

# Detección y tipificación de virus del papiloma humano en biopsias de carcinoma ductal infiltrante y lesiones benignas de mama en mujeres venezolanas

Mg. Scs. Marisé Solorzano<sup>1</sup>, Marco Bastidas<sup>1</sup>, Militza Quintero<sup>1</sup>, Lisbeth Rojas<sup>2</sup>, Domingo Stea<sup>2</sup>, Saúl Villasmil<sup>3</sup>, Víctor Acosta<sup>4</sup>, Carmen Marín<sup>4</sup>, Ana Ramírez<sup>4</sup>, Lcda. Natasha Blanco<sup>1</sup>, Drs. Jhon Cruz<sup>1</sup>, Juan Puig<sup>1</sup>.

## RESUMEN

**Objetivo:** Realizar la detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en muestras de biopsias de tejido mamario con carcinoma ductal infiltrante.

**Métodos:** Estudio descriptivo de corte transversal de 57 biopsias de carcinoma ductal infiltrante, y 41 biopsias de lesiones benignas de mama de pacientes venezolanas, estas fueron evaluadas utilizando la técnica PCR-RFLP en busca de la presencia del genoma del virus de papiloma humano. El riesgo OR fue evaluado mediante análisis estadístico con el paquete SPSS 12.0.

**Resultados:** Treinta y tres (57,9 %) de las muestras de carcinoma ductal infiltrante tuvieron un resultado positivo para virus de papiloma humano, 19 de ellas pudieron ser tipificadas como: VPH-6b 15,15 %; VPH-11 3,03 %; VPH-18 12,12 %; VPH-33 27,27 %; VPH-45 3,03 % y VPH-58 3,03 %; de este grupo el 42,4 % fueron positivas no determinadas para la presencia de ADN del virus. Seis biopsias de lesiones benignas (14,6 %), presentaron infección por virus de papiloma humano, determinándose para ellas los tipos VPH-6b 33,33 %, VPH-11 16,67%, VPH-33 16,67% y 33,33 % positivas no determinadas. Se determinó estadísticamente que la presencia de virus de papiloma humano en tejido mamario aumenta 10,77 veces la posibilidad de desarrollar carcinoma ductal infiltrante.

**Conclusiones:** Los hallazgos corroboran los resultados de otros investigadores, colocando al virus de papiloma humano como posible agente involucrado en la inmortalización de las células epiteliales de la mama.

**Palabras clave:** Carcinoma de mama, Carcinoma ductal infiltrante, Virus de papiloma humano, Tipificación de VPH, PCR-RFLP.

## SUMMARY

**Objective:** To perform the detection and typing of human papilloma (HPV) virus in biopsy samples of breast tissue invasive ductal cancer.

**Methods:** Cross-sectional study of 57 biopsies of invasive ductal carcinoma, and 41 biopsies of benign breast lesions of Venezuelan patients were evaluated using the PCR-RFLP technique for the presence of the human papillomavirus genome. The OR risk was evaluated by statistical analysis using SPSS package.

**Results:** Thirty-three (57.9%) of invasive ductal carcinoma samples had a positive result for human papillomavirus, 19 of them could be classified as: HPV-6b 15.15%; HPV-11 3.03%; HPV-18 12.12%; HPV-33 27.27%; HPV-45 3.03% and HPV-58 3.03%. This group 42.4% were positive not determined for the presence of virus DNA. Six biopsies of benign lesions (14.6%) had human papillomavirus infection, determining for themselves the types HPV-6b 33.33%, 16.67% HPV-11, HPV-33 16.67% and 33.33% not determined positive. It is statistically determined that the presence of human papillomavirus in breast tissue 10.77 times increases the possibility of developing invasive ductal carcinoma.

**Conclusions:** These findings corroborate the results of other researchers, placing human papillomavirus as a possible agent involved in the immortalization of epithelial cells of the breast.

**Keywords:** Breast cancer, Infiltrating ductal carcinoma, HPