabla 18 y figura 47).

Tabla 17: Comparación de medias de los meses de lactancia de los casos y de los controles.

	Grupo	N	Media	Diferencia de medias	p-valor	P ajustada a edad
Lactancia (meses)	Caso	191	8,65	0,763	0,582	0,978
	Control	115	9,42	0,763		

Tabla 18: Distribución de la población de estudio según la variable lactancia estratificada.

	N	Casos		Controles		p-valor	P ajustada a la edad
		n	%	n	%		
Lactancia	0-11 meses	170	139	72,8%	86	74,8%	0,789
	12 meses o más	81	52	27,2%	29	25,2%	
	Si	251	157	82,2%	94	81,7%	0,919
	No	55	34	17,8%	21	18,3%	

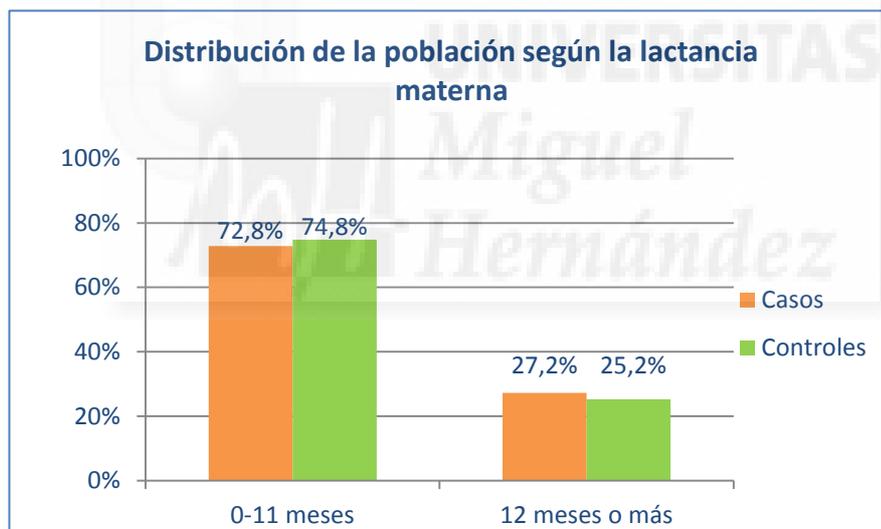


Figura 47: Distribución de la muestra según lactancia materna.

f. MENOPAUSIA

La media de edad de la menopausia es de 48,9 años en los casos y de 48 años en los controles sin significación estadística, y por tanto los grupos son homogéneos (tabla 19).

Tabla 19: Estadísticos descriptivos para la variable edad media de la menopausia.

	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Media	p-valor	P ajustado a la edad
Edad media de la menopausia	Caso	140	32	60	48,9	0,282	0,999
	Control	36	38	56	48		

Cuando se estratifica esta variable en cualitativa, bien estratificada bien dicotómica, se observan diferencias significativas (tabla 20) que desaparecen al aplicar un modelo logístico ajustado por edad. Así, hay 152 casos y 36 controles que son mujeres menopáusicas. Eso demuestra una vez más, que hay más casos con menopausia que controles con menopausia (lógicamente por la edad).

Tabla 20: Distribución de la población del estudio por franjas de edad de menopausia.

		Casos			Controles		p-valor	P ajustada a la edad
		N	n	%	n	%		
Menopausia	SI	188	152	62,0%	36	19,7%	<0,001	0,238
	NO	240	93	38,0%	147	80,3%		
Edad Menopausia	≤ 41 años	14	8	5,3%	6	16,7%	0,012	1
	42-53 años	149	120	78,9%	29	80,6%		
	≥ 54 años	25	24	15,8%	1	2,8%		

Además desglosando la edad de la menopausia por franjas de edad en: tener menopausia a los 41 años o menos, entre los 42 y 53 años y a los 54 años o más (tabla 20 y figura 48), se demuestra que las mujeres que tuvieron la menopausia a los 54 años o más presentan mayor proporción de tumores de mama en nuestra población de manera significativa (p=0,012). Esto está en consonancia con la literatura existente tal y como se expuso en el apartado factores de riesgo. Sin embargo, cuando se aplica un modelo multivariante ajustado a la edad, desaparece la significación estadística si bien se mantiene la tendencia.

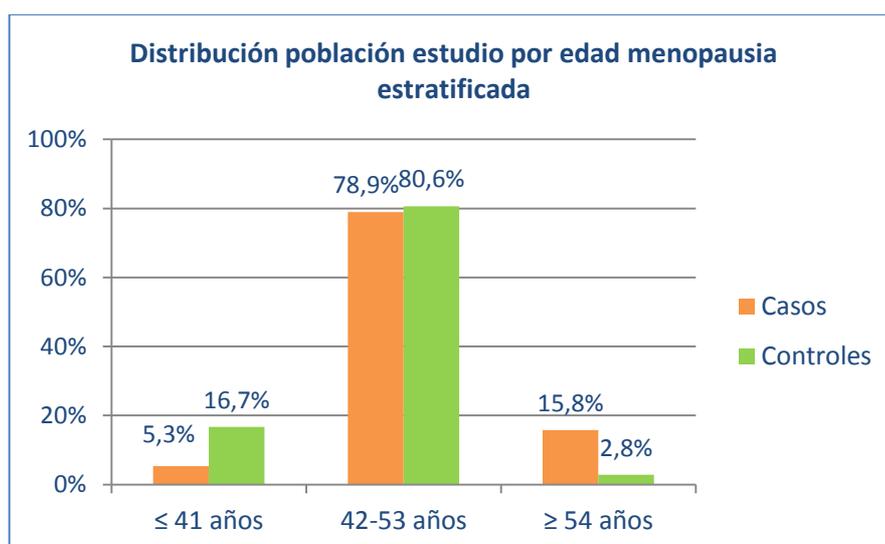


Figura 48: Distribución de la población del estudio por la variable edad de menopausia estratificada.

g. PATOLOGÍA CERVICAL

En cuanto a la variable antecedentes de patología cervical, se comprueba la homogeneidad de ambos grupos (casos y controles) al no existir diferencias significativas, ni en valores crudos ni ajustado a edad. El 95,7% (n=156) de los casos y el 91,8% (n=146) de los controles no han padecido patología cervical alguna (tabla 21 y figura 49).

Tabla 21: Distribución de la población del estudio por patología cervical.

Patología Cervical		Casos			Controles		p-valor	P ajustada a la edad
		N	n	%	n	%		
Patología Cervical	Negativa	302	156	95,7%	146	91,8%	0,171	0,288
	Riesgo	20	7	4,3%	13	8,2%		

Dentro de los casos (n=7) y de los controles (n=13) hubo:

- ✚ 5 ASCUS: 1 caso y 4 controles.
- ✚ 6 CIN I: 3 casos y 3 controles.
- ✚ 7 CIN III: 1 caso y 6 controles.
- ✚ 2 VPH-AR +: 2 casos

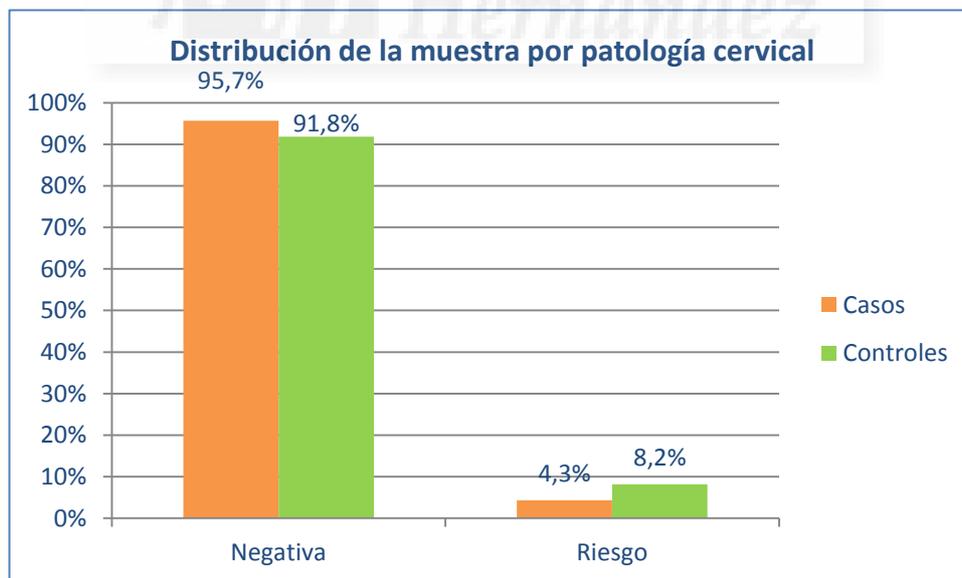


Figura 49: Distribución de la población de estudio por patología cervical.

Por tanto, sólo la variable edad permanece con diferencias significativas entre ambos grupos como ya se ha explicado. Las demás variables son homogéneas (pierden la significación estadística entre ambos grupos) al ajustarlas a la variable edad (cuadro 16).

Cuadro 16: Resumen de la homogeneidad entre casos y controles.

VARIABLES	HOMOGENEIDAD	HOMOGENEIDAD AJUSTADA A EDAD
Edad	NO	
Tabaco	NO	SI
Antecedente Personal Cáncer de mama	NO	SI
Nº de hijos continua dicotómica (si/no)	NO	SI
Lactancia continua dicotómica (si/no) <12/≥12 meses	SI	SI
Menopausia continua dicotómica (si/no) <41/42-53/≥54 años	SI NO NO	SI SI SI
Patología cervical	SI	SI



5. Resultados

5.1 Presencia de VPH en los casos y en los controles

Los datos obtenidos dirigidos a verificar la existencia del virus del papiloma humano (VPH) en las muestras de tejido con cáncer de mama y su comparación con los obtenidos en el tejido con patología benigna de mama, fueron sometidos al test de Chi Cuadrado.

Así es cómo se comprueba que la proporción de expuestos a VPH dentro de los casos (51,8%) es estadísticamente superior ($p < 0,001$) a la proporción de expuestos dentro de los controles (26,3%) como se puede apreciar en la tabla 22 y figura 50.

Tabla 22: Número y porcentaje de casos y controles en cada nivel de exposición a VPH.

		Casos (n=251)		Controles (n=186)		
		N	%	N	%	p-valor
VPH	VPH+	130	51,8%	49	26,3%	< 0,001
	VPH-	121	48,2%	137	73,7%	

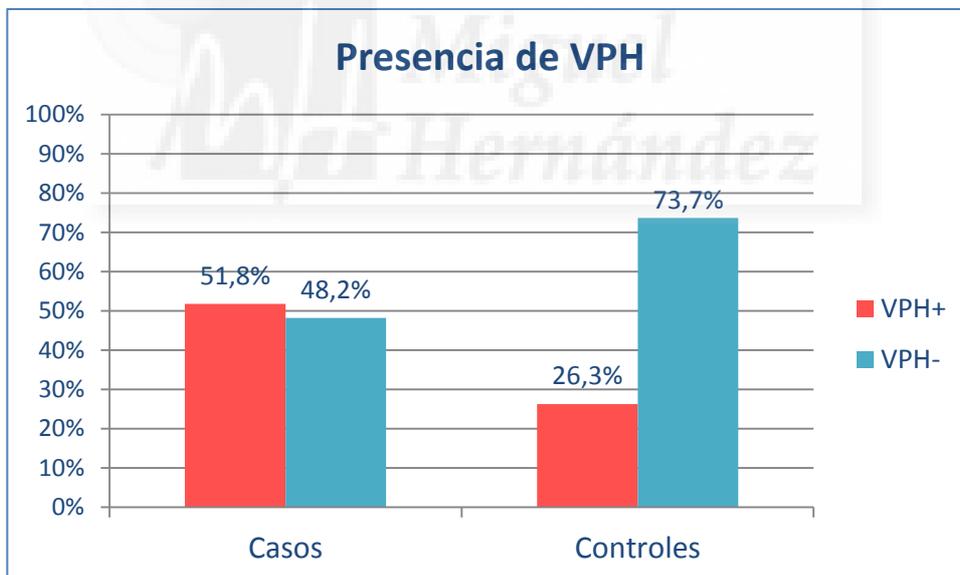


Figura 50: Proporción de VPH positivo y VPH negativo en la población a estudio casos controles.

Según los resultados de asociación que se pueden ver en la tabla 23, se deduce que aquellas mujeres con VPH en la mama tienen 3 veces más riesgo (odds ratio de 3) de desarrollar cáncer de mama que las que no lo presentan.

Tabla 23: OR (IC 95%) de desarrollar tumor de mama según exposición a VPH estimado por modelo logístico.

OR Cruda (IC95%)		
VPH	No	1
	Si	3,0 (2,0-4,5)

CONTROL DE LAS VARIABLES DE CONFUSIÓN

Para estimar el verdadero grado de asociación entre el cáncer de mama (enfermedad), y el VPH (exposición), controlando las variables de confusión, se establece el modelo de regresión logística binario. Los resultados del proceso se muestran en la tabla 24. En la tabla 25 se muestran aquellas variables que no aportan nada para explicar la presencia de la enfermedad.

Tabla 24: Modelo logístico binario para la probabilidad de pertenecer al grupo casos/control. Variables que están en el modelo.

	B	Sig.	OR	I.C. 95%
VPH	1,395	<0,001	4,034	2,213 - 7,352
Edad	0,11	<0,001	1,116	1,084 - 1,15
Lactancia materna	-0,032	0,022	0,969	0,943 - 0,996
Constante	-5,274	<0,001	0,005	

Tabla 25: Variables que no están en el modelo.

Variable	Significación
Tabaco	0,661
Antecedentes personales cáncer de mama	0,189
Número de hijos	0,633
Menopausia	0,472
Patología cervical	0,396

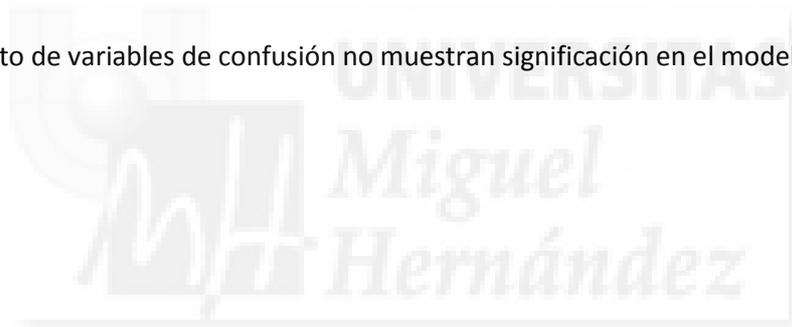
Se observa que la edad, la lactancia y la presencia de VPH explican la existencia, o no, de patología maligna de la mama con respecto a la patología benigna. Cuando la lactancia materna y la edad se trataron como variables cualitativas (estratificadas) no se incluyeron en el modelo por explicar peor que su versión continua, es decir, con una menor significación estadística.

Dentro del modelo, la OR asignada al VPH se sitúa en un valor de 4,034 (IC 95%: 2,213-7,352), lo que significa un mayor riesgo de padecer cáncer en presencia de VPH, mayor incluso que la OR cruda.

Las OR asignadas a edad y lactancia corresponden a 1,1 y 0,9 respectivamente, lo que se traduce que mayor riesgo de cáncer de mama a mayor edad y menor riesgo de cáncer de mama a mayor tiempo de lactancia.

Por lo tanto, y controlando por las variables de confusión, lactancia materna y edad, se explica aún mejor la influencia de la presencia de VPH en la pertenencia al grupo casos-control, con una OR de 4,034.

El resto de variables de confusión no muestran significación en el modelo logístico binario.



5.2 VPH en controles

Dentro de los objetivos del trabajo, se quiso conocer si existían diferencias en la incidencia de VPH entre las distintas lesiones benignas de la mama (subdivididas en 3 categorías) que se han utilizado como “control”. Las muestras con “no presencia” de VPH son más numerosas que las que tienen VPH positivo, sin llegar a ser estadísticamente significativo (tabla 26 y figura 51).

Tabla 26: Evaluación de la presencia de VPH en lesiones benignas de la mama.

		VPH +		VPH -		p-valor
		N	%	n	%	
Controles	Lesión prol. Con atipia	3	6,1%	15	10,9%	0,616
	Lesión prol. sin atipia	15	30,6%	39	28,5%	
	Lesión no prol. o no pat.	31	63,3%	83	60,6%	

prol.: proliferativa; pat.: patología.

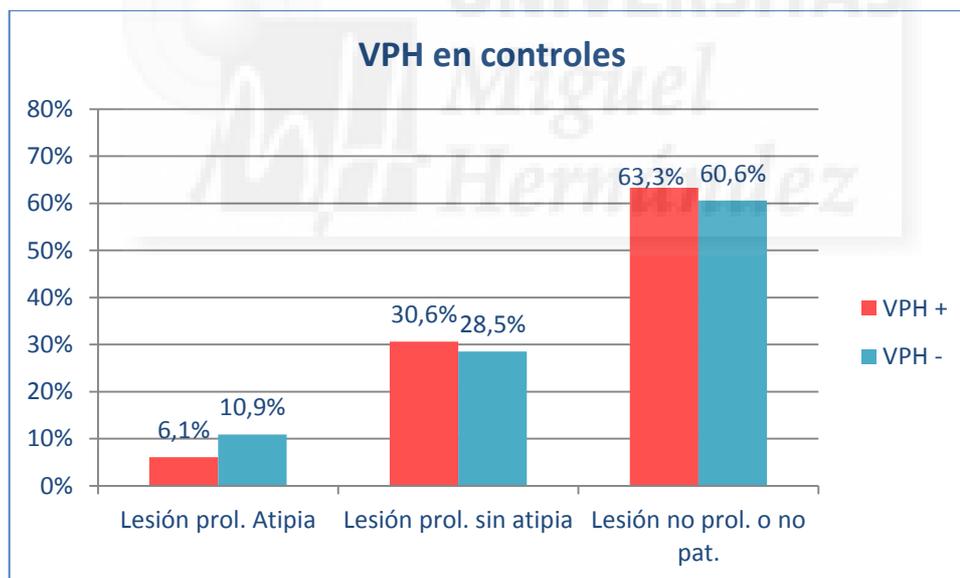


Figura 51: Proporción de VPH positivo y VPH negativo en la población de los controles (desglosada) a estudio.

5.3 VPH en los casos

El análisis estadístico de los casos y la aplicación del test Chi Cuadrado ha permitido comprobar que el 90% de las muestras VPH+ eran en carcinomas infiltrantes y sólo el 10% se encontraban en el material que histológicamente se informó como carcinoma in situ (Tabla 27 y figura 52) no encontrando diferencias significativas. De igual forma, la mayoría de los VPH- fueron carcinomas infiltrantes (88,4%). Tiene sentido ya que la mayoría de las muestras son carcinomas infiltrantes.

Tabla 27: Evaluación de la presencia de VPH en cáncer infiltrante y carcinoma in situ.

	N	VPH+		VPH-		p-valor	
		n	%	n	%		
Casos	C. Infiltrante	224	117	90%	107	88,4%	0,839
	C. in situ	27	13	10%	14	11,6%	

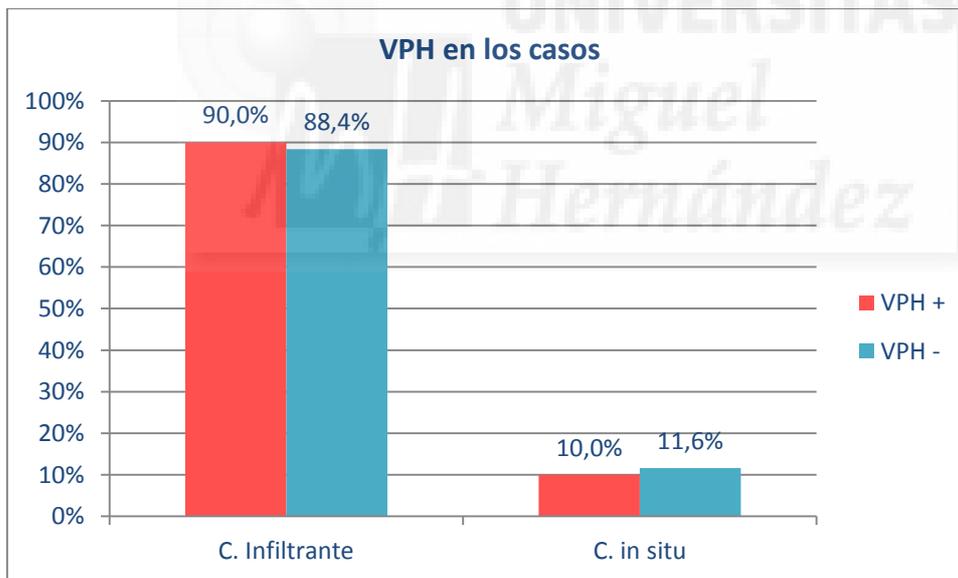


Figura 52: Proporción de VPH positivo y VPH negativo en la población de los casos (desglosada) a estudio.

5.4 VPH y variables anatomopatológicas en los casos

Para llevar a cabo el objetivo de estimar la posible relación entre aquellos cánceres de mama VPH positivos y las diferentes variables anatomopatológicas, se han aplicado diferentes test entre las variables descriptivas tumorales y, por lo tanto, un análisis estratificado dentro del grupo de los casos.

5.4.1. TAMAÑO TUMORAL

El tamaño medio en los tumores que presentaron VPH fue mayor (30,53 mm) que los que no presentaron VPH (28,37 mm) como se puede observar en la tabla 28. Aunque la diferencia estriba en algo más de 2 mm, no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 28: Estadísticos descriptivos para la variable cuantitativa tamaño tumoral (T) según presencia o no de VPH.

	VPH	N	Media (mm)	Desviación típ.	p-valor
T	Si	129	30,53	20,632	0,395
	No	120	28,37	19,359	

5.4.2. GRADO HISTOLÓGICO

Dentro de los carcinomas infiltrantes, no hay diferencias entre la presencia de VPH en cada grado histológico. Para los carcinomas in situ, el test no es concluyente por tener valores muestrales bajos (tabla 29 y figura 53).

Tabla 29: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable grado histológico del tumor.

		VPH+		VPH-		p-valor
		n	%	n	%	
C. Infiltrante	Grado I	10	8,6%	12	11,3%	0,564
	Grado II	49	42,2%	49	46,2%	
	Grado III	57	49,1%	45	42,5%	
C. in situ	Grado I	5	38,5%	3	21,4%	-
	Grado II	4	30,8%	3	21,4%	
	Grado III	4	30,8%	8	57,1%	

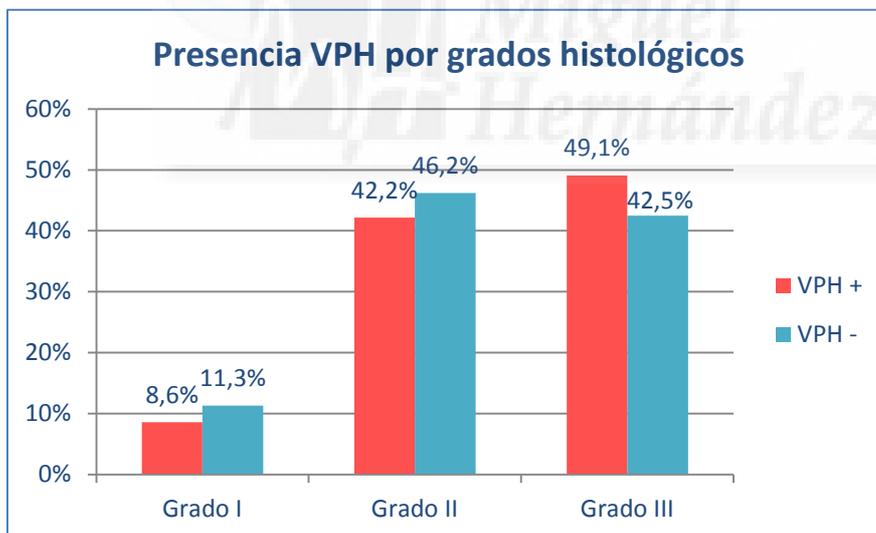


Figura 53: Proporción de presencia de VPH según grados histológicos.

5.4.3. **INVASIÓN LINFOVASCULAR**

Para valorar si la presencia de VPH tiene relación con la presencia o no de invasión linfovascular se ha aplicado un test de Chi Cuadrado, no teniendo significación estadística como se puede comprobar en la tabla 30 y figura 54.

Tabla 30: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable infiltración linfovascular.

		VPH+			VPH-		p-valor
		N	n	%	n	%	
Invasión linfovascular	Si	43	23	17,7%	20	16,5%	0,868
	No	208	107	82,3%	101	83,5%	

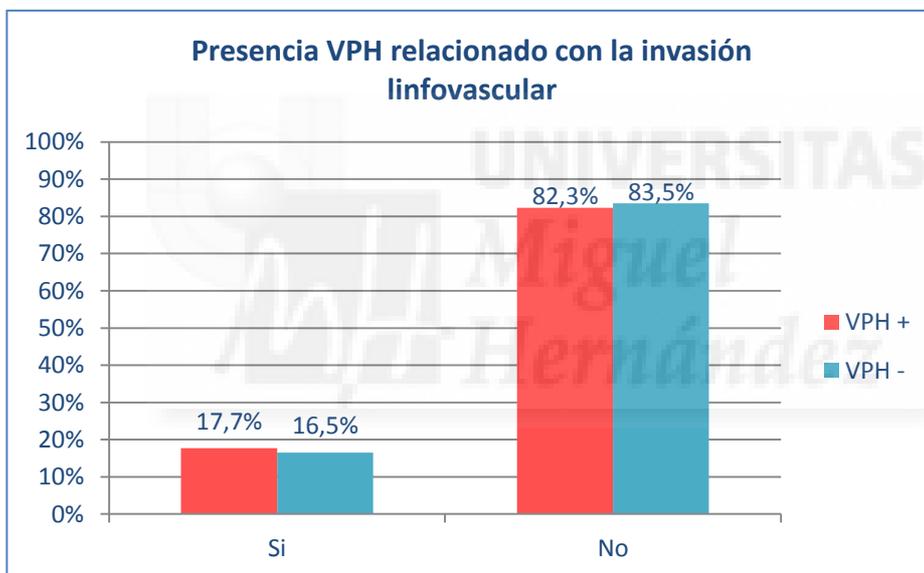


Figura 54: Proporción de presencia de VPH según la variable invasión linfovascular.

5.4.4. **GANGLIOS REGIONALES PATOLÓGICOS**

Tampoco está relacionada la presencia de VPH con la existencia de ganglios regionales metastásicos, tabla 31 y figura 55.

Tabla 31: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable presencia de ganglios regionales patológicos.

		VPH+			VPH-		p-valor
		N	n	%	N	%	
Ganglios regionales patológicos	Si	104	52	40,0%	52	43,0%	0,701
	No	147	78	60,0%	69	57,0%	

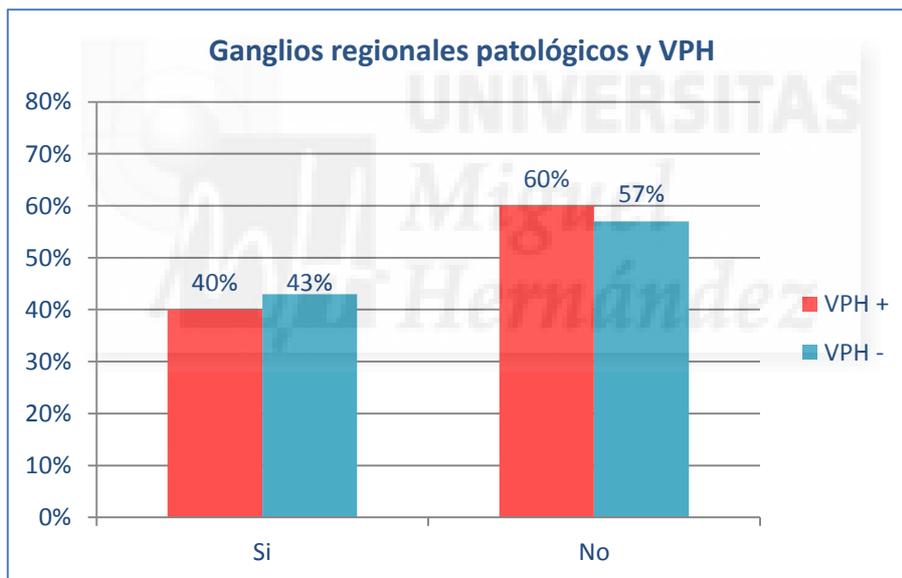


Figura 55: Proporción de presencia de VPH según la variable ganglios regionales metastásicos.

5.4.5. METÁSTASIS

Del mismo modo, se ha analizado la relación potencial entre la presencia de VPH y la existencia o no de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Los resultados mostraron claramente una similitud en los grupos no encontrándose diferencias significativas (tabla 32 y figura 56).

Tabla 32: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable metástasis a distancia.

		VPH+			VHP-		p-valor
		N	n	%	n	%	
Metástasis	Si	10	6	4,6%	4	3,3%	0,751
	No	241	124	95,4%	117	96,7%	

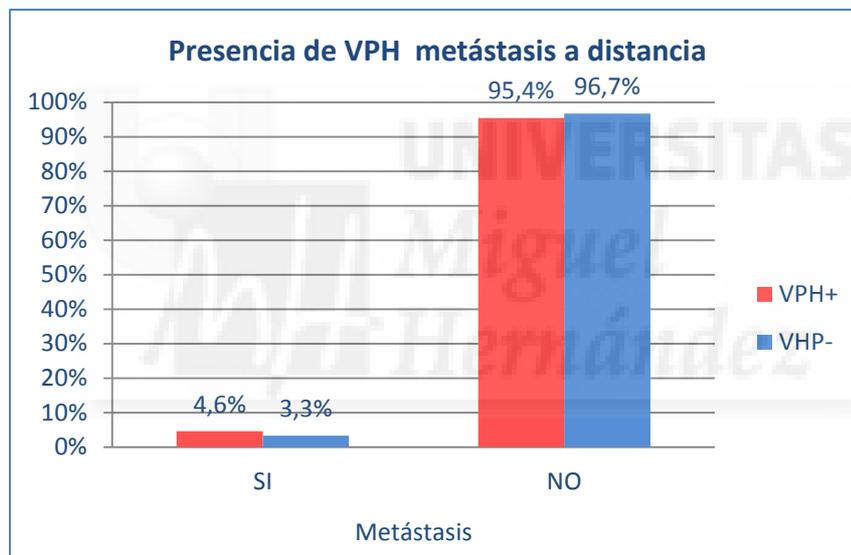


Figura 56: Proporción de presencia de VPH según la variable metástasis al diagnóstico.

5.4.6. NEOADYUVANCIA

La neoadyuvancia es una circunstancia que se ha mostrado como no relacionada en modo alguno con la presencia, o no, del VPH en las muestras analizadas. De las 33 muestras de pacientes que habían recibido quimioterapia neoadyuvante, 16 presentaron ADN viral del VPH y 17 no lo contenían (tabla 33 y figura 57).

Tabla 33: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable neoadyuvancia.

		VPH+			VHP-		p-valor
		N	n	%	N	%	
Neoadyuvancia	Si	33	16	12,3%	17	14,0%	0,712
	No	218	114	87,7%	104	86,0%	

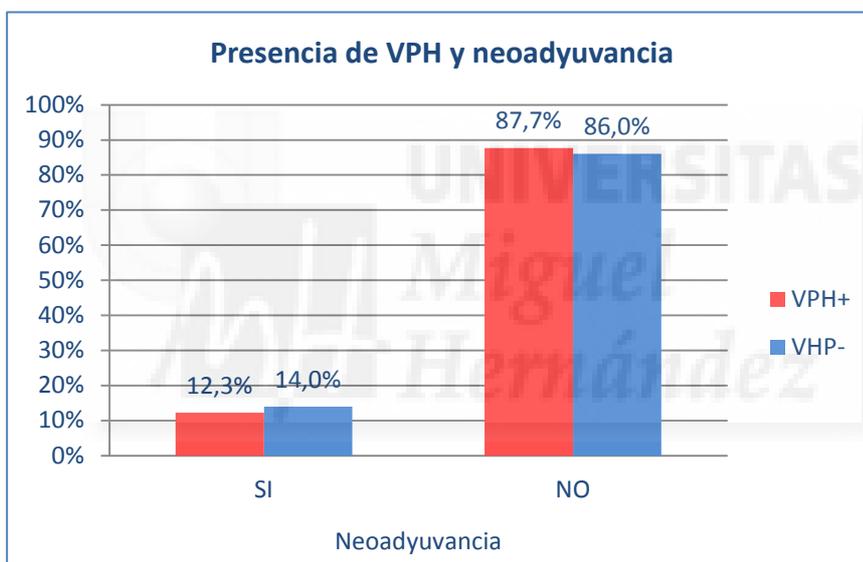


Figura 57: Proporción de presencia de VPH según la variable neoadyuvancia.

5.4.7. ESTADIO

En cuanto a la presencia de VPH según el estadio clínico, el VPH se distribuye homogéneamente (tabla 34 y figura 58) no pareciendo que exista una relación entre ambos. Este aspecto del “estadio” tiene sentido ya que engloba las variables tamaño tumoral, ganglios afectos y metástasis, como se acaba de comprobar, ninguno tiene significación estadística.

Tabla 34: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable estadio tumoral.

Estadio	N	VPH+		VPH-		p-valor
		n	%	n	%	
0	25	14	10,9%	11	9,3%	0,724
IA	51	30	23,4%	21	17,8%	
IB	1	1	0,8%	0	0,0%	
IIA	78	35	27,3%	43	36,4%	
IIB	45	25	19,5%	20	16,9%	
IIIA	32	15	11,7%	17	14,4%	
IIIC	3	2	1,6%	1	0,8%	
IV	11	6	4,7%	5	4,2%	

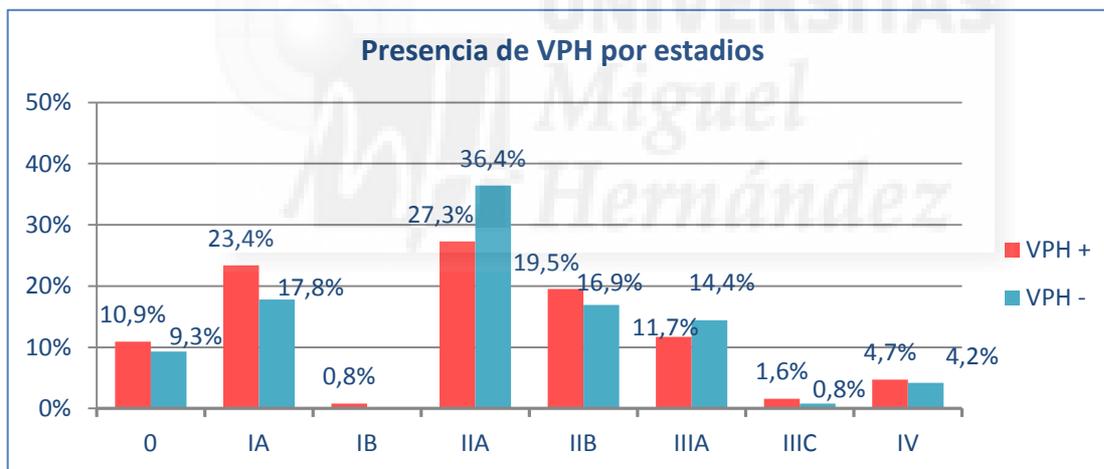


Figura 58: Distribución de la población de casos del estudio según estadio y presencia o no de VPH.

Agrupando esta variable en estadios iniciales (I y II) y avanzados (III y IV) tampoco se ha hallado significación estadística (tabla 35).

Tabla 35: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable estadio tumoral estratificada.

Estadio		VPH+		VPH-		p-valor	
		N	n	%	n		%
Estadio	Inicial	200	105	82,0%	95	80,5%	0,87
	Avanzado	46	23	18,0%	23	19,5%	

5.4.8. RECEPTORES HORMONALES: RE Y RPg

Para el estudio de estas variables se han estratificado en negativo, en porcentaje del 1-19%, y mayor o igual del 20% tal y como se muestra en la tabla 36 y figuras 59 y 60. No existen diferencias estadísticamente significativas que relacionen la presencia del VPH con las distintas expresiones de los receptores hormonales, ya sean estrógenos o progesterona. Si bien es cierto que la mayor parte (el 85,2%) de los tumores que presentaron VPH, tenían receptores de estrógenos superiores al 20%. También la mayoría de los VPH positivo presentaron receptores de progesterona (62,5%).

Tabla 36: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y las variables RE y RPg.

		VPH+			VPH-		p-valor
		N	n	%	n	%	
RE	0	39	18	14,1%	21	17,5%	0,407
	1-19%	4	1	0,8%	3	2,5%	
	≥20%	205	109	85,2%	96	80,0%	
RPg	0	51	26	20,3%	25	20,8%	0,581
	1-19%	37	22	17,2%	15	12,5%	
	≥20%	160	80	62,5%	80	66,7%	

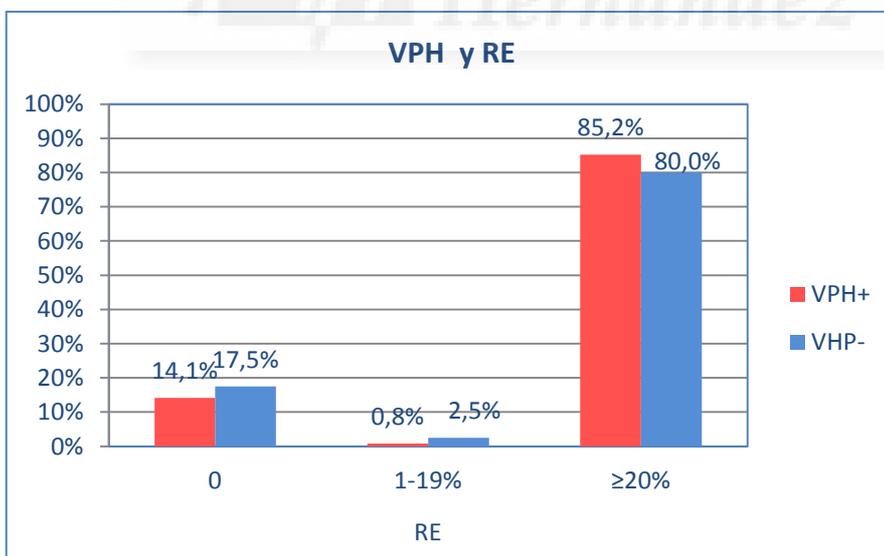


Figura 59: Proporción de presencia de VPH según la variable receptores de estrógenos.

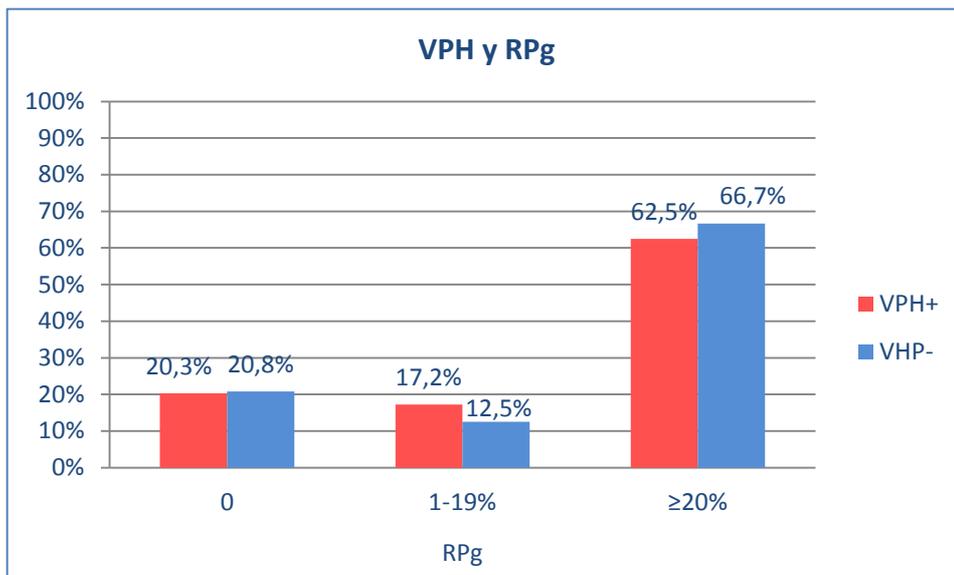


Figura 60: Proporción de presencia de VPH según la variable receptores de progesterona.

Tampoco existen diferencias cuando se estratifica estas variables en receptores de estrógenos o progesterona presente (a partir del 1%) o no presente (negativo) (tabla 37).

Tabla 37: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable presencia de Receptores de estrógenos y de progesterona (análisis dicotómico positivo/negativo).

		VPH+			VHP-		p-valor
N		n	%	n	%		
RE	Negativo	39	18	14,1%	21	17,5%	0,489
	Positivo	209	110	85,9%	99	82,5%	
RP	Negativo	51	26	20,3%	25	20,8%	0,999
	Positivo	197	102	79,7%	95	79,2%	

5.4.9. HER2

Tal y como se muestra en la tabla 38 y figura 61, la sobreexpresión de HER2 no guarda relación con la presencia del VPH en la muestra estudiada.

Tabla 38: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable sobreexpresión HER2.

		VPH+			VPH-		p-valor
		N	n	%	n	%	
HER2	Positivo	43	27	21,3%	16	13,8%	0,134
	Negativo	200	100	78,7%	100	86,2%	

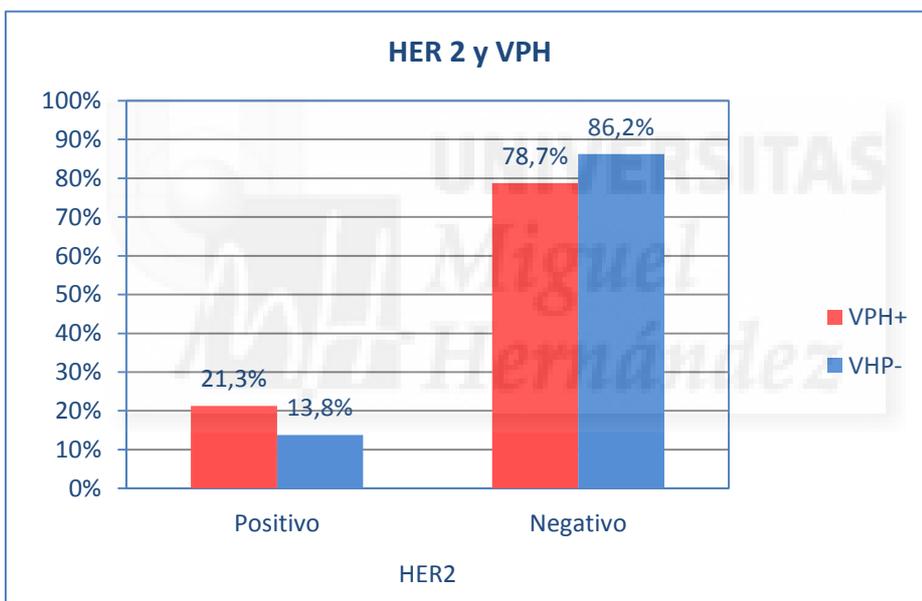


Figura 61: Proporción de presencia de VPH según la variable HER2.

5.4.10. **KI-67**

Como ya se ha explicado, el Ki-67 es un índice de proliferación celular. A mayor Ki-67 mayor capacidad de proliferar las células tumorales y, por tanto mayor agresividad. Esta variable se ha estratificado en 3 grupos en consonancia con la literatura existente tal y como se ha desarrollado en puntos anteriores. Así: <14% sería el primer grupo o con índice de proliferación bajo, del 14 al 19% sería un índice de proliferación intermedio, y por último mayor o igual al 20% correspondería a un índice de proliferación alto. En nuestra población a estudio, a mayor Ki-67, mayor presencia de VPH, aunque no es significativo ya que no existe tal tendencia cuando se estudian las muestras sin VPH (tabla 39 y figura 62).

Tabla 39: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable cualitativa Ki-67.

		VPH+			VPH-		p-valor
		N	n	%	n	%	
KI-67	< 14	84	37	28,9%	47	39,5%	0,083
	14-19	71	44	34,4%	27	22,7%	
	>= 20	91	47	36,7%	45	37,8%	

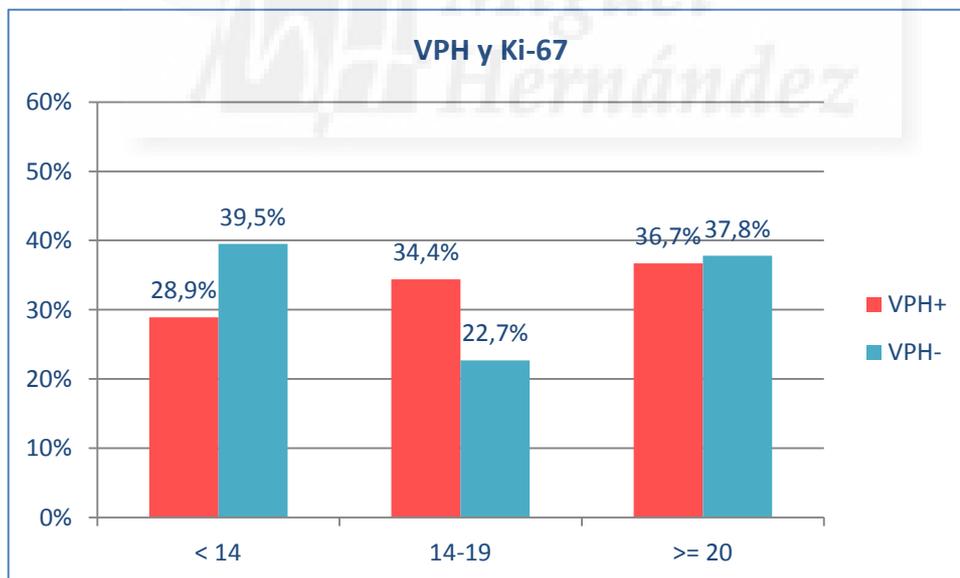


Figura 62: Distribución de la variable Ki-67 en la muestra estudiada según la presencia de VPH.

Como resumen, se puede concluir que ninguna de las variables anatomopatológicas estudiadas tiene relación estadísticamente significativa con la presencia de VPH.

5.5 VPH y subtipos inmunohistoquímicos

A continuación, se aborda la estimación de la potencial relación entre la presencia del VPH y los distintos subtipos inmunohistoquímicos de cánceres de mama (luminal A, luminal B HER2 positivo, luminal B HER2 negativo, triple negativo, y HER2 puro).

Así, se puede observar en la tabla 40 y en la figura 63 cómo la presencia de VPH está relacionada con los fenotipos luminales B (sobre todo HER2-), y, por el contrario los triple negativos y los luminales A se relacionan más con la no presencia de VPH. Esta relación no obstante no es estadísticamente significativa.

Tabla 40: Análisis de la relación entre la presencia de VPH y la variable fenotipo inmunohistoquímico.

Inmuno	N	VPH+		VPH-		p-valor
		n	%	n	%	
LUMINAL A	88	37	29,4%	51	44,0%	0,055
LUMINAL B HER2-	83	50	39,7%	33	28,4%	
LUMINAL B HER2+	35	23	18,3%	12	10,3%	
HER2+ (cERB2)	12	5	4,0%	7	6,0%	
TRIPLE NEGATIVO	24	11	8,7%	13	11,2%	

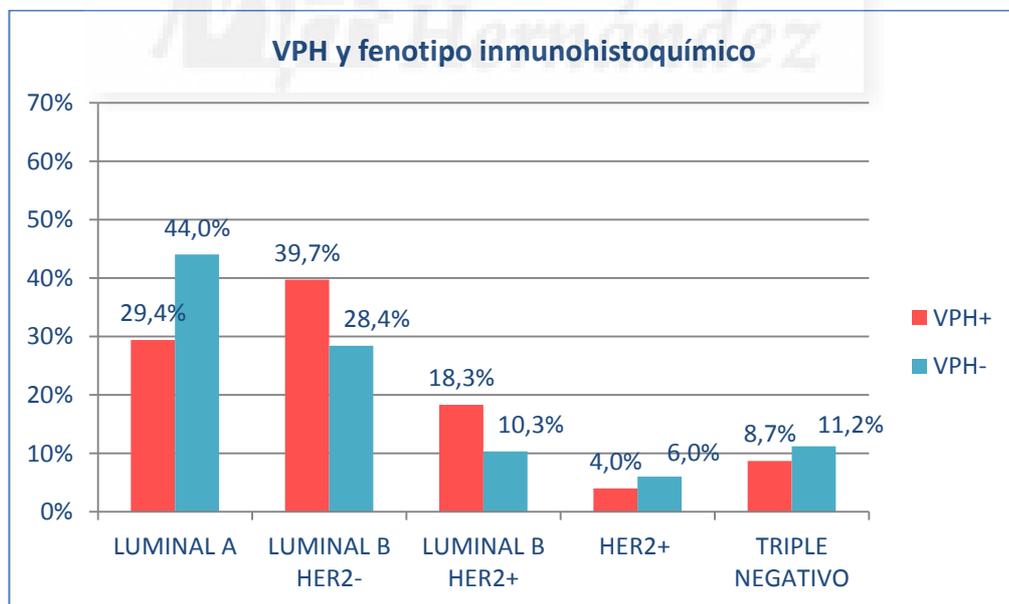


Figura 63: Distribución de la exposición a VPH en la variable fenotipo inmunohistoquímico.

5.6 Infección múltiple y serotipos en casos y controles

De la población estudiada, el 47% de los casos (n=55), y el 61,2% (n=30) de los controles presentaron infección viral a más de un serotipo de VPH (tabla 41). Es decir, que existe coinfección en 85 muestras para más de un serotipo viral.

Tabla 41: Porcentaje de infección múltiple en los casos y en los controles.

		CASOS (n=130)		CONTROLES (n=49)		p-valor
		N	n %	n	%	
Infección múltiple	Si	85	55 47,0%	30	61,2%	0,125
	No	81	62 53,0%	19	38,8%	

En cuanto a los serotipos virales, el total de las muestras con VPH ha sido 179: 130 casos y 49 controles. De las 130 muestras de casos con presencia del virus del papiloma humano, 79 contenían VPH-AR, y 74 VPH-BR (tabla 42). Cabe recordar aquí que, en numerosas muestras, hubo infección concomitante de VPH de alto y bajo riesgo.

De la misma manera, de los 49 controles con presencia de VPH, 46 contenían algún serotipo de VPH-AR y 17 muestras contenían VPH-BR (tabla 42).

Cuando se compara la presencia de VPH-AR en los casos y controles, no existen diferencias significativas. Sin embargo, sí que existen más VPH-BR en los casos con diferencias significativas (tabla 42 y figura 64).

Tabla 42: Distribución de los serotipos virales según alto o bajo riesgo en los casos y en los controles.

PRESENCIA VPH		Casos		Controles		p-valor
		n	%	n	%	
AR	Si	79	31,5%	46	24,7%	0,135
	No	172	68,5%	140	75,3%	
BR	Si	74	29,5%	17	9,1%	<0,001
	No	177	70,5%	169	90,9%	

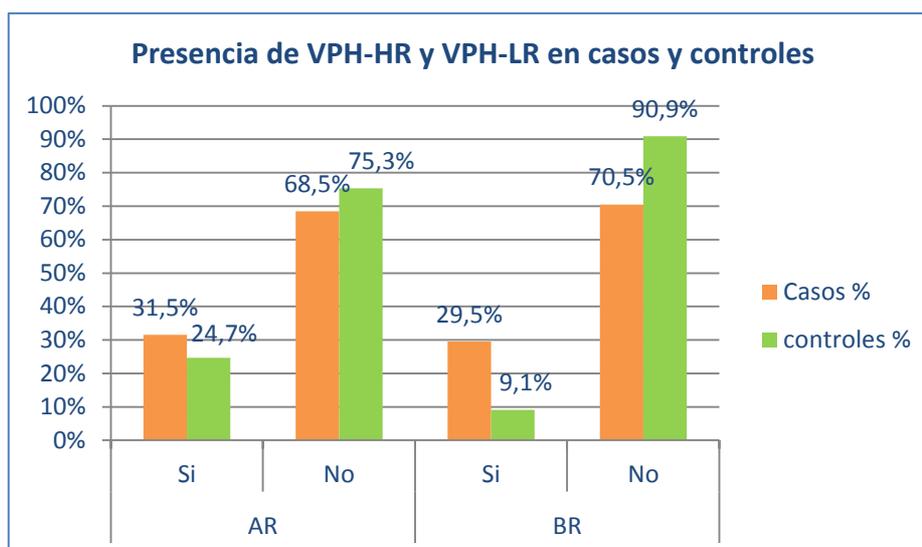


Figura 64: Distribución de la presencia de VPH-AR y VPH-BR en los casos y en los controles.

En cuanto a los serotipos encontrados, en las 179 muestras (130 casos y 49 controles) con presencia de ADN viral, se han identificado 248 VPH de alto riesgo (16 serotipos diferentes de alto riesgo oncogénico), y 138 VPH-BR (11 serotipos de bajo riesgo oncogénico), (tablas 43 y 44).

Tabla 43: Frecuencias de los diferentes serotipos de VPH de alto riesgo (AR) en los casos y controles.

	Caso (porcentaje ^a)	Control (porcentaje ^b)	N (porcentaje ^c)
AR16	32 (12,75%)	26 (13,98%)	58 (13,27%)
AR18	3 (1,20%)	1 (0,54%)	4 (0,92%)
AR31	11 (4,38%)	7 (3,76%)	18 (4,12%)
AR33	5 (1,99%)	3 (1,61%)	8 (1,83%)
AR39	10 (3,98%)	9 (4,84%)	19 (4,35%)
AR45	3 (1,20%)	2 (1,08%)	5 (1,14%)
AR51	15 (5,98%)	13 (6,99%)	28 (6,41%)
AR52	6 (2,39%)	7 (3,76%)	13 (2,97%)
AR53	3 (1,20%)	5 (2,69%)	8 (1,83%)
AR56	7 (2,79%)	4 (2,15%)	11 (2,52%)
AR59	5 (1,99%)	12 (6,45%)	17 (3,89%)
AR66	8 (3,19%)	5 (2,69%)	13 (2,97%)
AR68	4 (1,59%)	5 (2,69%)	9 (2,06%)
AR69	15 (5,98%)	0 (0%)	15 (3,43%)
AR70	4 (1,59%)	6 (3,23%)	10 (2,29%)
AR73	7 (2,79%)	5 (2,69%)	12 (2,75%)

^a: Porcentaje del serotipo del total de la muestra de los casos (251 muestras). ^b: Porcentaje del serotipo del total de la muestra de los controles (186 muestras). ^c: Porcentaje del serotipo del total de la muestra estudiada (437 muestras).

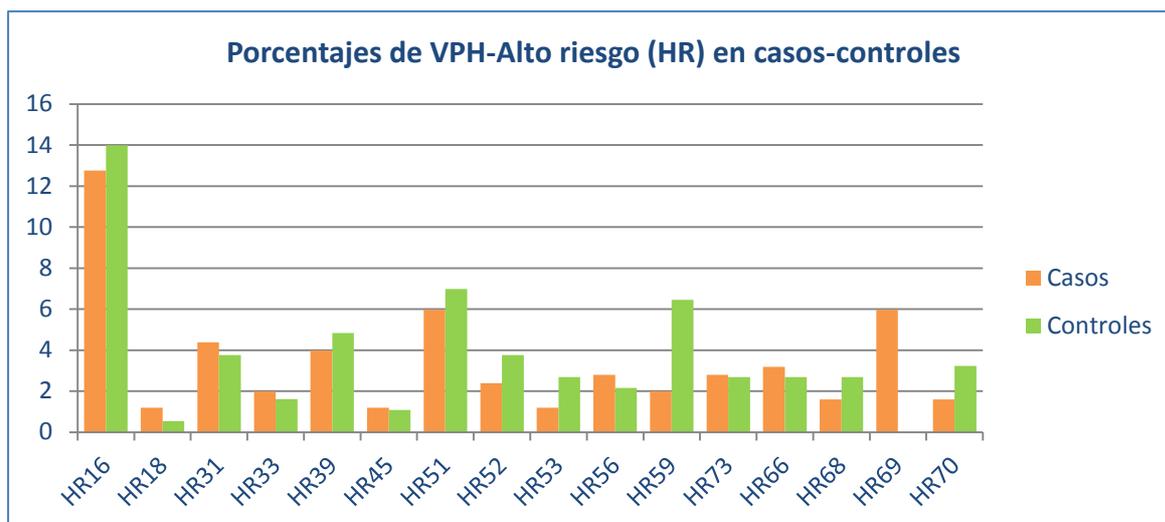


Figura 65: Distribución por serotipos de VPH-AR en los casos y en los controles.

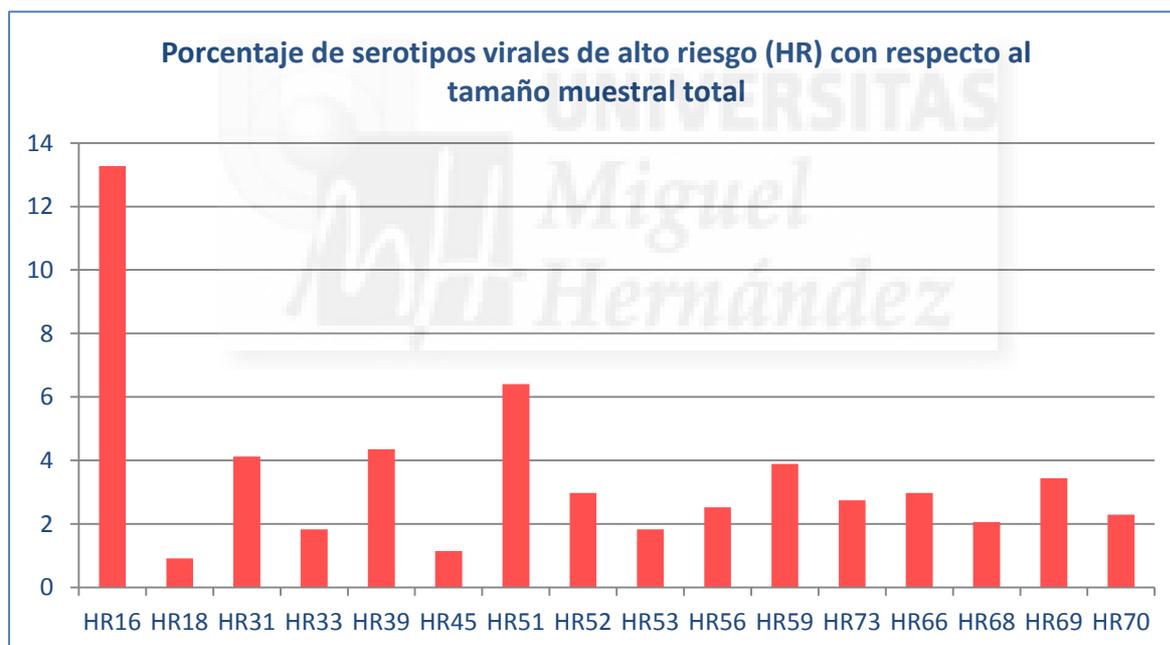


Figura 66: Distribución por serotipos de alto riesgo con respecto al total de la muestra estudiada.

En las figuras 65 y 66 se observa que el VPH-16 es el serotipo de alto riesgo más frecuente, tanto en los casos como en los controles. Si bien es cierto, que se han objetivado más, proporcionalmente hablando, en los controles que en los casos. Además, se observa que existen otros 7 serotipos de alto riesgo que son más frecuentes en los controles (proporcionalmente hablando) que en los casos: VPH-39, -51, -53, -59, -68 y -70.

Tabla 44: Frecuencias de los serotipos de VPH de bajo riesgo en los casos y controles.

	Caso (porcentaje ^a)	Control (porcentaje ^b)	N (porcentaje ^c)
BR6	17 (6,77%)	0 (0%)	17 (3,89%)
BR11	2 (0,80%)	1 (0,54%)	3 (0,69%)
BR40	2 (0,80%)	1 (0,54%)	3 (0,69%)
BR42	7 (2,79%)	1 (0,54%)	8 (1,83%)
BR43	4 (1,59%)	0 (0%)	4 (0,92%)
BR44	6 (2,39%)	1 (0,54%)	7 (1,60%)
BR54	8 (3,19%)	12 (6,45%)	20 (4,58%)
BR61	2 (0,80%)	2 (1,08%)	4 (0,92%)
BR62	11 (4,39%)	10 (5,38%)	21 (4,81%)
BR72	3 (1,20%)	0 (0%)	3 (0,69%)
BR89	46 (18,33%)	2 (1,08%)	48 (10,98%)

^a: Porcentaje del serotipo del total de la muestra de los casos (251 muestras). ^b: Porcentaje del serotipo del total de la muestra de los controles (186 muestras). ^c: Porcentaje del serotipo del total de la muestra estudiada (437 muestras).

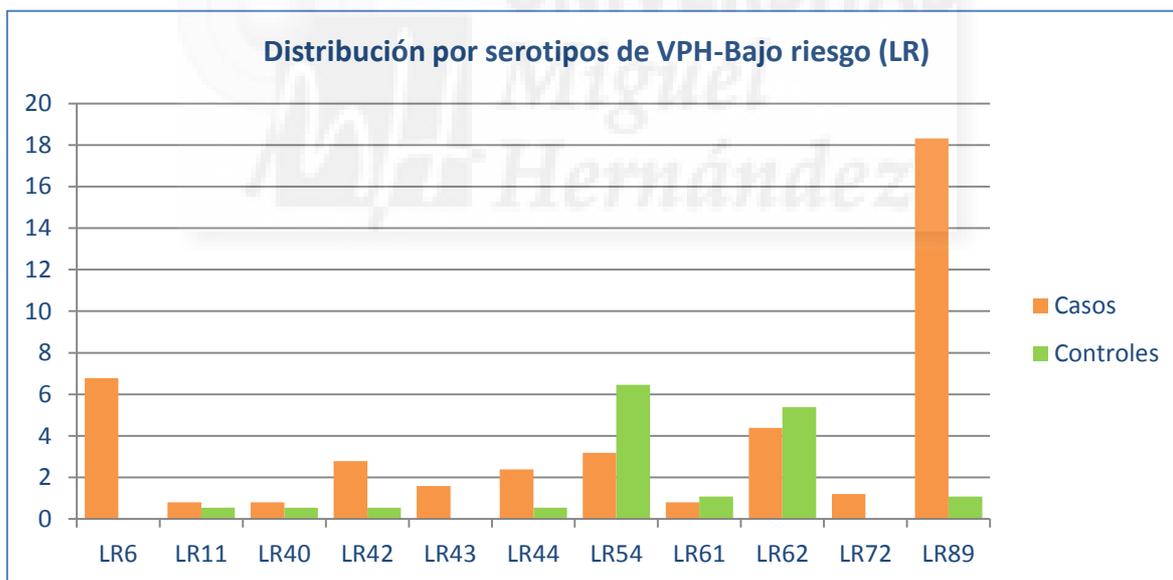


Figura 67: Distribución por serotipos de VPH-BR en los casos y en los controles.



Figura 68: Distribución por serotipos de bajo riesgo con respecto al total de la muestra estudiada.

De los serotipos de bajo riesgo, el más frecuente es el VPH-89. Sólo hay dos serotipos de bajo riesgo, el VPH-54 y el VPH-62, que son más frecuentes en los controles.

Del global de la muestra, el VPH-16 es el serotipo más prevalente (n=58), seguido del VPH 89 (n=48), el VPH-51 (n=28), VPH-62 (n=21), VPH-54 (n=20), VPH-39 (n=19).



6. Discusión

6.1 Presencia de VPH

En 1990, Band y colaboradores (240) fueron los primeros que plantearon la posibilidad de que el VPH podría estar implicado en el cáncer de mama, describiendo que el VPH-16/-18 podría inmortalizar las células epiteliales de tejido mamario normal, mediante la inhibición de la apoptosis.

Dos años después, en 1992, Di Lonardo (182) confirmó mediante PCR la presencia del VPH-16 en el 29,4% de las 17 muestras incluidas en parafina de cáncer de mama. También analizó los ganglios metastatizados axilares, pero no encontró presencia viral en los mismos. Ésta fue la primera vez que se describió la posible relación entre el VPH y el cáncer de mama in vivo.

En el presente estudio, se ha detectado la presencia del VPH en el 51,8% de los casos y en el 26,3% de los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Estos datos se encuentran por encima de las prevalencias a nivel mundial (19,8% de los casos y 4,3% de los controles). También se encuentran por encima de la media europea, donde la prevalencia de los casos se encuentra en torno al 12,25% y 0% en tejido mamario afecto de patología benigna (figura 22).

Simoes (53), en su metaanálisis de 2012, incluye 2.211 muestras (1.932 casos y 279 controles) y determina la presencia de VPH en cáncer de mama en el 23% de los casos y en el 12,9% de los controles existiendo diferencias significativas. No obstante, existe un amplio rango de resultados de VPH positivo en las muestras de cáncer de mama dependiendo de la región del mundo de la que hablemos. Según este autor, en Europa existe un 13,4% mientras que en Australia y Norte América un 42,9%. Tras agrupar todos los estudios de casos-controles, la OR que calculó mostró que las mujeres con VPH positivo tenían 5,9 veces más riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas VPH negativas (95%, IC=3,36-10,67). La OR de nuestro estudio, ajustada a la edad es de 4,03 (95%, IC=2,213-7,352), algo inferior que la que este autor refleja.

En la revisión realizada, la mayor prevalencia de VPH en el cáncer de mama la tiene Oceanía con un 45,4% (de acuerdo con Simoes (53)), a diferencia por ejemplo de África con una prevalencia del 7,3%. No obstante, estas prevalencias no son del todo comparables ya que observando la figura 69, los tamaños muestrales de las diferentes regiones geográficas distan de ser homogéneos. Así, en Asia se han estudiado 1.871 muestras lo que supone un 38% del total de muestras de casos, y sin embargo, regiones como Oceanía o América del Norte tienen un 4% y un 3% respectivamente, del total de las muestras de cáncer de mama estudiadas (n=4.898).

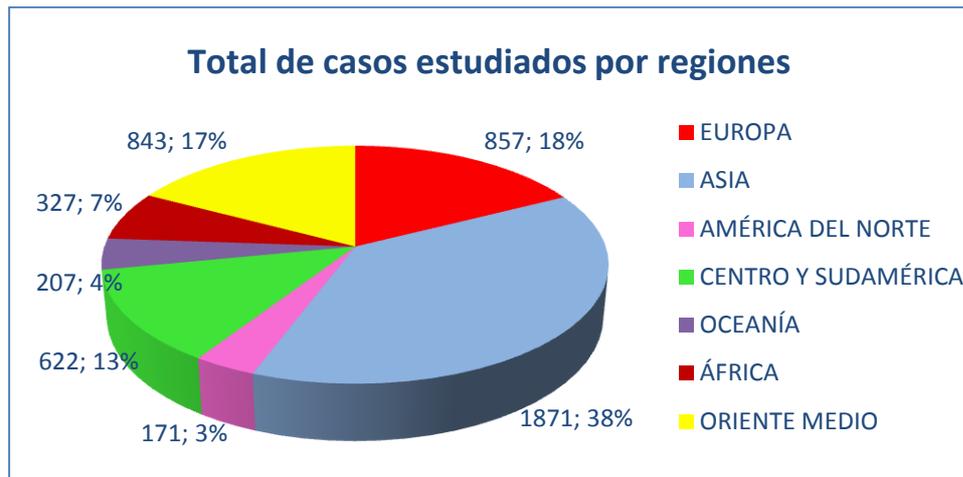


Figura 69: Número total de casos estudiados en las diferentes regiones del mundo.

De Villiers en el año 2004 (194), es el autor que informa de la mayor prevalencia publicada: detectó virus del papiloma humano en un 86% de los casos (25 de 29 carcinomas de mama) y en un 69% (20 de 29 controles) en las muestras de tejido del pezón de las mismas mamas (usados como controles).

Yu (187) publicó en 1999 un estudio con 52 carcinomas de mama (44 ductales infiltrantes y 13 ductales in situ) y 20 controles (4 mastopatías, 3 hiperplasia ductales atípicas, y 13 papilomas) donde encuentra en 18 de los carcinomas y uno de los controles VPH con significación estadística. Liu (189) (USA, 2001), evidenció un 35,3% de ADN del VPH en las 17 muestras de cánceres de mama analizadas.

Kan (195) (Australia, 2005), analiza 50 piezas de cáncer de mama infiltrante utilizando PCR para VPH subtipos 16, 18 o 33, teniendo como resultado la positividad para VPH-18 en el 48% de las muestras.

Choi (199), en 2007, encontró 8 muestras positivas de los 123 carcinomas de mama estudiados en Corea. Sin embargo, no encontró ninguna muestra positiva en los 31 papilomas intraductales estudiados. Además, encontró en 3 muestras infección por múltiples tipos de VPH-AR siendo los más frecuentes en VPH-18 y el VPH-70. Ninguna de las muestras estudiadas VPH-positivas fue p53 positivo.

Akil (200) encontró VPH en el 61,06% de las muestra estudiadas con cáncer de mama en mujeres sirias en 2008. He (206) estudia 40 cánceres de mama y 20 muestras de tejido de mama

normal encontrando diferencias significativas para la presencia de VPH-16 (único tipo que encuentran) en mujeres chinas en 2009.

En otro estudio realizado en el norte de Irán (2012) por Sigaroodi et al (219), se detectó ADN del VPH en el 25,86% de los de los cánceres de mama y en el 2,4% de las muestras de fibroadenomas. El mismo año, Chang et al (216) no encuentran ningún tipo de VPH en los 48 cánceres de mama estudiados en China, sin embargo sí que obtienen VPH-6 y -11 en 3 de las 30 muestras de patología benigna de la mama, concretamente en tumores fillodes. Resulta interesante que estos VPH son obtenidos mediante hibridación in situ, siendo negativo por PCR. Además, repiten el análisis a los 3 meses tras tener las muestras congeladas y los resultados son negativos. Pereira et al (176) encuentran VPH en el 26% de sus muestras (16/61) de cánceres de mama en mujeres argentinas en 2013. Salehpour et al (234) estudian el cáncer de mama en mujeres iraníes en 2015, encontrando un 26,2% de muestras positivas para VPH, los serotipos que encontró fueron de bajo riesgo.

Se ha seleccionado de la tabla 2 aquellos estudios donde se realiza la búsqueda de ADN viral en muestras afectas de cáncer de mama (casos) y muestras con patología benigna o tejido sano (controles) obteniendo 28 artículos (tabla 45). Y, aunque las prevalencias como se pueden observar son variadas, sin embargo en todos los estudios, al igual que en el nuestro, la prevalencia de VPH en los casos es mayor que en los controles. La única excepción es Wang (230) en 2014, que encuentra VPH en 1 muestra de 7 cánceres de mama y en 2 de 2 muestras de patología benigna, y por tanto con esasa representación muestral.

Además, de los 11 artículos donde aparece si hay o no significación, en 9 existen diferencias estadísticamente significativas (tabla 45). Sin embargo, los tamaños muestrales de los casos y controles son pequeños y difieren mucho entre uno y otro grupo. De hecho, los únicos autores que establecen tamaños homogéneos en casos y controles son:

- ✚ De Villiers (194) (n=29 en cada grupo),
- ✚ Tsai (172) (62 casos y 60 controles),
- ✚ Gumus (170) (n=50 en cada grupo),
- ✚ Ahangar (225) (n=65 en cada grupo) y,
- ✚ Manzouri (226) (55 casos y 51 controles).

Los tamaños muestrales de los controles en el resto de los trabajos publicados, no alcanzan, en la mayoría, la mitad en número que el grupo de los casos, lo que disminuye en parte la potencia estadística.

Tabla 45: Selección de estudios que recogen casos y controles.

Autor, año	País	Cons. muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)	OR (IC)
Bratthauer, 1992 (181)	USA	Parafina	PCR/SB	L1 (6, 11, 16, 18)	0/28 (0%) Carcinoma papilares y CDI	0/15 (0%) Papiloma intraductal	-
Gopalkrishna, 1996 (185)	India	Fresco	PCR/SBH	E6 (16,18)	0/26 (0%) CI	0/4 (0%) Fibroadenoma	-
Yu, 1999 (187)	Japón China	Parafina	PCR/SBH	E6 (16, 18, 33)	18/52 (34,6%) CDI y CDIS	1/20 (5%) HDA, Papiloma, mastopatía	P=0,02
Damin, 2004 (191)	Brasil	Parafina Fresco	PCR/seq	E6(16,18)	25/101 (24,75%) CI	0/41 (0%) Mn-fibroadenomas	27,67 (1,64-466,13) P<0,001
De Villiers, 2004 (194)	USA	Parafina	PCR/ISH	L1 (GP,Cp,FAP)	25/29 (86,21%) CI	20/29 (69%) Pezón	-
Tsai, 2005 (172)	Taiwan	Fresco	PCR	L1 (MY9/11)	8/62 (12,9%) CDI	2/60 (3,3%) Fibroadenomas, Mn, tumores tiroideos	-
Gumus, 2006 (170)	Turquía	Fresco	PCR	L1 (MY) E6-E7 (11,16,18,33)	37/50 (74%) CI	16/50 (32%) mismas pac. Con CI pero Mn	P=0,000
Yasmeen, 2007 (198)	Canadá	Parafina	PCR	E6/E7 (16,18,31,33,35)	17/17 (100%) CI- 6/10 (60%) CIS	2/18 (11%) Mn	-
Choi, 2008 (199)	Corea	Parafina	PCR/mycarray	Chip con 28 tipos	8/123(6,5%) CI	0/31 (0%) Papilomas	-
De León, 2009 (204)	México	Parafina	PCR	L1 (MY, GP)	15/51 (29,4%)CI	0/43 (0%) Pbm	-
Mendizabal-Ruiz, 2009 (205)	Mexico	Parafina	PCR/seq	E1/ Cpl & CplIG	3/67 (4,47%) CI	0/40 (0%) Pbm	-
He, 2009 (206)	China	Congel.	PCR	E6	24/40 (60%) CI	1/20 (5%) Mn	P=0.,001
Heng, 2009 (207)	Australia	Parafina	PCR Is situ	L1 (MY, GP) E6 (16,18)	5/13 (39%) CDIS 3/13 (23%)CI	3/17(18%) Mn	-
Antonsson, 2011 (211)	Australia	Congel.	PCR ISH	FAP 59/64 L1/Esp VPH-18	27/54 (50%) CI 0/27 (0%) CI	1/4(25%) Mn	-

Autor, año	País	Cons. Muestra	Método detección virus	Región amplificadora (cebadores)	VPH+/Casos (%VPH+)	VPH+/Controles (%VPH+)	OR (IC)
Mou, 2011 (213)	China	Fresco	DBH/seq	L1 (MY09/11, GP5+/GP6+)	4/62 (6,5%) CI	0/46 (0%) Mn	-
Chang, 2012 (216)	China	Fresco	PCR/ISH	E6/E7 (6,11,16,18)	0/48 (0%) CI-CIS	3/30 (10%) Pbm	-
Frega, 2012 (54)	Italia	Parafina	PCR (SPF10)	INNO-LiPA HPV	9/31 (29%) CI	0/12 Pbm	P<0,04
Glenn, 2012 (217)	Australia	Congel. Parafina	PCR PCRin situ	E6	25/50 (50%) CI 6/13 (46%) 4/14 (28%) CDIS-CDI	8/40 (20%) CELeche 3/18 (18%)Mn	P=0,000
Herrera Romano, 2012 (218)	México	Parafina Congel.	PCR	L1 GP5/6 E6 VPH-16	0/118 (0%) CDIS 0/10 (0%) CDIS	0/2 (0%) Lesión pezón	-
Sigaroodi, 2012 (219)	Irán	Parafina	PCR	L1 GP5+/GP6+ CP FAP	15/58 (25,86%) CI	1/41 (2,41%) Fibroadenomas	OR: 13,95 (95%,IC 1,762-110,526)P=0,002
Liang, 2013 (223)	China	Congel.	HC2 (13 VPH-AR)	-	48/224 (21,4%) CI-CIS	6/37 (16,2%) Fibroadenomas	P=0,468
Ali, 2014 (224)	Iraq	Parafina	ISH	(16,18,31,33,35,45, 51,82)	60/129 CDI-CLI	3/24 (12,5%) Pbm 0/20 (0%) Mn	P<0,001
Ahangar, 2014 (225)	Irán	Parafina	PCR/seq	L1 (MY/GP5/GP6)	21/65 (32,3%) CI	0/65 (0%)Pbm	-
Manzouri, 2014 (226)	Irán	Parafina	PCR-INNO-LiPA	L1 GP5+/GP6+	10/55 (18,2%) CI ductal-lobulillar-medular	7/51 (13,7%) Pbm	P=0,53
Wang, 2014 (230)	China	Congel.	PCR/seq	Secuenciación masiva paralela	21/7 Cáncer mama	2/2	
Fu, 2015 (232)	China	Parafina	PCR ISH	E7 de VPH-58	25/169 (14,79%) 17/169 (10,06%) CI	1/83 (1,2%) 1/83 (1,2%) Pbm	P=0,001 P=0,008
Li J., 2015 (233)	China	Parafina	PCR	L1 (M09/11; GP5-6. E6/E7 de VPH-16,18)	3/187 CI-CDI-CLI	0/92 Pbm	
Vernet-Tomas, 2015 (235)	España	Parafina	PCR	SPF-10 LiPA25	0/76 (0%) CI	0/2 (0%)	-

En este trabajo de investigación, los grupos de los casos y controles fueron diseñados 1:1 y, aunque la muestra final han sido 251 casos y 186 controles y por tanto no ha alcanzado la proporción exacta, mantiene la potencia estadística. Además, hay que tener en cuenta que, hasta la fecha, no se ha encontrado otra publicación con ese tamaño muestral en casos y controles juntos.

Como se ha explicado en el trabajo, los casos y los controles utilizados no han sido homogéneos en la variable edad, pero sí en el resto de variables ajustadas a ésta. Aún así, los resultados son claros. La OR asignada al VPH, teniendo en cuenta la edad y la lactancia, se sitúa en un valor de 4,034, potenciando así la variable VPH, de tal forma que existe un mayor riesgo de padecer cáncer en presencia de VPH (mujeres jóvenes que no hayan lactado). Las OR asignadas a edad y lactancia corresponden a 1,1 y 0,9 respectivamente, lo que se traduce que mayor riesgo de cáncer a mayor edad y, menor riesgo de cáncer a mayor tiempo de lactancia. Todo concuerda dentro de la evidencia descrita en la literatura.

En cuanto a la presencia de VPH en los controles, el 16,67% de la patología proliferativa, el 27,78% de la proliferativa sin atipia y el 27,19% de la no proliferativa, han presentado VPH, sin ser estadísticamente significativo. Estos datos parecen entrever que la presencia de ADN del VPH no interfiere en la existencia de lesiones con diferentes grados de malignización, si bien es cierto que sería necesarios estudios más amplios para poder concluir esta afirmación. Sin embargo, sí se ha puesto en evidencia la existencia de VPH en patología benigna. En cuanto a la diferenciación entre carcinomas infiltrantes e in situ, no se puede concluir dado el bajo número de casos recogidos de carcinoma in situ.

El siguiente trabajo, en volumen de muestras recogidas, sería el reciente de Li J.(233) (China, Agosto de 2015) con 187 cánceres de mama y 92 tumores benignos, y el de Fu (China, 2015) y colaboradores (232) con el estudio de 169 casos y 83 controles. Este último estudio es interesante porque analiza las muestras tanto con PCR como con hibridación in situ buscando VPH-58. Así, encontró en el 14,79% de los casos (con PCR) y 10,06% de los casos (con ISH), y en el 1,2% de los controles (tanto con PCR como con ISH), siendo las diferencias significativas en ambas técnicas.

Por el contrario, son 14 los autores que no encuentran VPH en sus muestras, estos quedan reflejados en la tabla 46.

Bratthauer et al (181) (1992), a partir de la premisa de que la mayor parte de los carcinomas producidos por el VPH son escamosos (aunque existen también adenocarcinomas de

cérvix), considera la búsqueda de VPH de los serotipos VPH-6, -11, -16, -18 en 13 casos de CDI, 15 papilomas intraductales y 15 carcinomas papilares no encontrando en ninguna de las muestras ADN viral. Ese mismo año, Wrede (183) tampoco encuentra mediante PCR, VPH en las 80 muestras de cáncer de mama estudiadas.

Czerwenka et al (184), busca en 1996 en mujeres austríacas VPH en 20 casos de enfermedad de Paget (10 infiltrantes y 10 intraductales) sin encontrar tampoco presencia del virus, aludiendo a la contaminación del resto de estudios ya que ellos habían obtenido las células de cáncer de mama por aspiración con una aguja fina.

Hedau et al (58) estudian en una muestra de 228 mujeres con cáncer de mama la prevalencia de VPH, tanto en tejido afectado por carcinoma de mama (0/228) como en sangre (0/142), no encontrando ningún caso positivo.

Herrera-Romano (218) en 2012 busca VPH en carcinomas ductales in situ: 118 de las muestras fijadas en parafina y 10 de ellas en fresco y, por otro lado, estudia también 2 muestras de lesiones en tejido del pezón fijadas en parafina (no establece que sea patología benigna). En ninguna de las muestras detecta VPH.

En 2013, Kwong et al (222) tampoco encuentran VPH en las 102 muestras de VPH analizadas, ni en las muestras de sangre de estas mismas pacientes.

En España, el único estudio realizado hasta la fecha es de Vernet-Tomás et al (235) (Hospital del Mar, Barcelona, 2015). Estudian la presencia de VPH en 78 muestras de tejido mamario utilizando como cebadores SPF10 y análisis por hibridación reversa (LiPA). 76 muestras corresponden a carcinomas de mama de diferentes histologías (in situ, lobulillar y ductales infiltrantes, enfermedad de Paget, etc.) y dos muestras son patología benigna de la mama. No encuentran ADN del VPH en ninguna de las muestras estudiadas.

IMPLICACIONES DEL VPH EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES

Tabla 46: Selección de estudios que no encuentran VPH.

Autor, año	País	Conservación muestra	Método detección virus	Región amplificada (cebadores)	VPH+/ Casos (% VPH+)	VPH+/ Controles (% VPH+)
Bratthauer, 1992 (181)	USA	Parafina	PCR/SB	L1 (6, 11, 16, 18)	0/28 (0%) Carcinoma papilares y CDI	0/15 (0%) Papiloma intraductal
Wrede, 1992 (183)	Reino Unido	Parafina	PCR	L1 (GP) E7 (16,18)	0/80 (0%) CI	-
Czerwenka, 1996 (184)	Austria	Parafina	PCR/DBH	L1(MY)/ (6,11,16,18,31,33,35)	0/20 (0%) Paget	-
Gopalkrishna, 1996 (185)	India	Fresco	PCR/SBH	E6 (16,18)	0/26 (0%) CI	0/4 (0%) Firoadenoma
Noguera, 2004 (192)	Argentina	Parafina	PCR	L1 (MY09/11)	0/40 (0%) CI	-
Lindel, 2007 (197)	Suiza	Parafina	PCR	L1, SPF ½ (40 tipos VPH)	0/81 (0%) CI	-
De Cremoux, 2008 (203)	Francia	Congelado	PCR	GP5+/GP6+ (16,18,33,45,6,11)	0/50(0%) CI	-
Hachana, 2010 (209)	Túnez	Congelado	PCR	L1 (GP, E1) E6/E7 (16,18,31,33,52/58)	0/123 (0%) CI	-
		Parafina	ISH	(6,11,16,18,31,33)	0/123 (0%)CI	
Yavuzer, 2010 (210)	Turquía	Parafina	PCR	MY/GP	0/84 (0%) CI	-
Hedau, 2011 (58)	India	Congelado	PCR qRT-PCR	L1 (MY09/11, GP5+/GP6+) E6-E7 (16)	0/228 (0%) CI 0/142 (0%) Sangre	-
Silva, 2011 (214)	Brasil	Parafina	PCR	E1 (6,11,16,18)	0/79 (0%) CI	-
Herrera Romano, 2012 (218)	México	Parafina	PCR	L1 GP5/6	0/118 (0%) CDIS	0/2 (0%) Lesión pezón
		Congelado	PCR	E6 VPH-16	0/10 (0%) CDIS	
Kwong, 2013 (222)	China	Fresco	PCR-RT/seq	L1/E6 (VPH-16/18)	0/94 (0%) CDI 0/8 (0%) CDIS	-
Vernet-Tomas, 2015 (235)	España	Parafina	PCR	SPF-10/LiPA25	0/76 (0%) CI	0/2 (0%)

Con todo lo expuesto, se puede concluir que las características demográficas y genéticas pueden ser determinantes en el cáncer de mama VPH-positivo dada la amplia horquilla de resultados. Por otro lado, cabe recordar que algo parecido pasa con las prevalencias de infección por VPH en cérvix, las cuales también son diferentes según la región geográfica de la que se trate. De hecho, tal y como se mostró en la figura 16, las prevalencias de infección más altas a nivel cervical están en Oceanía y Asia, coincidiendo Oceanía como la región con mayor presencia de VPH en los cánceres de mama. En la figura 70, se representan gráficamente la prevalencia de VPH de los casos por artículos publicados (cada punto), diferenciando por colores la zona geográfica donde se haya llevado a cabo el estudio.

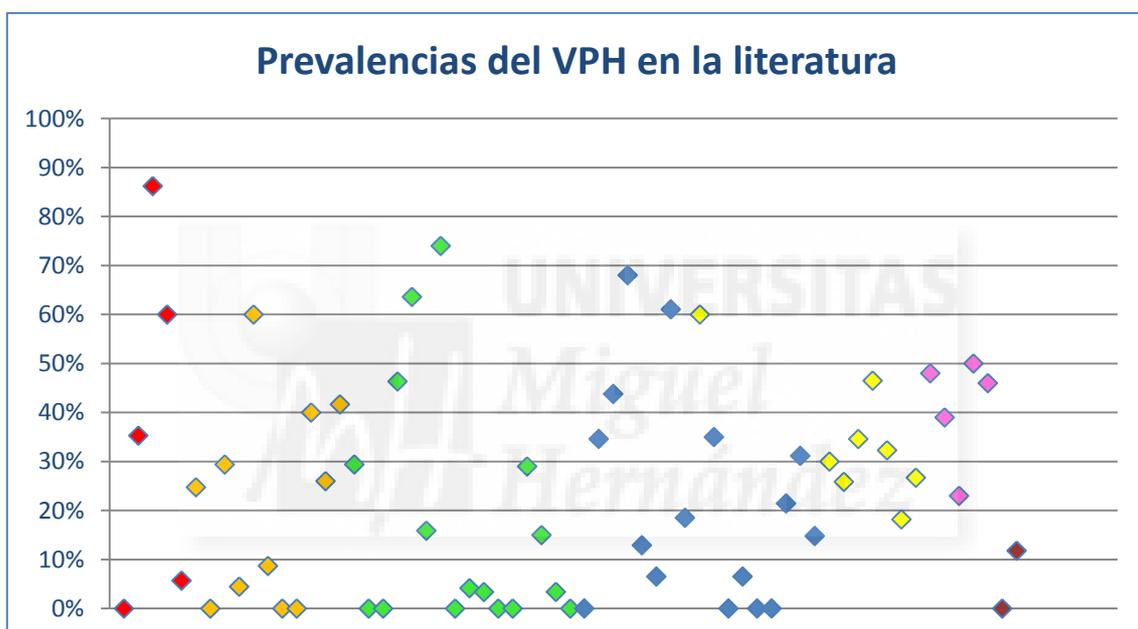


Figura 70: Prevalencia de VPH de los casos por artículos publicados. Leyenda: Rojo: América del Norte/ Naranja: Centro y Sudamérica/ Verde: Europa/ Azul: Asia/ Amarillo: Oriente Medio/ Lila: Australia/ Marrón: África.

Probablemente las diferencias en los resultados de los distintos estudios estriban en la heterogeneidad de los mismos en cuanto a zonas geográficas, metodologías, protocolos diferentes para la detección de VPH (diferentes sensibilidades y especificidades), etc. A lo largo de la discusión se intentará ir analizando el resto de variables.

6.1.1. VPH Y CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias significativas en el tamaño tumoral, si bien es cierto que el tamaño medio de los tumores VPH positivo ha sido 2 mm mayor que aquellos que no presentaban VPH. Tampoco encuentran significación con el tamaño tumoral Khan (202), Liang (223), Fu (232), Mou (213), Choi (199), He (206), Aguayo (177) o Fernandes (231).

Resultan interesantes los resultados de Antonsson (211), ya que los tumores VPH-positivos eran más pequeños, T1-T2, que los que no tenían el virus ($p=0,05$). Otras publicaciones en cáncer de cabeza y cuello, y de pulmón han observado de manera similar que la presencia de ADN de VPH se correlaciona con un mejor pronóstico (211). Paralelo a Antonsson (211), está Herrera-Goepfer (220), que sí encuentra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,042$), siendo los carcinomas metaplásicos VPH negativos de mayor tamaño que los VPH positivos.

También se observó esta tendencia en relación con el estatus nodal, siendo más probable que los tumores VPH-positivos tuvieran menos afectación axilar (negativos o <3 ganglios positivos), a diferencia de nuestros resultados donde no parece que el VPH influya de manera significativa en la presencia de ganglios regionales metastásicos. Otros estudios que buscan la posible relación entre el VPH y el estado ganglionar, sin evidenciar relación alguna son: Khan (202), Gumus (170), Liang (223), Fu (232), Pereira (176), Yu (188) o He (206), Kroupis (196), Aguayo (177), Ohba (227) y sus respectivos colaboradores.

El VPH tampoco parece que influya en el grado tumoral de los carcinomas infiltrantes estudiados en nuestra población. La mayoría de autores que estudian la influencia del VPH en el grado tumoral tampoco establecen relación alguna (Khan (195), Damin (191), Gumus (170), Liang(223), Yu (188), He (206), Glenn (171) y Ohba (227) y colaboradores). El único autor que sí concluye que existe una relación en este sentido es Kroupis (196). Éste encuentra significación ya que el 70,6% de las muestras que obtuvo con VPH-positivo ($n=17$) eran carcinomas de mama grado tumoral III.

En cuanto a la invasión linfovascular, no se han encontrado diferencias significativas en las muestras estudiadas, de acuerdo con la literatura existente (Gumus (170), Khan (241), Ohba (227)).

La presencia de VPH tampoco se ha visto implicada en la presencia de metástasis ni en el estadio tumoral. Tampoco Fernandes encuentra relación entre la presencia de VPH y el estadio tumoral (231).

Al contrario de lo que pudiera a priori parecer, la neoadyuvancia no ha influido en la presencia del virus del papiloma humano, ya que de las 33 muestras de pacientes que habían recibido tratamiento neoadyuvante, el 48,5% (n=16) fueron VPH positivas y el 51,5% (n=17) restante VPH negativas. En aquellos autores que hacen alusión a esta variable, la mayoría la consideran criterio de exclusión; éste es el caso de Damin (191), Liang (223), He (206), Fu (232), Choi (199), Frega (54), Silva (214), Wang (230), Ong (208), Li J. (233) y Mendizabal (205). Dos autores, De Villiers (194) y Baltzell (215) no lo consideran criterio de exclusión, sin embargo en sus resultados no abordan esta variable.

En cuanto a los receptores hormonales, los resultados son diversos. En la mayoría de los artículos que estudian la posible relación del VPH con los receptores hormonales en el cáncer de mama, no encuentran asociación entre ambas. En esta situación se encuentran: Damin (191), Khan (202), Hennig (186), Gumus (170), Liang (223), Fu (232), Pereira (176), Mou (213), Antonsson (211), Choi (199), Cantú de León (204), Yu (188) o He (206) y sus respectivos colaboradores.

Sin embargo, Ohba (227) establece una relación estadísticamente significativa entre la presencia de VPH y los receptores de estrógenos. Baltzell (215), no establece significación aunque sí que tiene más RE los VPH+. En contraposición, Kroupis (196) relaciona cáncer de mama VPH+ con una menor proporción de receptores estrogénicos.

Al igual que Baltzell, en nuestro estudio tampoco hemos encontrado significación estadística, si bien es cierto que la mayor parte (el 85,2%) de los tumores que presentaron VPH tenían receptores de estrógenos superiores al 20%. También la mayoría de los VPH+ presentaron receptores de progesterona (tabla 36).

Tal y como se explicó anteriormente en el apartado Situación Actual, la presencia del VPH en el epitelio cervical no es causa suficiente para producir cáncer de cérvix, sino que necesita de otros factores para la carcinogénesis (43). Dado que los receptores de estrógenos y progesterona están altamente expresados en el epitelio cervical infectado por VPH, Lawson sugiere que las hormonas esteroideas son cofactores en esa neoplasia (43). Por otro lado, el cáncer de mama es estrógeno dependiente. Por tanto, es lógico pensar que los estrógenos actúan como promotores carcinogénicos en el cáncer de mama favoreciendo la inmortalización de las células infectadas por el VPH (41,242). Esto hace pensar en la posible asociación entre VPH y receptores hormonales positivos, tal y como hemos obtenido en los resultados de nuestro estudio aunque sin significación estadística. Usando un modelo animal (ratones), algunos autores como Shai, han

publicado que los estrógenos, junto a la inactivación de p53, inducen tumorigénesis en la mama en presencia de VPH (243).

En consonancia a la explicación dada en el apartado de factores pronóstico, aproximadamente el 15-20% de todos los cánceres de mama sobreexpresan HER2. Yasmineen et al (2007) (198,244) informó que el receptor HER2 (estos estudios realizados en ratones) y las oncoproteínas E6/E7 del VPH-16 interactúan en la tumorigénesis del cáncer de mama. En esta línea se encuentra Woods (245), que ya en 2005 estableció la posible cooperación en estudios realizados in vitro, de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 con la sobreexpresión de HER2. No obstante, no todos los estudios establecen relación entre VPH y HER2: (Khan (202), Liang (223), Fu (232), Antonsson (211), Choi (199), He (206), Ohba (227) o Kroupis (196)). En el presente trabajo el 62,8% (n=27) de los tumores de mama que sobreexpresaron HER2 (n=43) fueron VPH positivos (tabla 36), aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas.

En alusión al índice de proliferación celular Ki-67, también los resultados son diversos. De los pocos autores que estudian esta variable, Kroupis (196) encuentra significación estadística entre cáncer de mama VPH-positivo y Ki-67 elevado. En contraposición, Liang (223) y Khan (195) no encuentran relación. En nuestro caso la presencia de VPH fue más alta en tumores con Ki-67 intermedios (tabla 37) con tendencia a la significación (p=0,08).

6.1.2. VPH Y SUBTIPOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Tal y como se ha expuesto en los resultados, la presencia de VPH está muy ligada a los fenotipos inmunohistoquímicos luminales B con una p=0,055. Esta significación está en consonancia con niveles elevados de Ki-67 ya que los tumores luminales B parten como mínimo de Ki-67 intermedios o altos. Así, de todos los tumores VPH positivos del presente estudio, prácticamente el 40% fueron luminales B HER2 negativos (figura 71).

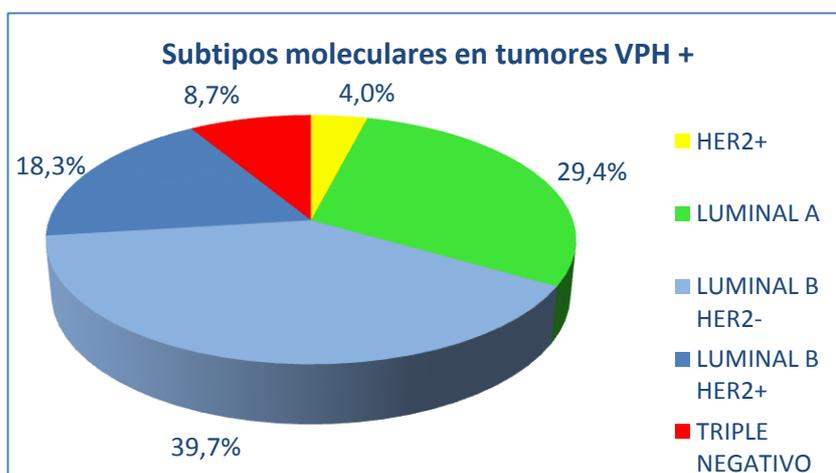


Figura 71: Proporción de subtipos moleculares en tumores VPH positivos.

A este respecto, Subhawong en 2009 (246) establece una similitud entre las características inmunofenotípicas del grupo triple negativo y más concretamente del basal like con aquellos cánceres escamosos VPH positivos (pérdida del retinoblastoma, presencia de p16 o la sobreexpresión de p53), sin embargo en su estudio de 33 casos de cánceres de mama triple negativo no encuentra ADN viral mediante técnicas de hibridación in situ.

El estudio de Corbex (174) en 2014, tiene dos partes. Por un lado, establece dos cohortes: cánceres inflamatorios versus carcinomas no inflamatorios y encuentra que hay más virus (estudia VPH, poliovirus y herpesvirus) en el grupo de inflamatorios (n=11; 30%) siendo estadísticamente significativo ($p=0,038$) en su conjunto pero no cuando desglosa los virus. Y en la segunda parte del estudio, divide la muestra entre carcinomas triple negativo y el resto de los cánceres, encontrando también más ADN viral con significación ($p=0,009$) para el grupo de cánceres TN (n=11; 44%), si bien cuando desglosa por tipos de virus sólo existe significación para el virus del Epstein-Barr.

Por otro lado Piana (229) en 2014, realiza un estudio de casos (tumores triple negativos) y controles (carcinomas de mama no triple negativos). Su objetivo era demostrar que el VPH es un factor etiopatogénico de los tumores triple negativos. Encuentran un 15% de VPH+ en los tumores triple negativos y ninguno de sus controles con un tamaño muestral total de 80. Las diferencias son significativas ($p=0,026$).

Más recientemente, en el artículo publicado en 2015 por Fernandes (231), no encuentra significación estadística entre los subtipos moleculares y la presencia de VPH, teniendo un tamaño muestral bajo (10 muestras positivas de VPH de las 24 estudiadas).

Así, el presente estudio parece encontrar una posible relación entre la presencia de VPH y un subtipo molecular de cáncer de mama, que a diferencia de lo publicado hasta la fecha en donde todos los estudios intentan establecer una relación con el triple negativo, se trata del luminal B/HER2-. Nuestra justificación estriba además en que el luminal B es receptores de estrógenos dependiente, factor de riesgo por otro lado del VPH (favorece la infección), si bien es cierto que son necesarios más estudios para poder establecer claramente esta relación.

6.1.3. INFECCIÓN MÚLTIPLE Y SEROTIPOS VIRALES

En la literatura existente hasta la fecha, se han publicado la presencia tanto de VPH de alto como de bajo riesgo oncogénico, describiendo una amplia variedad de subtipos de VPH, encontrando incluso variedades cutáneas como es el caso de De Villiers (194) u Ong (208) que encuentran VPH-27 o -57, y VPH-4 respectivamente.

En la tabla 47 se describen los serotipos publicados más prevalentes hasta la fecha por orden de autores. Se ha señalado en azul VPH de bajo riesgo y en rojo VPH de alto riesgo. Como se puede comprobar, a excepción del VPH-6, -11 Y -87, el resto de serotipos descritos son de alto riesgo. Nuestros resultados discrepan de lo hasta ahora publicado ya que, de hecho, aparece de manera significativa la presencia del VPH de bajo riesgo en los casos. La explicación a esto no queda del todo clara. Además, en este trabajo aparece un serotipo de bajo riesgo no publicado hasta la fecha que además coincide que es el más prevalente de entre todos los casos (tablas 43 y 44): el VPH-89 (figura 72). Entre los serotipos de alto riesgo, el más prevalente sí que es el VPH-16 coincidiendo con la literatura. Además, si consideramos el total de la muestra (casos y controles), se mantiene como el más frecuente (figura 73) seguido del VPH-89. Dentro de los 6 primeros serotipos encontrados, hay 3 de alto riesgo oncogénico y tres de bajo riesgo oncogénico (figura 73): VPH-16, VPH-89, VPH-62, VPH-51, VPH-54, VPH-39. Estos 6 serotipos constituyen el 50% del total de la carga de VPH.

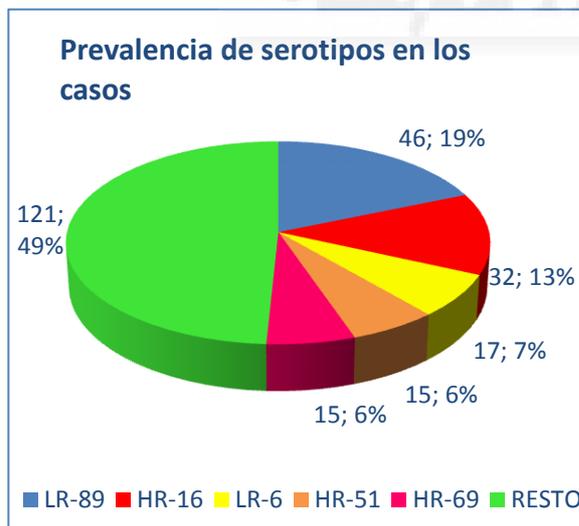


Figura 72: Proporción de serotipos más frecuentes encontrados en las muestras de los casos.

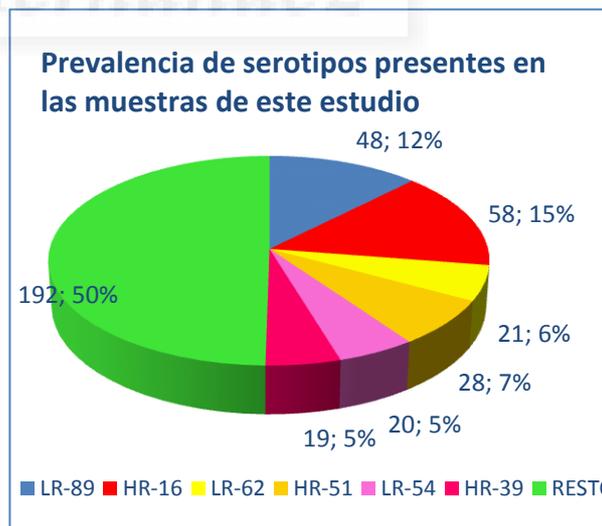


Figura 73: Proporción de serotipos más frecuentes encontrados en el total muestral.

Tabla 47: Serotipos de VPH publicados en la literatura. (x//x: casos//control).

Autor, año (ref.)	I. MÚLTIPLE	VPH- 6	VPH- 11	VPH- 16	VPH- 18	VPH- 31	VPH- 33	VPH- 35	VPH- 45	VPH- 51	VPH- 56	VPH- 59	VPH- 66	VPH- 87
Di Lonardo, 1992 (182)	NO			5										
Hennig, 1999 (186)	NO			19										
Yu, 1999 (187)	SI			1			19							
Yu, 2000 (188)	NO						14							
Liu, 2001 (189)	SI		2	3	1									
Li, 2002 (190)	NO			SI	SI									
Damin, 2004 (191)	SI			14	10									
Widschwendter, 2004 (193)	NO			6										
De Villiers, 2004 (194)	SI	7//6	19//8	2//3								0//2	4//0	
Kan, 2005 (195)	NO				24									
Tsai, 2005 (172)	SI, DESC													
Kroupis, 2006 (196)	SI			14								3		
Gumus, 2006 (170)	SI				20//9		35//14							
Yasmeen, 2007 (198)	NO			23//2										
Choi, 2008 (199)	SI			1	3	1						1	1	
Akil, 2008 (200)	SI			9//1	11//0	8//0	58//2	39//2						
Duò, 2008 (201)	NO												1	
Khan, 2008 (202)	SI	12		21	3		1			2				
De León, 2009 (204)	SI			12	15									
Mendizabal-Ruiz, 2009 (205)	SI	1		1	1	2		1						
He, 2009 (206)	NO			25										
Heng, 2009 (207)	SI			1	10									
Ong, 2009 (208)	SI													
Aceto, 2010 (57)	SI			3	1									
Antonsson, 2011 (211)	NO				27									
Aguayo, 2011 (176)	NO			4										
Ghaffari, 2011 (212)	SI	SI	SI	SI		SI	SI							
Mou, 2011 (213)	NO			3	1									
Baltzell, 2012 (215)	NO			6										
Chang, 2012 (216)	NO	0//2	0//1											
Glenn, 2012 (217)	SI				33									
Frega, 2012 (54)	SI	4		2	1	1				2	1			
Sigaroodi, 2012 (219)	SI	2	1	4	4									
Herrera-Goepfert, 2013 (220)	SI			7	1									
Hosseini, 2013 (221)	SI		8	21	15	4	2	2						
Liang, 2013 (223)	DESC													
Pereira, 2013 (175)	NO		4	3										1
Ali, 2014 (224)	SI			33	33	39	16							
Ahangar, 2014 (225)	SI	17	1	1					1					
Corbex, 2014 (174)	SI	1		8		3								
Lv, 2014 (228)	DESC.													
Manzouri, 2014 (226)	SI		2	2		2	1	1		1				
Ohba, 2014 (227)	DESC			30	28	SI		SI			SI	SI		
Piana, 2014 (229)	SI	1		2			1			1				
Wang, 2014 (230)	NO			1//2										
Fimereli, 2015 (178)	NO			1										
Fu, 2015 (232)	NO													
Salehpour, 2015 (234)	SI	7	21											
Fernandes, 2015 (231)	SI	SI	SI		SI		SI			SI				
Li J., 2015 (233)	SI	1		1	1									

En la mayoría de los estudios publicados sí que parece existir consenso en los serotipos más prevalentes. Estos son los tipos VPH-16, VPH-18 y VPH-31. Algunas excepciones son autores, como Gumus (170), Akil (200) o Yu (187,188), que han detectado VPH-33 como único o predominante tipo oncogénico; Fernández (231) que encuentra el VPH-51 como el más frecuente, o Salehpour (234) y Pereira (176) que encuentra el VPH-11 como el más frecuente en sus muestras. Para Ahangar (225) y Frega (54) el VPH-6 fue el más prevalente en sus estudios.

En el estudio de Fu et al (232) de 2015, sólo se busca el VPH-58 tanto en tejido con carcinoma de mama como en tejido de mama con patología benigna en población china justificando que este tipo de VPH-AR es altamente prevalente en el cáncer cervical de China, encontrando este serotipo viral en el 14,79% de los casos.

Un serotipo poco frecuente, el VPH-66 fue el que halló Duò et al (201). Estos estudiaron la presencia de VPH en 24 tumores de mama, encontrando sólo la presencia del ADN viral en 1 de ellos que era histológicamente un papilar. Así, hicieron en un segundo tiempo una cohorte de 28 cánceres papilares, encontrando ADN viral en 1 muestra. Este serotipo también lo identificó Piana (229).

Ghaffari (212) escribe una carta al editor en *"The Breast Journal"* donde comunica la presencia en el 30% de sus 67 muestras de VPH-16, 6/11 y 31/33 existiendo infección múltiple en la mitad de los resultados positivos. Sin embargo la publicación, al ser una carta al editor, no describe el procedimiento ni metodología por tanto es pobre en cuanto a su validez científica.

Ahangar et al en 2014 (225) realizaron un estudio de casos y controles con 65 muestras en cada grupo, encontrando sólo VPH en el grupo de casos de cáncer de mama en un 32,3% de ellos. El tipo viral más prevalente fue el VPH-6.

6.2 Consideraciones sobre la presencia de VPH en tejido neoplásico de mama y la hipótesis de causalidad

Parte de las razones de la gran horquilla existente en prevalencia de VPH en el cáncer de mama, estriba en las formas de identificación de las secuencias virales, la conservación de los tejidos, y la posible contaminación de los análisis (171). De ahí surge la idea de los posibles falsos positivos y falsos negativos (cuadros 17 y 18).

Cuadro 17: Posibles causas de falsos negativos.

Causas de Falsos Negativos:
✓ Destrucción del ADN viral durante la inclusión del tejido en parafina y su posterior desparafinación (necesidad de utilización de dianas de secuencias más cortas (<200 pb)
✓ Uso de cebadores L1
✓ Pérdida accidental del virus durante la mitosis
✓ Existencia de carga viral baja

Cuadro 18: Posibles causas de falsos positivos.

Causas de Falsos Positivos:
✓ Contaminación de la muestra
✓ Reacción-cruzada con otro subtipos virales

6.2.1. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Para poder establecer una relación causal entre el VPH y el cáncer de mama, el primer objetivo es corroborar la existencia de VPH en las muestras afectas por neoplasia mamaria. Y esto es lo que se ha pretendido con este estudio, en el cual se ha evidenciado presencia de VPH en el 51,8% de los casos y en el 26,3% de los controles.

De los 64 artículos revisados, 40 están incluidos en parafina, 7 estudian la muestra en fresco, 12 en congelado y en 4 estudios realizan el estudio tanto en parafina como en material

congelado obteniendo similares resultados, (hay 1 estudio que no especifica (228)). De todos estos métodos de conservación, ¿cuál es mejor para el posterior estudio del ADN viral?

En general, los tejidos frescos o congelados son más aptos para los estudios moleculares, y por tanto pueden tener una mayor tasa de detección del VPH que las muestras incluidas en parafina (206). En cambio, en la mayoría de las ocasiones se utiliza la parafina como medio de conservación de los tejidos, entre otras razones porque ésta es necesaria para el estudio histológico. Sin embargo, aunque la fijación de tejido en formaldehído e inclusión en bloques de parafina es un método estándar para su preservación a largo plazo, presenta algunas otras desventajas.

La parafina es una barrera física y el formaldehído promueve la generación de entrecruzamiento (“*cross-linking*”) entre ácidos nucleicos y proteínas, lo que ocasiona inconvenientes durante la extracción del ADN e induce la fragmentación del mismo por lo que se hace necesario utilizar dianas de secuencias más cortas (<200 pb) (247). Los *primers* que se han utilizado en este estudio son GP5+/GP6+, que tienen un tamaño intermedio (150 pares de bases) por lo que disminuye los riesgos de falsos negativos.

Además, las condiciones en el proceso de fijación y la excesiva manipulación durante la extracción limitan la amplificación de ADN de alto peso molecular (248,249). No obstante, Gillio et al en 2007 (247) demuestran que el ADN puede ser extraído de manera eficiente de las muestras de parafina guardadas durante más de 20 años, y que los estudios de población a gran escala basados en la amplificación por PCR de secuencias diana cortas son factibles. De hecho, en el metanálisis realizado por Li et al (55) de 21 estudios, se objetiva una prevalencia mayor de VPH (OR=1,73, IC=1,21-2,74) en muestras conservadas en parafina (26,6%) con respecto a las que eran en fresco (20,86%). Por tanto, creemos que pueden ser válidos los resultados de aquellos estudios obtenidos con muestras conservadas en parafina, como es nuestro caso.

6.2.2. TÉCNICA MOLECULAR. CEBADORES.

La mayor parte de los estudios publicados han utilizado los métodos moleculares aprobados comercialmente para la búsqueda del VPH en muestras cervicales, utilizando los mismos cebadores o *primers*. Estos conjuntos de cebadores (por ejemplo GP, *general primer*, MY, SPF) son específicos para regiones de L1 (60,159). Si se obtienen resultados positivos, se utilizan los cebadores de las regiones E6 y E7, o se secuencia para la obtención de los tipos de VPH (250). No obstante, algunos autores han realizado la búsqueda directamente con estos últimos. En este

trabajo, si bien hemos utilizado GP5/GP6, también hemos realizado el estudio molecular genotipando directamente con CLART® y HPV Direct Flow Chip®, minimizando así los posibles falsos negativos.

Durante la integración viral del VPH en el ADN del huésped, en numerosas ocasiones L1 se pierde y por tanto aquellos estudios que utilizan L1 como cebador pueden infradiagnosticar la presencia viral (60,206,230,235). De hecho, Hernández et al (251) comunica la falta de expresión de L1 tanto en el cáncer anal avanzado como en el cervical. Esto también podría ser el caso del cáncer de mama y por tanto sea mayor la representación del VPH en las muestras estudiadas.

Otra causa de falso negativo es que, en la micromuestra de células, exista una cantidad pequeña de ADN viral que impida ser amplificado o incluso que se produzca la pérdida accidental del virus durante la mitosis lo que transforma a la célula en virus no detectable. Por último, como ya se ha descrito, el VPH puede estar presente en la célula como episoma y éste puede perderse durante la mitosis celular (60,137).

Ong (208) en 2009, consideró que los estudios realizados hasta esa fecha no eran metodológicamente correctos ya que utilizan métodos de detección inadecuados. Este autor utiliza dos cebadores, GP5+/6+ y con FAB 59/64 para analizar tanto tipos mucosos (los primeros) como cutáneos (los segundos). Así, encuentran un 35% de VPH cutáneos, no encontrando ninguno mucoso. Junto con De Villiers (194), y Antonsson (211), son los únicos estudios que han utilizado cebadores específicos para VPH-cutáneos y por eso, concluyen, que tengan esa alta prevalencia en comparación con otros estudios donde sólo utilizan cebadores para serotipos mucosos.

Tras la integración en el huésped y la transformación celular, la replicación viral se detiene y por tanto la cantidad de ADN viral disminuye bruscamente; bajo estas circunstancias, el VPH debe alcanzar un nivel mínimo para poder ser detectado por PCR. Por lo tanto, es obvio que la elección del método de detección y su sensibilidad son factores importantes que afectan a la tasa de detección del VPH. La PCR es más sensible, aunque tiene un mayor riesgo de contaminación, que la hibridación in situ; sin embargo esta última muestra también algunas ventajas (137,215).

La hibridación in situ, evita la contaminación de las muestras y además permite ver por inmunofluorescencia el lugar donde “da positivo el ADN”, identificando la célula en cuestión (células epiteliales, adipocitos, leucocitos, fibroblastos o endotelio vascular) (215). Algunos autores que han utilizado la hibridación in situ son: Hennig (186), Widschwendter (193), De Villiers (194), Chang (216) o Ali (224), entre otros.

Hachana (209) y Baltzell (215), realizaron ambas técnicas con similares resultados. El primero de ellos, no encuentra ADN viral. El segundo autor, analizó 70 muestras de carcinomas infiltrantes mediante las dos técnicas: PCR-IS (PCR-in situ) e hibridación in situ encontrando VPH en el 2,9% y 5,7% de las muestras respectivamente. El nivel de concordancia entre ambas técnicas para los resultados negativos fue elevado, aunque no para los resultados positivos. Las células positivas por fluorescencia en la técnica ISH fueron las células del epitelio mamario tanto del neoplásico como el adyacente al tumor. Sin embargo, sólo resultaron positivas por PCR-IS las células mamarias normales.

Fu et al (232) estudia la presencia de VPH-58 con dos técnicas moleculares: mediante PCR *real time* y mediante hibridación in situ, teniendo un coeficiente kappa del 0,781.

Antonsson (211) utiliza las dos técnicas también, sin embargo obtiene resultados diferentes. Estudia 54 muestras congeladas de cáncer de mama mediante PCR y encuentra VPH en el 50% de ellas, y ningún resultado positivo mediante hibridación in situ. La justificación la encuentran en la posible baja carga viral.

Heng estipula que dado que los niveles de ADN viral en mama son mucho menores a los encontrados en cérvix (en cérvix la carga viral parece ser 4000 veces superior a la encontrada en mama), la solución es la búsqueda de ADN mediante técnica de PCR-in situ (207,252). En consonancia están también Mou (213), Herrera-Goepfer et al (220), Ohba (227), Aguayo (177) y Khan (202), que hablan de la baja carga viral en el tejido mamario comparado con el del cérvix, lo cual puede influenciar en la detección de VPH.

Con todo ello, el principal hándicap de la PCR es que su análisis no permite diferenciar dónde se ha producido la “señal positiva”. Este problema puede ser resuelto utilizando PCR-in situ. La posibilidad de falsos positivos puede ser otra de las causas de discrepancia en los resultados publicados (53), sin embargo, y de acuerdo con Akhter (168) en 2014, es cuanto menos dudosa la posibilidad de considerar que todos los artículos donde demuestran ADN viral en la mama sean falsos positivos por contaminación.

6.2.3. LOS CONTROLES

Hasta la fecha, pocos estudios son los que tienen controles (n=28), y estos además son muy heterogéneos puesto que hay una gran variedad de patologías y no siempre quedan especificadas.

La mayor parte de los estudios utilizan como control, patología benigna de la mama o incluso tejido sano, pero algunos otros, como Glenn, utilizan las células epiteliales de la leche materna (171). También es el caso de Sarkola et al (253), que estudian 223 muestras de leche materna obtenida 3 días después del parto para la búsqueda de VPH-16, y encontró un 4% de las muestras con VPH-16. La presencia de ADN del VPH en la leche materna no se correlacionó con el estado oral o cervical de la madre, pero sorprendentemente, la infección oral del cónyuge 6-12 meses postparto por el VPH sí que se asoció significativamente con la presencia de VPH en la leche materna.

Lo que sí se debe valorar es que, si seguimos el patrón que sigue el cáncer de cuello uterino y el VPH y, si el VPH es considerado oncogénico para el cáncer de mama, debe estar presente tanto en este tejido como en algunas mamas normales o con lesiones precancerosas (supuestamente en menor proporción) (53,60,232).

6.2.4. FORMAS DE TRANSMISIÓN DEL VPH

Las infecciones por el VPH se transmiten principalmente por contacto de mucosa-mucosa o de piel-piel. La vía de transmisión globalmente aceptada es la vía sexual, sin embargo, no es exclusiva ya que es posible la transmisión con la mano desde el periné hasta la mama, por ejemplo durante la higiene corporal (41,60,148,149,195).

Para buscar el posible origen del VPH en la mama, varios autores (Widschwendter, Hennig, Hansen y Lv), han intentado establecer una relación entre la presencia del virus en la mama y la patología cervical producida por VPH.

El objetivo de Widschwendter et al (193) fue investigar la correlación entre el VPH asociado al cáncer cervical, y una posible presencia de ADN viral en el cáncer de mama de la misma paciente. Además, buscaron el ADN viral en sangre teniendo como hipótesis una diseminación hematogena del VPH en la mama. En todos los casos de cáncer cervical existía VPH, y en 7 casos de los 11 estudiados (63,6%), se encontró VPH en el tejido mamario tumoral (n=5) o en los ganglios axilares (n=2). Como controles, usaron pacientes con cáncer de mama sin antecedente de cáncer de cérvix, encontrando sólo en 1 de 11 muestras presencia de VPH en

tejido con cáncer de mama. Concluyen que la vía hematógena es una posible vía de transmisión del virus desde el cérvix a la mama ya que la mayor parte de las muestras VPH positivas (el 71%) contenían el mismo virus que en cérvix. Esta misma vía de transmisión la sugiere Liu et al. (189), aunque ésta no se haya constatado.

Curiosamente, el estudio de Hennig (186) informó de la asociación de VPH-16 en el 46% (n=19) de los cánceres de mama en pacientes con una historia de lesiones CIN III. Todas las pacientes con presencia de VPH-16 en las muestras mamarias correspondieron a las mismas pacientes con VPH-16 en las lesiones CIN III. Sus hallazgos le hicieron concluir que la neoplasia cervical asociada al VPH podría ser el sitio original de la infección por VPH; a partir de ahí, el virus podría ser transportado a la mama a través de la mano a las microlesiones en los conductos galactóforos.

Otro estudio muy interesante es el que realiza Hansen y colaboradores en 2012 (254) en Noruega. Estos seleccionan a todas las mujeres que han tenido lesiones precancerosas en cérvix (tipo lesiones glandulares o escamosas) durante casi 40 años (1970-2008) y mide los ratios de incidencia estandarizados de cáncer de mama (establecen como positivo tanto carcinoma in situ como infiltrante) en estas mujeres. Establece el seguimiento en dos grupos independientes: por un lado la cohorte con lesiones precancerosas escamosas que posteriormente son neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN), y por otro lado la cohorte con lesiones glandulares que son posteriormente adenocarcinomas cervicales in situ (AIS). Concluye que existe un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama en mujeres que han tenido a lo largo de su vida una lesión precancerosa en cérvix: IR: 1,10 (95%, IC: 1,05-1,14) para CIN, y IR: 1,52 (95%, IC: 1,11-2,08) en AIS. La causa del por qué encuentran esta asociación refieren que no la pueden establecer, sin embargo, el único punto en común que encuentran es el VPH. Este estudio contrasta con otros previos similares donde no encuentran significación estadística (255).

Con estos estudios, no se puede concluir que el VPH de la mama tenga su origen en el cérvix, haciéndose necesario la realización de futuras investigaciones.

Por otro lado, De Villiers et al (194) demostró la presencia del VPH en el 69% de los pezones de aquellas mamas que tenían cáncer (tamaño muestral de n=29), lo que sugirió ya en 2004, que el VPH podría acceder a la mama a través del pezón. A partir de esta idea, algunos autores consideraron el estudio de la leche materna como una de las principales rutas de transmisión del virus, y ser, el epitelio de la mama, lugar de infección latente (59,171). Glenn et al (171) es uno de estos autores, que encuentra VPH en el 50% de los cánceres de mama y en el 20%

de las células epiteliales obtenidas de la leche de mamas normales (durante lactancia). De ahí deducen que tras infectar el tejido mamario, el virus infectaría la leche que se acumula en la mama.

Otros autores que encuentran VPH en leche materna son: Yoshida (256) y Sarkola et al (253) en 2008. Sin embargo Mammas en 2011 (257), no encontraron VPH en ninguna de las muestras.

Cazzaniga y colaboradores (258) se plantearon buscar el VPH a través de muestras de fluidos y no muestras de tejido. Su estudio consistió en buscar VPH, tanto α -virus (mucosas) como β -virus (cutáneos), en lavados ductales con suero fisiológico de mujeres italianas por un lado (n=70) y por otro 10 muestras de calostro y 25 de leche materna de mujeres japonesas; todas ellas de mujeres de alto riesgo para cáncer de mama, bien por ser portadora de mutaciones BRCA1 o BRCA2 sin haber padecido cáncer, bien por ser mujeres con antecedente de cáncer ipsi o contralateral. De todas ellas, sólo el 14% de los lavados ductales tenían VPH cutáneos (VPH-9,-22,-23,y -38) y sólo un caso (n=1,4%) fue portador de VPH-AR que fue el tipo -51. Sin embargo volvieron a realizar el procedimiento en las mamas de los lavados ductales tras limpieza exhaustiva del pezón y eliminación de las capas superficiales de la epidermis del mismo, apenas se encontró VPH, por lo que concluyen que el pezón está colonizado por VPH. De hecho, Bryan et al, ya en 2001 estableció como posible medio de transmisión del VPH-11 los queratinocitos epiteliales descamados infectados transmitiéndose piel con piel (259). Algo parecido viene a decir Gumus et al (170) y Choi et al (199), que sugieren que la infección en la mama podría ser a través del pezón por contacto, no teniendo por qué ser sexual, desde la región genital (queratinocitos descamados).

Algunos estudios realizados en mujeres sexualmente activas con infecciones cervicales por VPH, han encontrado este virus en la saliva (260). Esto nos abre otro mecanismo de transmisión del VPH a la mama.

Wang et al (137) en su revisión de 2012 hipotetizan que la transmisión del VPH ocurre alrededor de los 20 años o menos a través de la leche materna, fluidos corporales, sangre o incluso el aire. Estos virus se alojan a modo de calcificaciones en la mama, integrándose en el ADN de la célula huésped. Durante el proceso de reparación normal celular se produce la transformación.

Así, las células del epitelio mamario que pierde su control en la proliferación celular son más susceptibles a la infección por VPH. Esta pérdida de control, es uno de los primeros pasos de la carcinogénesis en el cáncer de mama. La infección por VPH se produce en una mujer a través de las manos o de los fluidos corporales (leche materna...) en donde las posibles microgrietas del pezón pueden servir como puerta de entrada del VPH. Durante el proceso normal de reparación celular, pueden darse errores que, en combinación con otros cofactores favorezcan la inmortalización celular. Algunas de estas células inmortales pueden estar infectadas por episomas de ADN viral o bien por ADN integrado. Los posibles mecanismos de VPH en la carcinogénesis del cáncer de mama podría ser el mismo que en anogenital (224), a través de E6 y E7, aunque la carga viral encontrada en la mama es mucho menor.

Es necesario enfatizar la importancia que tiene realizar más estudios que puedan elucidar los mecanismos de carcinogénesis en la mama para poder dar un tratamiento individualizado a cada paciente. La posibilidad de incluir agentes antivirales como parte de la estrategia de prevención (vacunas) (168,261) y tratamiento en el cáncer de mama han de ser considerados tal y como hoy en día se consideran en otros cánceres como el hepatocelular o el sarcoma de Kaposi.

Como se comentó en puntos anteriores, para que un virus sea una de las causas de un cáncer determinado, deben darse una serie de premisas siguiendo los criterios de Bradford Hill (60,168,180). De hecho, en un intento de hipotetizar sobre el VPH y el cáncer de mama y aludiendo a estos criterios, se podría decir que, en este trabajo y a nivel general, cumple la premisa más importante que es que la presencia del marcador viral debe ser más frecuente en los casos que en los controles dentro de la misma región geográfica.

Sin embargo, la aplicación de los criterios de Bradford en el análisis del potencial etiológico del VPH en el cáncer de mama merecen una reflexión dadas las peculiares características de la capacidad oncogénica de estos tipos virales.

El VPH es un virus cuya capacidad oncogénica, al contrario de lo que ocurre con otros virus con demostrada capacidad de transformación neoplásica, podría ser definida como "indirecta". Los denominados "oncogenes virales", que producen las proteínas implicadas en el bloqueo y degradación de proteínas celulares claves en la división celular y control de la apoptosis (p53 y Rb), promueven un "estatus celular" de susceptibilidad a la transformación neoplásica al no poder reparar los errores que una serie de factores intrínsecos o extrínsecos promueven durante la división celular. La acción oncogénica es, por tanto, indirecta al no actuar de forma directa como promotores, reguladores o inhibidores de genes del huésped.

Dado que los papilomavirus oncogénicos actúan en fase de división celular promoviendo la inhibición en la capacidad reparadora de la célula, es ésta con sus circunstancias ambientales, quien va a acumular errores, adquiridos muchas veces por azar en un efecto denominado clastogénico, cuyo fenotipo es independiente de la presencia inicial del virus. No sería, pues, esperable que existiese diferencia alguna en la evolución fenotípica del tumor originado por VPH o aquel potencialmente inducido por otro tipo de evento genético-ambiental.

Esto podría justificar por tanto, que no existan en este trabajo diferencias significativas entre presencia o no de VPH en las variables analizadas propias del tumor (tamaño tumoral, grado, invasión linfovascular, etc.).



6.3 Limitaciones del estudio. Nuevos planteamientos

Como en todo estudio, éste también tiene limitaciones:

✚ Sesgo de selección:

El grupo control debe representar a la población a riesgo. En nuestro caso, está formado por mujeres que han desarrollado un tumor benigno de mama. Esto implica que algunas patologías seleccionadas (por ejemplo hiperplasias con atipia) ya tienen un riesgo más elevado que la población normal, de desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, la población a riesgo hipotética (la población general) también tiene esta patología y por tanto no creemos que pueda modificar en gran medida los resultados. Además, la edad media de los casos es mayor que la de los controles y por tanto no son grupos homogéneos. Esto está en consonancia con la historia natural del cáncer de mama, el cuál va inherente a la edad; la patología benigna en cambio, se da a edades más tempranas. No obstante, en el análisis multivariante del objetivo principal de la tesis se ha controlado esta circunstancia y, al hacerlo, se ha comprobado cómo se potencia el resultado mostrando diferencias estadísticamente significativas con una odds ratio de 4,034.

✚ Tamaño muestral:

Los grupos de los casos y controles fueron diseñados 1:1 y, aunque la muestra final han sido 251 casos y 186 controles, y por tanto no ha alcanzado la proporción uno a uno exacta, sin embargo, mantiene la potencia estadística. Además, hasta la fecha, no se ha encontrado en la literatura un trabajo de casos y controles con un tamaño muestral semejante, lo que hace aún más relevante los resultados encontrados.

✚ Búsqueda de ADN viral:

Aunque se ha intentado minimizar los riesgos de falsos negativos y falsos positivos, no podemos concluir que estemos exentos con total seguridad, tal y como se ha explicado en el apartado de discusión.

✚ Clasificación de los fenotipos inmunohistoquímicos:

Este trabajo ha considerado clasificar los subtipos IHQ teniendo en consideración la clasificación de St. Gallen 2015 (92) y de Maisonneuve (103) (figura 25), dado que existen todavía dudas acerca del punto de corte del Ki-67 a partir del cual un tumor lo podemos considerar luminal A o luminal B, junto a la variable RPg. Por ello, y aunque los resultados evidencian una

relación (sin significación estadística), entre la presencia de VPH y el fenotipo luminal B/HER2-, estos resultados deben de tomarse con precaución.

NUEVOS PLANTEAMIENTOS

Este trabajo crea nuevas perspectivas de futuro dado que queda patente la necesidad de realizar más estudios con rigor metodológico en la búsqueda del posible papel del VPH en el cáncer de mama. Por otro lado, se deberá tener en cuenta las futuras generaciones de mujeres vacunadas frente al VPH y las incidencias de cáncer de mama en estas cohortes.





7. Conclusiones

1. Se evidencia virus del papiloma humano en las muestras de tejido neoplásico de mama estudiados mediante tres técnicas moleculares distintas. La proporción de expuestos al VPH dentro de los casos (muestras de cáncer de mama) es del 51,8%, estadísticamente superior ($p < 0,001$) a la proporción de expuestos al VPH dentro de los controles (muestras con patología benigna de la mama), que se sitúa en un 26,3%.
2. La OR del VPH dentro del modelo multivariante, teniendo en cuenta la edad y la lactancia materna, es de 4,034. Las OR asignadas a edad y lactancia corresponden a 1,1 y 0,9 respectivamente, lo que se traduce en un mayor riesgo de cáncer de mama a mayor edad y, menor riesgo de cáncer de mama a mayor tiempo de lactancia. Por lo tanto, y teniendo en cuenta la lactancia materna y la edad, se explica aún mejor la influencia de la presencia de VPH en la pertenencia al grupo casos-control.
3. En el análisis estratificado de los casos, no existen diferencias significativas en la presencia de VPH entre el carcinoma infiltrante o in situ. Tampoco existen diferencias significativas en la presencia de VPH entre las diferentes patologías benignas.
4. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de VPH y las características anatomopatológicas estudiadas: tamaño, grado histológico, afectación axilar, invasión linfovascular, estadio y metástasis a distancia. Haber llevado tratamiento neoadyuvante no está tampoco relacionado con la presencia de VPH.
5. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de VPH y la expresión de los RE y RPg, así como el estatus de HER2, o los niveles de Ki-67.
6. Existe relación, aunque sólo una tendencia a la significación estadística ($p = 0,055$), entre la presencia de VPH y el fenotipo luminal B/HER2-. Son necesarios más estudios para poder establecer claramente esta relación.
7. El VPH-16 es el serotipo más frecuentemente encontrado, de acuerdo con la literatura. El segundo serotipo en frecuencia encontrado, es el VPH-89 que no aparece en la literatura revisada.
8. Los resultados tan dispares de la bibliografía se justifican por la gran diversidad metodológica que se ha seguido. Nuestro trabajo, con rigor metodológico y una casuística nunca publicada, demuestra la presencia significativa de ADN del VPH en las muestras con cáncer de mama. La posible relación causal, o como cofactor, o no, debe ser demostrada en futuros trabajos.





8. Bibliografía

- (1) Organización Mundial de la Salud. Cáncer de mama: Prevención y Control. 2015; Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es>.
- (2) Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1374-1403.
- (3) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015;136(5):E359-E386.
- (4) Lakhani, S. R. (Ed.) (2012). *WHO classification of tumours of the breast*. International Agency for Research on Cancer.
- (5) Ministerio de Sanidad y Consumo. 2013; Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas>.
- (6) Las Cifras del Cáncer en España 2014. Sociedad Española de Oncología Médica. 2014; Disponible en: www.seom.org.
- (7) Pollan M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, Arguelles M, Martos C, Galceran J, et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(22):1584-1591.
- (8) Asociación Española contra el Cáncer. AECC. 2014; Disponible en: <https://www.aecc.es>
- (9) Servicio de Estudios Epidemiológicos y Estadísticas Sanitarias Subdirección General de Epidemiología y Vigilancia de la Salud Dirección General de Salud Pública Consellería de Sanidad. Dirección General de Salud Pública. Comunidad Valenciana. Incidencia por Cáncer. Estimaciones para la Comunidad Valenciana 2010. 2014; Disponible en: <http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/SIO-2009-2010.pdf>.
- (10) Anderson BO, Yip C, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, Eniu A, et al. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries. *Cancer* 2008;113(S8):2221-2243.
- (11) AM Santaballa Bertrán. Diferencias entre los Cánceres de Mama diagnosticados clínicamente y los detectados en un Programa de Cribado. Valencia: Universitat de València; 2009.
- (12) Salas Trejo D, Miranda García J, Ibáñez Cabanell J, Pons Sánchez C, Vicente Casado C, Molina Barceló. Programa de Prevención del Cáncer de Mama en la Comunitat Valenciana. 4ª ed. Valencia.: Generalitat; 2012.
- (13) Kerlikowske K, Grady D, Rubin SM, Sandrock C, Ernster VL. Efficacy of screening mammography: a meta-analysis. *JAMA* 1995;273(2):149-154.
- (14) Brawley OW, Kramer BS. Cancer screening in theory and in practice. *J Clin Oncol* 2005 Jan 10;23(2):293-300.

- (15) Paci E, EUROSCREEN Working Group. Summary of the evidence of breast cancer service screening outcomes in Europe and first estimate of the benefit and harm balance sheet. *J Med Screen* 2012;19 Suppl 1:5-13.
- (16) Gøtzsche PC NM. Cribaje (screening) con mamografía para el cáncer de mama (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.). CD001877
- (17) Kösters J, Gotzsche P. Autoexamen o examen clínico regular para la detección precoz del cáncer de mama. 2007. *Cochrane Library* DOI: 10.1002/14651858.CD003373
- (18) Programa de Prevención del Cáncer de Mama. Servicio del Plan Oncológico. Dirección General de Salud Pública. 20 años del Programa de Prevención de Cáncer de Mama en la Comunitat Valenciana. Resultados 1992-2012. Valencia: Generalitat.; 2013.
- (19) Tabar L, Yen M, Vitak B, Chen HT, Smith RA, Duffy SW. Mammography service screening and mortality in breast cancer patients: 20-year follow-up before and after introduction of screening. *The Lancet* 2003;361(9367):1405-1410.
- (20) Sala M, Domingo L, Rué M, Comas M, Torá-Rocamora I, Macià F, et al. Investigación en cribado de cáncer de mama: camino hacia estrategias personalizadas y decisiones compartidas. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 2014;27(4):176-182.
- (21) D'Orsi CJ, Sickles EA, Mendelson EB, Morris EA et al. ACR BI-RADS® Atlas, Breast Imaging Reporting and Data System. Reston, VA, American College of Radiology 2013.
- (22) Britton P, Warwick J, Wallis M, O'Keeffe S, Taylor K, Sinnatamby R, et al. Measuring the accuracy of diagnostic imaging in symptomatic breast patients: team and individual performance. 2012; *85(1012):415-22*.
- (23) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Patología estructural y funcional. 6ª ed.: Interamericana-McGraw-Hill; 2000.
- (24) Martin D. Abelson, Antonio C. Wolff, William C. Wood, Beryl McCormick, Barbara L. Weber. Chapter 94: Cancer of the Breast. *Clinical Oncology*. Third edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2004.
- (25) Información sobre el Cáncer de Mama. 2013; Disponible en: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/cancer-de-mama-raiz/cancer-de-mama>.
- (26) Fiorica J. Epidemiología del cancer de mama. *FUCAM. Obstetrics & Gynecology Clinics of North America* 2001;28(4):711-726.
- (27) Dumitrescu R, Cotarla I. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005;9(1):208-221.

- (28) Wendy Y Chen, MD, MPH. Factors that modify breast cancer risk in women. Uptodate 2014. 2014; Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/search>. Acceso Nov/2014.
- (29) Veronesi U., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G., Boyle P. Breast Cancer. *Lancet* 2005;365:1727-1741.
- (30) Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295(21):2492-2502.
- (31) Bradley CJ, Given CW, Roberts C. Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(7):490-496.
- (32) Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, et al. Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49 Years. A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012;156(9):635-648.
- (33) San Miguel A, Gonzalez Blanco I, García Iglesias R, Alonso N, Rodríguez Bujez A, Martín Medrano E, et al. Factores pronosticos del cancer de mama y oncogen HER2/NEU. *Rev Electron Biomed* 2006;2:72-88.
- (34) McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000;321(7261):624-628.
- (35) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet* 2002;360(9328):187-195.
- (36) Sánchez Borrego R. Pautas Prolongadas en Anticoncepción. In: Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología, editor. Documentos de Consenso 2012. Octubre, 2013 ed. Madrid; 2012. p. 117.
- (37) Lobo Abascal. Anticoncepción hormonal y riesgos de cáncer de mama, ovario, endometrio, cérvix y otros. Protocolos SEGO/SEC. 2013; Disponible en: <http://www.prosego.com/categoria-guia-asistencia/contracepcion/>.
- (38) Bernstein L. The risk of breast, endometrial and ovarian cancer in users of hormonal preparations. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2006;98(3):288-296.
- (39) Douglas S. Premenstrual syndrome. Evidence-based treatment in family practice. *Can Fam Physician* 2002;48:1789-1797.
- (40) Wendy Y Chen, MD, MPH. Menopausal hormone therapy and the risk of breast cancer. UpToDate. 2014; Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/search>. Acceso Aug 27, 2014.
- (41) Lawson JS, Günzburg WH, Whitaker NJ. Viruses and human breast cancer. *Future microbiology* 2006;1(1):33-51.
- (42) Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2013;24(2):301-308.

- (43) Lawson JS. Do viruses cause breast cancer? *Cancer Epidemiology. Methods Mol Biol* 2009; 471: 421-38.
- (44) Castelló A, Pollán M, Buijsse B, Ruiz A, Casas A, Baena-Cañada J, et al. Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case-control EpiGEICAM study. *Br J Cancer* 2014;111(7):1454-1462.
- (45) Gutiérrez IZ, Fontán JS. ¿ Sabemos qué causa el cáncer de mama? Influencia actual de los diferentes factores de riesgo. *Progresos de obstetricia y ginecología* 2009;52(10):595-608.
- (46) McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Jun;15(6):1159-1169.
- (47) Checka CM, Chun JE, Schnabel FR, Lee J, Toth H. The relationship of mammographic density and age: implications for breast cancer screening. *Am J Roentgenol* 2012;198(3):W292-W295.
- (48) Ruiz OM, Castellano CR, Angulo PMA, Nieto VS, Gil AA, de la Presa, Raquel Moreno, et al. Valoración de las categorías BI-RADS® de la densidad mamaria entre radiólogos y respecto a un método cuantitativo de medición. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 2014;27(4):157-162.
- (49) Michael S Sabel, Anees B Chagpar, Don S Dizon,. Overview of benign breast disease. Acceso: 16/12/2014.; Disponible en: www.uptodate.com.
- (50) Boletín GEICAM. Nov 2013. http://www.boletingeicam.org/n_1/seccion_2.html.
- (51) Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312(3):146-151.
- (52) Hilakivi-Clarke L, Rowland J, Clarke R, Lippman ME. Psychosocial factors in the development and progression of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29(2):141-160.
- (53) Simoes PW, Medeiros LR, Simoes Pires PD, Edelweiss MI, Rosa DD, Silva FR, et al. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: a systematic review. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22(3):343-347.
- (54) Frega A, Lorenzon L, Bononi M, De Cesare A, Ciardi A, Lombardi D, et al. Evaluation of E6 and E7 mRNA expression in HPV DNA positive breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012;33(2):164-167.
- (55) Li N, Bi X, Zhang Y, Zhao P, Zheng T, Dai M. Human papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126(2):515-520.
- (56) Pollán M, García-Mendizabal MJ, Gómez BP, Aragonés N, Lope V, Pastor R, et al. Situación epidemiológica del cáncer de mama en España. *Psicooncología* 2007;4(2):231-248.
- (57) Aceto GM, Solano AR, Neuman MI, Veschi S, Morgano A, Malatesta S, et al. High-risk human papilloma virus infection, tumor pathophenotypes, and BRCA1/2 and TP53 status in juvenile breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122(3):671-683.

- (58) Hedau S, Kumar U, Hussain S, Shukla S, Pande S, Jain N, et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer* 2011;11(1):27.
- (59) Alibek K, Kakpenova A, Mussabekova A, Sypabekova M, Karatayeva N. Role of viruses in the development of breast cancer. *Infect Agent Cancer* 2013;8(1):32-37.
- (60) Joshi D, Buehring GC. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2012;135(1):1-15.
- (61) Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* 2013;8(2):149-154.
- (62) Ira J Bleiweiss M. Pathology of breast cancer. UpToDate. 2014; Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/search>. Acceso: 19/12/2013.
- (63) Cusidó M, Fábregas R, Baulies S, Laila JM, Guedea F, Vazquez C, et al. Oncoguía SEGO: Cáncer de mama in situ. 2011.
- (64) Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24 Suppl 6:vi7-23.
- (65) Edge SB, Byrd DR, Compton CC (eds). *AJCC Cancer Staging Handbook*, 7th ed. New York, NY.: Springer, 2010.
- (66) Daniel F Hayes M. Tumor node metastasis (TNM) staging classification for breast cancer. UpToDate. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/search>. Acceso: Dic 2014.
- (67) Patani N, Martin L, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *International Journal of Cancer* 2013;133(1):1-13.
- (68) Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 1994;30(2):117-126.
- (69) Theodoros Foukakis M. Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer. UpToDate. Sep, 2014; Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/search>.
- (70) Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004;9(6):606-616.
- (71) Cusati MP, de la Muela, María Herrera, Hernaez DH, Dionisio MC, Guindo AR, de Santiago Garcia, Francisco Javier. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 2014;27(4):163-169.
- (72) Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama temprano. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 2001; 24 (Supl. 1): 99-110.

(73) Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol* 2010;4:15-34.

(74) Almagro E, González CS, Espinosa E. Factores pronósticos en el cáncer de mama en estadio inicial. in press. Available online 25 February 2015. *Medicina Clínica* 2015.doi:10.1016/j.medcli.2014.12.019.

(75) Cortese G, Itala J, Lange D, Provenzano S. Enfermedades de la glándula mamaria. Manejo integral de la patología benigna y maligna. 1ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana.; 2014.

(76) Partridge AH, Gelber S, Piccart-Gebhart MJ, Focant F, Scullion M, Holmes E, et al. Effect of age on breast cancer outcomes in women with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: results from a herceptin adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2013;31(21):2692-2698.

(77) Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117(1):199-204.

(78) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-187.

(79) Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983;52(9):1551-1557.

(80) Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Seminars in radiation oncology*: Elsevier; 2009; 19 (4): 195-203.

(81) Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 2003;9(6):1980-1989.

(82) M Elizabeth H Hammond, MD. Hormone receptors in breast cancer: Clinical utility and guideline recommendations to improve test accuracy. *UpToDate*. 2014; Disponible en: www.uptodate.com. Acceso: Dic, 2014.

(83) Purdie C, Quinlan P, Jordan L, Ashfield A, Ogston S, Dewar J, et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 2014;110(3):565-572.

(84) Thakkar JP, Mehta DG. A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *Oncologist* 2011;16(3):276-285.

(85) Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. Manual de Práctica Clínica en Senología Mamaria. 2015.

(86) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-792.

- (87) Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659-1672.
- (88) Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355(26):2733-2743.
- (89) Baselga J, Cortés J, Kim S, Im S, Hegg R, Im Y, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366(2):109-119.
- (90) Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;367(19):1783-1791.
- (91) de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 2007;96(10):1504-1513.
- (92) Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26(8):1533-1546.
- (93) Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24(9):2206-2223.
- (94) Sandoval GR, Sandoval HNM, Guerrero SIR. Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 2014;19(1):45-51.
- (95) Díaz-Faes J, Ruibal A, Tejerina A. Cáncer de Mama. Aspectos de interés actual. 1ª ed.: Fundación de Estudios Mastológicos; 2012.
- (96) Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-752.
- (97) Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8418-8423.
- (98) Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver, Marc J, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-536.
- (99) Imigo F, Mansilla E, Delama I. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuad.cir.(Valdivia)* 2011;25(1):67-74.
- (100) Zepeda-Castilla E, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, ROBLESVIDAL C, Maafs-Molina E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Ciruj* 2008;76(1):87-93.

(101) Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris III HA, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor–positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366(6):520-529.

(102) Turner NC, Ro J, André F, Loi S, Verma S, Iwata H, et al. Palbociclib in hormone-receptor–positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2015;373(3):209-219.

(103) Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Colleoni M, Dellapasqua S, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 2014;16(3):R65.

(104) Carey K Anders M, Lisa A Carey M.
Epidemiology, risk factors and the clinical approach to ER/PR negative, HER2-negative (Triple-negative) breast cancer. Dec, 2014; Disponible en: www.uptodate.com.

(105) Clinicaltrials.gov websites. Description of the TAILORx trial, 2015. ClinicalTrials.gov identifier:NCT00310180.

(106) Clinicaltrials.gov websites. Description of the Tamoxifen Citrate, Letrozole, Anastrozole, or Exemestane with or without chemotherapy in treating patients with invasive RxPONDER breast cancer, 2015. ClinicalTrials.gov identifier:NCT01272037.

(107) Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006 Sep 6;98(17):1183-1192.

(108) Rutgers E, Piccart-Gebhart MJ, Bogaerts J, Delaloge S, Van't Veer L, Rubio IT, et al. The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *Eur J Cancer* 2011;47(18):2742-2749.

(109) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 2011;378(9793):771-784.

(110) Gavilá J, Guerrero MA, Climent V, Guillem A, Ruíz A. 47th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO): resumen de los conceptos clínicos más relevantes. *Rev Senol Patol Mamar* (Ed impr) 2011;24(3):100-106.

(111) National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer Version 3.2012. Disponible en: <http://www.nccn.org/>. Acceso 02/2015.

(112) Adjuvant! Online. Disponible en: www.adjuvantonline.com/index.jsp. Acceso Septiembre 2015.

(113) Rakha E, Soria D, Green A, Lemetre C, Powe D, Nolan C, et al. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *Br J Cancer* 2014;110(7):1688-1697.

(114) Fisher B, Jeong J, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med* 2002;347(8):567-575.

(115) Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(16):1227-1232.

(116) Fisher B, Redmond C, Poisson R, Margolese R, Wolmark N, Wickerham L, et al. Eight-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1989;320(13):822-828.

(117) Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(16):1233-1241.

(118) Bernet L, Pinero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Revista Española de Patología* 2014;47(1):22-32.

(119) Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305(6):569-575.

(120) Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 2013;14(4):297-305.

(121) Solá M, Alberro JA, Fraile M, Santesteban P, Ramos M, Fabregas R, et al. Complete axillary lymph node dissection versus clinical follow-up in breast cancer patients with sentinel node micrometastasis: final results from the multicenter clinical trial AATRM 048/13/2000. *Annals of surgical oncology* 2013;20(1):120-127.

(122) Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer patients: Final analysis of the EORTC AMAROS trial (10981/22023). *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2013.

(123) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet* 2012;379(9814):432-444.

(124) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 2005;365(9472):1687-1717.

(125) Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *The Lancet Oncology* 2010;11(12):1135-1141.

(126) BIG 1-98 Collaborative Group, Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thurlimann B, Paridaens R, et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361(8):766-776.

(127) Van de Velde, Cornelis JH, Rea D, Seynaeve C, Putter H, Hasenburg A, Vannetzel J, et al. Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *The Lancet* 2011;377(9762):321-331.

(128) Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349(19):1793-1802.

(129) Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;4:CD006243.

(130) Baum M. Modern concepts of the natural history of breast cancer: A guide to the design and publication of trials of the treatment of breast cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(1):60-64.

(131) Domenici G, Rábano M, Piva M, Iriondo O, Zabalza I, López-Ruiz JA, et al. Respuesta hormonal de las células madre de mama y resistencia a tamoxifeno. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 2014;27(4):149-156.

(132) Simões BM, Vivanco Md. Cancer stem cells in the human mammary gland and regulation of their differentiation by estrogen. *Future Oncology* 2011;7(8):995-1006.

(133) Cabero L, Cabrillo E. Tratado de ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción. 2ªed ed. Madrid: Panamericana; 2012.

(134) Hausen Hz. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1996;1288(2):F55-F78.

(135) Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991;184(1):9-13.

(136) Puig-Tintoré LM. Prevención del cáncer cervical: vacunación y colposcopia. Módulo 1: infección por el virus del papilloma humano. : Asociación Española de Patología Cervical Y Colposcopia; 2011: 53-67.

(137) Wang T, Chang P, Wang L, Yao Q, Guo W, Chen J, et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. *Medical Oncology* 2012;29(1):48-55.

(138) Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(2):215-222.

(139) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244-265.

- (140) de Villiers E. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013;445(1-2):2-10.
- (141) IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation carcinogenic risk to humans/ World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 2012, 100B: 255-313.
- (142) LE Rodriguez Carunchio. Características clínico-patológicas diferenciales de los carcinomas de cérvix y de las lesiones intraepiteliales de alto grado negativos para virus del papiloma humano Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina.; 2014.
- (143) IARC. A review of human carcinogens - PartB: Biological Agents. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2011.
- (144) Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2002;2(5):342-350.
- (145) Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:F55-F70.
- (146) Rintala MA, Grenman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO, et al. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol* 2005 Jan;43(1):376-381.
- (147) Scheurer M, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International Journal of Gynecological Cancer* 2005;15(5):727-746.
- (148) Munoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3):S1-S10.
- (149) Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 3):S52-S61.
- (150) Otero B, Andía D, Cisterna R, Llerena R, Petreñas E, Gardezabal J, et al. Abordaje multidisciplinar de la infección por virus del papiloma humano. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 2015; 58 (7): 333-335.
- (151) Torné Blade A, del Pino Saladrigues M, Cusidó Gimferrer M, Alameda Quitlet F, Andia Ortiz D, Castellsagué Piqué X, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Prog Obstet Ginecol* 2014;57(Supl.1):1-53.
- (152) Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. *J Infect Dis* 1995;172(3):756-763.
- (153) Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *JAOA: Journal of the American Osteopathic Association* 2006;106(Suppl 1):S2-S8.

(154) Al Moustafa AE, Al-Awadhi R, Missaoui N, Adam I, Durusoy R, Ghabreau L, et al. Human papillomaviruses-related cancers. Presence and prevention strategies in the Middle east and north African regions. *Hum Vaccin Immunother* 2014;10(7):1812-1821.

(155) Jalilvand S, Shoja Z, Hamkar R. Human papillomavirus burden in different cancers in Iran: a systematic assessment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(17):7029-7035.

(156) Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010;202(12):1789-1799.

(157) WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. Disponible en: www.hpvcentre.net . Marzo. 2015 .

(158) Antonio Moreno Docón. Infección por el virus del papilomahumano en mujeres con lesión intraepitelial cervical: aspectos virológicos y clínicopatológicos. Murcia: Universidad de Murcia; 2014.

(159) Eide ML, Debaque H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. *Ann Pathol*. 2012;32(6):e15-23, 401-9.

(160) Laudadio J. Human papillomavirus detection: testing methodologies and their clinical utility in cervical cancer screening. *Adv Anat Pathol* 2013;20(3):158-167.

(161) Burd EM. Updated Guidelines for Cervical Cancer Screening. *Clin Microbiol News* 2014;36(13):95-103.

(162) Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *International journal of cancer* 2009;124(3):516-520.

(163) Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico molecular del papilomavirus humano: nuevos desafíos en un escenario diferente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2012;30(5):223-224.

(164) Manual de uso CLART PAPILOMAVIRUS HUMANO 2. Genotipado de Papillomavirus humano mediante identificación genómica para diagnóstico in vitro. Versión 9. Diciembre de 2010.

(165) Panel de la OMS VPH LabNet Proficiency 2011. Disponible en: <http://www.hpvebrid.com/>. Acceso: Agosto 2015.

(166) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol 90. 2007; Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/index.php>.

(167) Amarante MK, Watanabe MAE. The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135(3):329-337.

(168) Akhter J, Ali Aziz MA, Al Ajlan A, Tulbah A, Akhtar M. Breast cancer: is there a viral connection? *Adv Anat Pathol* 2014;21(5):373-381.

- (169) De Paoli P, Carbone A. Carcinogenic viruses and solid cancers without sufficient evidence of causal association. *Int J Cancer* 2013;133(7):1517-1529.
- (170) Gumus M, Yumuk P, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2006;25(4):515.
- (171) Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PloS one* 2012;7(11):e48788.
- (172) Tsai J, Tsai C, Cheng M, Lin S, Xu F, Yang C. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J Med Virol* 2005;75(2):276-281.
- (173) Tsai J, Hsu C, Tsai C, Su J, Liu Y, Cheng M, et al. Relationship between viral factors, axillary lymph node status and survival in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133(1):13-21.
- (174) Corbex M, Bouzbid S, Traverse-Glehen A, Aouras H, McKay-Chopin S, Carreira C, et al. Prevalence of Papillomaviruses, Polyomaviruses, and Herpesviruses in Triple-Negative and Inflammatory Breast Tumors from Algeria Compared with Other Types of Breast Cancer Tumors. *PloS one* 2014;9(12):e114559.
- (175) Nartey T, Moran H, Marin T, Arcaro KF, Anderton DL, Etkind P, et al. Human Mammary Tumor Virus (HMTV) sequences in human milk. *Infect Agent Cancer* 2014;9:20.
- (176) Pereira Suarez A, Lorenzetti M, González Lucano R, Cohen M, Gass H, Martínez Vazquez P, et al. Presence of Human Papilloma Virus in a Series of Breast Carcinoma from Argentina. *PloS one* 2013;8(4):e61613.
- (177) Aguayo F, Khan N, Koriyama C, González C, Ampuero S, Padilla O, et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from Chile. *Infect Agent Cancer* 2011;23(6):1.
- (178) Bae JM. Two hypotheses of dense breasts and viral infection for explaining incidence of breast cancer by age group in Korean women. *Epidemiol Health* 2014;36:e2014020.
- (179) Fimereli D, Gacquer D, Fumagalli D, Salgado R, Rothe F, Larsimont D, et al. No significant viral transcription detected in whole breast cancer transcriptomes. *BMC Cancer* 2015;15:147.
- (180) Hill AB. The Environment and Disease: Association Or Causation? *Proc R Soc Med* 1965;58:295-300.
- (181) Bratthauer G, Tavassoli F, O'Leary T. Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathology-Research and Practice* 1992;188(3):384-386.
- (182) Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21(2):95-100.

(183) Wrede D, Luqmani Y, Coombes R, Vousden K. Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65(6):891.

(184) Czerwenka K, Heuss F, Hosmann JW, Manavi M, Lu Y, Jelincic D, et al. Human papilloma virus DNA: a factor in the pathogenesis of mammary Paget's disease? *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(1):51-57.

(185) Gopalkrishna V, Singh U, Sodhani P, Sharma J, Hedau S, Mandal A, et al. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39(2):197-202.

(186) Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat* 1999;53(2):121-135.

(187) Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, et al. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res* 1999;19(6B):5057-5061.

(188) Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, et al. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer* 2000;7(1):33-36.

(189) Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, et al. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *J Hum Virol* 2001;4(6):329-334.

(190) Li T, Lu Z, Guo M, Wu Q, Chen K, Xing H, et al. p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer* 2002;95(12):2571-2576.

(191) Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84(2):131-137.

(192) Noguera C, Piuze V, ML-Soto de Ferrini S, Acosta P, Cerdera Noguera A. Virus Papiloma Humano y su Relación con Cáncer de Mama. Informe Preliminar. 2004 Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/3-Medicina/M-082.pdf>

(193) Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *Journal of Clinical Virology* 2004;31(4):292-297.

(194) De Villiers E, Sandstrom RE, Zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R1-11.

(195) Kan C, Iacopetta B, Lawson J, Whitaker N. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93(8):946-948.

(196) Kroupis C, Markou A, Vourlidis N, Dionyssiou-Asteriou A, Lianidou ES. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006;39(7):727-731.

- (197) Lindel K, Forster A, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *The breast* 2007;16(2):172-177.
- (198) Yasmeen A, Bismar TA, Kandouz M, Foulkes WD, Desprez P, Al Moustafa A. E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Cell cycle* 2007;6(16):2038-2042.
- (199) Choi YL, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, et al. Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women. *Tumour Biol* 2007;28(6):327-332.
- (200) Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel A, Al Moustafa A. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *Br J Cancer* 2008;99(3):404-407.
- (201) Duò D, Ghimenti C, Migliora P, Pavanelli MC, Mastracci L, Angeli G. Identification and characterization of human papillomavirus DNA sequences in Italian breast cancer patients by PCR and line probe assay reverse hybridization. *Molecular medicine reports* 2008;1(5):673-677.
- (202) Khan N, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, et al. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br J Cancer* 2008;99(3):408-414.
- (203) de Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X. No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109(1):55-58.
- (204) de Leon DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, et al. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer* 2009 Jan 22;9:26.
- (205) Mendizabal-Ruiz A, Morales J, Ramirez-Jirano L, Padilla-Rosas M, Morán-Moguel M, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114(1):189-194.
- (206) He Q, Zhang SQ, Chu YL, Jia XL, Wang XL. The correlations between HPV16 infection and expressions of c-erbB-2 and bcl-2 in breast carcinoma. *Mol Biol Rep* 2009;36(4):807-812.
- (207) Heng B, Glenn W, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101(8):1345-1350.
- (208) Ong K, Koay ES, Putti TC. Detection of cutaneous HPV types 4 and 24 DNA sequences in breast carcinoma in Singaporean women of Asian ancestry. *Pathology* 2009;41(5):436-442.
- (209) Hachana M, Ziadi S, Amara K, Toumi I, Korbi S, Trimeche M. No evidence of human papillomavirus DNA in breast carcinoma in Tunisian patients. *The Breast* 2010;19(6):541-544.
- (210) Yavuzer D, Salepci T, Karadayi N, Baloglu H, Kucukodaci Z. Human papillomavirus is not associated with breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122(3):899-900.

- (211) Antonsson A, Spurr TP, Chen AC, Francis GD, McMillan NA, Saunders NA, et al. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. *J Med Virol* 2011;83(12):2157-2163.
- (212) Ghaffari SR, Sabokbar T, Meshkat Z, Fereidooni F, Dastan J, Rafati M, et al. Tracing human papilloma virus in breast tumors of Iranian breast cancer patients. *Breast J* 2011;17(2):218-219.
- (213) Mou X, Chen L, Liu F, Shen Y, Wang H, Li Y, et al. Low prevalence of human papillomavirus (HPV) in Chinese patients with breast cancer. *J Int Med Res* 2011;39(5):1636-1644.
- (214) Silva Jr RG, da Silva BB. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125(1):261-264.
- (215) Baltzell K, Buehring GC, Krishnamurthy S, Kuerer H, Shen HM, Sison JD. Limited evidence of human papillomavirus on breast tissue using molecular in situ methods. *Cancer* 2012;118(5):1212-1220.
- (216) Chang P, Wang T, Yao Q, Lv Y, Zhang J, Guo W, et al. Absence of human papillomavirus in patients with breast cancer in north-west China. *Medical Oncology* 2012;29(2):521-525.
- (217) Glenn WK, Whitaker NJ, Lawson JS. High risk human papillomavirus and Epstein Barr virus in human breast milk. *BMC Res Notes* 2012;5:477-0500-5-477.
- (218) Herrera-Romano L, Fernández-Tamayo N, Gómez-Conde E, Reyes-Cardoso JM, Ortiz-Gutierrez F, Ceballos G, et al. Absence of human papillomavirus sequences in epithelial breast cancer in a Mexican female population. *Medical Oncology* 2012;29(3):1515-1517.
- (219) Sigaroodi A, Nadji SA, Naghshvar F, Nategh R, Emami H, Velayati AA. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. *The Scientific World Journal* 2012;2012: 837191.
- (220) Herrera-Goepfert R, Vela-Chávez T, Carrillo-García A, Lizano-Soberón M, Amador-Molina A, Oñate-Ocaña LF, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. *BMC Cancer* 2013;13(1):445.
- (221) Hossein R, Behzad S, Tahar M, Azadeh NA. Prevalence of human papillomavirus genotypes associated with cervical and breast cancers in iran. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2013;32(6):399-403.
- (222) Kwong A, Leung CP, Shin VY, Ng EK. No Evidence of Human Papillomavirus in Patients with Breast Cancer in Hong Kong, Southern China. *ISRN Virology* 2013;2013: 546503.
- (223) Liang W, Wang J, Wang C, Lv Y, Gao H, Zhang K, et al. Detection of high-risk human papillomaviruses in fresh breast cancer samples using the hybrid capture 2 assay. *J Med Virol* 2013;85(12):2087-2092.
- (224) Ali SH, Al-Alwan NA, Al-Alwany SH. Detection and genotyping of human papillomavirus in breast cancer tissues from Iraqi patients. *East Mediterr Health J* 2014;20(6):372-377.

- (225) Ahangar-Oskouee M, Shahmahmoodi S, Jalilvand S, Mahmoodi M, Ziaee AA, Esmaeili H, et al. No Detection of 'High-risk' Human Papillomaviruses in a Group of Iranian Women with Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014;15(9):4061-4065.
- (226) Manzouri L, Salehi R, Shariatpanahi S. Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005-2009 in Isfahan. *Advanced biomedical research* 2014;3:75.
- (227) Ohba K, Ichiyama K, Yajima M, Gemma N, Nikaido M, Wu Q, et al. In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PLoS One* 2014 May 23;9(5):e97787.
- (228) Lv YR, Wang JL, Zhang K, Gao HD, Sun JZ, Gong YY, et al. Human papilloma viruses (HPVs) no co-existence in breast cancer and cervical cells in the same patient. *Chin J Physiol* 2014;57(2):105-106.
- (229) Piana A, Sotgiu G, Muroli M, Cossu-Rocca P, Castiglia P, De Miglio M. HPV infection and triple-negative breast cancers: an Italian case-control study. *Virology* 2014;11(1):190.
- (230) Wang T, Zeng X, Li W, Zhu H, Wang G, Liu X, et al. Detection and analysis of human papillomavirus (HPV) DNA in breast cancer patients by an effective method of HPV capture. *PLoS One* 2014;9(3):e90343.
- (231) Fernandes A, Bianchi G, Feltri AP, Pérez M, Correnti M. Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. *ecancermedicalscience* 2015;9: 548.
- (232) Fu L, Wang D, Shah W, Wang Y, Zhang G, He J. Association of human papillomavirus type 58 with breast cancer in shaanxi province of China. *J Med Virol* 2015; 87(6):1034-40.
- (233) Li J, Ding J, Zhai K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. *PLoS one* 2015;10(8):e0136050.
- (234) Salehpour M, Tayyebi Meibodi N, Teimourpour R, Ghorani-Azam A, Sepahi S, Rostami S, et al. Frequency of Human Papillomavirus Genotypes 6, 11, 16, 18 And 31 in Paraffin-Embedded Tissue Samples of Invasive Breast Carcinoma, North-East of Iran. *Iranian Journal of Pathology* 2015;10(3):192-198.
- (235) Vernet-Tomas M, Mena M, Alemany L, Bravo I, De Sanjose S, Nicolau P, et al. Human papillomavirus and breast cancer: no evidence of association in a spanish set of cases. *Anticancer Res* 2015;35(2):851-856.
- (236) Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(16):2784-2795.
- (237) Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3997-4013.

(238) Boletín Oficial del Estado. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE nú m 2007;159:28826-28848.

(239) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad. Gobierno de España. Informe a las Cortes Generales de evaluación del impacto sobre la salud pública de la Ley 42/2010. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/proteccionSalud/tabaco/docs/Informe_Impacto_Salud_Ley_Tabaco.pdf. Acceso: Agosto/2015.

(240) Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(1):463-467.

(241) Khan MA, Canhoto AJ, Housley PR, Creek KE, Pirisi L. Glucocorticoids stimulate growth of human papillomavirus type 16 (HPV16)-immortalized human keratinocytes and support HPV16-mediated immortalization without affecting the levels of HPV16 E6/E7 mRNA. *Exp Cell Res* 1997;236(1):304-310.

(242) Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):171-179.

(243) Shai A, Pitot HC, Lambert PF. p53 Loss synergizes with estrogen and papillomaviral oncogenes to induce cervical and breast cancers. *Cancer Res* 2008;68(8):2622-2631.

(244) Yasmeeen A, Bismar TA, Dekhil H, Ricciardi R, Kassab A, Gambacorti-Passerini C, et al. ErbB-2 receptor cooperates with E6/E7 oncoproteins of HPV type 16 in breast tumorigenesis. *Cell Cycle* 2007;6(23):2939-2943.

(245) Woods Ignatoski KM, Dziubinski ML, Ammerman C, Ethier SP. Cooperative interactions of HER-2 and HPV-16 oncoproteins in the malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Neoplasia* 2005;7(8):788-798.

(246) Subhawong AP, Subhawong T, Nassar H, Kouprina N, Begum S, Vang R, et al. Most basal-like breast carcinomas demonstrate the same Rb-/p16+ immunophenotype as the HPV-related poorly differentiated squamous cell carcinomas which they resemble morphologically. *Am J Surg Pathol* 2009;33(2):163-175.

(247) Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, Garcia-Bragado F, Dikshit R, Boffetta P, et al. Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology* 2007;39(3):345-348.

(248) De Guglielmo Z, Ávila M, Fernandes A, Veitía D, Correnti M. Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH. *Rev.Soc.Venez.Microbiol* 2013;33(1):83-86.

(249) Steinau M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2011;13(4):377-381.

- (250) Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000;88(2):125-134.
- (251) Hernandez J, Elahi A, Siegel E, Coppola D, Riggs B, Shibata D. HPV L1 capsid protein detection and progression of anal squamous neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2011;135(3):436-441.
- (252) Lawson J, Glenn W, Heng B, Ye Y, Tran B, Lutze-Mann L, et al. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101(8):1351-1356.
- (253) Sarkola M, Rintala M, Grenman S, Syrjanen S. Human papillomavirus DNA detected in breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27(6):557-558.
- (254) Hansen B, Nygård M, Falk R, Hofvind S. Breast cancer and ductal carcinoma in situ among women with prior squamous or glandular precancer in the cervix: a register-based study. *Br J Cancer* 2012;107(9):1451-1453.
- (255) Jakobsson M, Pukkala E, Paavonen J, Tapper A, Gissler M. Cancer incidence among Finnish women with surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia, 1987–2006. *International Journal of Cancer* 2011;128(5):1187-1191.
- (256) Yoshida K, Furumoto H, Abe A, Kato T, Nishimura M, Kuwahara A, et al. The possibility of vertical transmission of human papillomavirus through maternal milk. *J Obstet Gynaecol* 2011;31(6):503-506.
- (257) Mammas IN, Zaravinos A, Sourvinos G, Myriokefalitakis N, Theodoridou M, Spandidos DA. Can 'high-risk' human papillomaviruses (HPVs) be detected in human breast milk? *Acta Paediatrica* 2011;100(5):705-707.
- (258) Cazzaniga M, Gheit T, Casadio C, Khan N, Macis D, Valenti F, et al. Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114(3):599-605.
- (259) Bryan JT, Brown DR. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 2001;281(1):35-42.
- (260) Adamopoulou M, Vairaktaris E, Nkenke E, Avgoustidis D, Karakitsos P, Sioulas V, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women. *Gynecol Oncol* 2013; 129(2): 395-400.
- (261) Lazzeroni M, Serrano D. Potential Use of Vaccines in the Primary Prevention of Breast Cancer in High-Risk Patients. *Breast Care* 2012;7(4):281-287.



9. Anexos

Anexo 1: Aceptación del estudio por parte del Comité Ética de Investigación Clínica.

 **GENERALITAT VALENCIANA**
CONSELLERIA DE SANITAT

 **AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT**

(Ref. CEIC PI2013/03)

INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su sesión del día 24 de Abril de 2013, y una vez estudiada la documentación presentada por la **Dra. Silvia Inés Delgado García**, Médico Residente de 4º Año del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado "**Implicación del VPH en el cáncer de mama**", se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste, lo firma en Alicante con fecha veinticuatro de Abril de dos mil trece.


Fdo. Elena López Navarro
Secretaria del CEIC



Departamento de Salud de Alicante
Hospital General
Avda. Pintor Baeza, 12 • 03010 ALICANTE • Tel. 965 938 300 • Fax 965 245 971

Anexo 2: Aceptación por parte de la Gerencia del HGUA del estudio.


HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE
Y CENTRO DE ESPECIALIDADES BABEL

El Dr. J.A. Viudas, Gerente del Hospital General Universitario de Alicante,
.....Leído y valorado el Proyecto de Investigación:

**IMPLICACIÓN DEL VIRUS DEL PAIPLOMA HUMANO (VPH) EN EL
CANCER DE MAMA**

Cuyos autores son personal de este Hospital General Universitario de Alicante,

Acuerdo:

..... dar mi autorización a que dicho trabajo sea realizado en el Hospital General Universitario de Alicante dentro de las actividades investigadoras que la labor del Hospital viene realizando en el contexto de la asistencia a la población del Departamento de Salud.

Visto Bueno.



Dr. J. A. Viudas
Gerente del Hospital General Universitario de Alicante

Alicante, 28 de enero de 2013.

Anexo 3: Autorización del CEIC del HGUA para que el Biobanco nos ceda las muestras para el estudio (dos hojas).


AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT

COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARI DE ALICANTE
 C/ Pintor Baeza, 12 - 03010 Alicante
<http://www.ceip19.san.gva.es>
 Teléfono: 965 91 35 65
 Fax: 965 91 35 90
 Correo electrónico: ceic_hgua@gva.es

DICTAMEN DEL COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA

D^a. Mayte Domenech Varón, Secretaria del Comitè Ètic de Investigació Clínica del Hospital General Universitario de Alicante.

CERTIFICA:

Que este CEIC ha evaluado en la reunión del día 24 de Julio de 2013, la solicitud de muestras del Biobanco del HGUA, con referencia de solicitud del Biobanco S13-008, de fecha 11 de Junio del 2013, para el proyecto:

TITULO: *Implicación del VPH en carcinoma de mama*
INVESTIGADOR PRINCIPAL: *Dra. Silvia Delgado (Servicio de Obstetricia y Ginecología).*
Ref. CEIC: *PI2013/03*

Y tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La cualificación del investigador principal y la del equipo investigador así como la factibilidad del proyecto.
- Los aspectos metodológicos, éticos y legales del proyecto de investigación.
- El balance de riesgos y beneficios anticipados dimanantes del estudio.
- El cumplimiento de procedimientos que permiten asegurar la trazabilidad de las muestras de origen humano, sin perjuicio de lo dispuesto en la legislación de protección de datos de carácter personal.

Y una vez comprobados que los miembros del CEIC que pudieran tener un interés directo o indirecto en el proyecto se han abstenido de tomar parte en las deliberaciones y en las votaciones,

Departamento de Salud de Alicante
 Hospital General
 Avda. Pintor Baeza, 12 • 03010 ALICANTE • Tel. 965 938 300 • Fax 965 245 971

GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA DE SANITAT

 **AGÈNCIA
VALENCIANA
DE SALUT**

**COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE**
C/ Pintor Baeza, 12 - 03010 Alicante
<http://www.dep19.san.gva.es>
Teléfono: 965 91 38 68
Fax: 965 91 38 66
Correo electrónico: ceic_hgus@gva.es

Informa que este Comité emite informe favorable para el estudio y **autoriza la
cesión al proyecto de las muestras solicitadas.**

En Alicante a 24 de Julio de 2013


Fdo. Mayte Domenech Varón
Secretaria del CEIC





Departamento de Salud de Alicante
Hospital General
Avda. Pintor Baeza, 12 • 03010 ALICANTE • Tel. 965 938 300 • Fax 965 245 971

Anexo 4: Autorización CEIC para utilizar muestras de cáncer de mama del HGUA por Biobanco

 **GENERALITAT VALENCIANA**
CONSELLERIA DE SANITAT

 **AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT**

D^a. Elena López Navarro, como Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su reunión de 9 de junio de 2010 (acta 2010/07)

CERTIFICA que

Habiendo recibido, a través de su Directora Científica D^a Cristina Alenda González, la solicitud al CEIC de incorporación al biobanco del HGUA, de la **colección de muestras de CARCINOMA DE MAMA** y petición de exención del consentimiento informado de muestras codificadas sin consentimiento del sujeto fuente, de acuerdo con la disposición transitoria segunda de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

Ha valorado:

- Que se trata de una investigación de interés general
- Que la investigación sea menos efectiva o no sea posible sin los datos identificativos del sujeto fuente
- Que no consta una objeción expresa del mismo.
- Que se garantiza la confidencialidad de los datos de carácter personal.

Y de conformidad con la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, acuerda emitir informe favorable a la exención del consentimiento informado para la incorporación de dichas muestras al biobanco.

Lo que firmo en Alicante a nueve de junio de dos mil diez.


Fdo. Elena López Navarro
Secretaria del CEIC

Departamento de Salud de Alicante
Hospital General
Avda. Pintor Baeza, 12 · 03010 ALICANTE · Tel. 965 938 300 · Fax. 965 245 971

Anexo 5: Consentimiento informado para formar parte del estudio.

Hoja de Información al Paciente

**Servicio de Obstetricia y Ginecología
Hospital General Universitario de Alicante**

Implicación del HPV en el cáncer de mama

Se le propone participar en un estudio promovido por el Servicio de Obstetricia y Ginecología, junto con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Alicante en el que se pretende averiguar si en las piezas quirúrgicas de patología mamaria se encuentra el virus del papiloma humano.

Es muy importante que usted sepa que es libre de decidir si quiere participar en este estudio, sin que esto condicione la atención médica que se le está prestando y se le prestará en adelante. Además, podría retirar su consentimiento para este estudio en cualquier momento sin necesidad de tener que dar explicaciones.

Si acepta participar en el estudio, deberá firmar este consentimiento informado del que se le proporcionará una copia.

Le pedimos que nos autorice para analizar la existencia del virus en la pieza quirúrgica correspondiente a la patología mamaria que Usted ha tenido.

Además se recogerán algunos datos clínicos referentes a su enfermedad actual y sus características sociodemográficas; en todo momento se tratarán de manera confidencial y anónima, identificando los datos mediante un código y no por su nombre ni cualquier otro identificador que le relacione con esta información. En todo momento se respetará la normativa sobre el tratamiento de datos personales regulada por la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Este estudio es un estudio sin ánimo de lucro que pretende responder a preguntas que se consideran relevantes en el futuro tratamiento de pacientes como usted. Los costes de las pruebas de laboratorio son financiados por una beca. Ninguno de los investigadores ni el centro reciben gratificación económica alguna por su participación en el estudio.

Si tiene alguna duda sobre la información que acaba de leer, pregunte al médico que le ha facilitado esta hoja. Sobre cualquier duda o problema relacionado con el estudio puede contactar con el investigador principal o alguno de sus colaboradores.

Título del estudio: Implicación del HPV en el cáncer de mama

Yo, _____
(nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con _____
(nombre y apellidos del investigador)

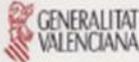
Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Anexo 6: Exención del CEIC de solicitar por escrito Consentimiento Informado a los controles.

 GENERALITAT
VALENCIANA

 CENTRO SUPERIOR DE
INVESTIGACIÓN EN
SALUD PÚBLICA

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Elías Ruiz Rojo, Secretario del CEIC de la DGSP y CSISP.

CERTIFICA:

Que este CEIC ha evaluado en la reunión del día 26 de julio de 2013 la solicitud de muestras de la Red Valenciana de Biobancos con **REFERENCIA: RVB13004TST (S13-008)**, de fecha 14 de mayo del 2013. Considerándose procedente:

- ✓ Autorizar la cesión al proyecto de las muestras solicitadas que cuentan con CI específico de Biobanco.
- ✓ Autorizar la cesión al proyecto de las muestras solicitadas obtenidas con anterioridad a la entrada en vigor de la Ley de Investigación Biomédica que no disponen de CI.
- ✓ Autorizar la cesión al proyecto de las muestras solicitadas de donantes que han fallecido.
- ✓ Autorizar la cesión al proyecto de las muestras solicitadas de aquellos donantes que no han sido localizados.
- ✓ Autorizar la cesión al proyecto de las muestras solicitadas de aquellos donantes que han sido localizados, que no cuentan con CI, condicionada a la obtención del mismo y tras la comunicación a este CEIC.

Valencia a 1 de Agosto de 2013
Secretario del CEIC de la DGSP y CSISP



Fdo.: Elías Ruiz Rojo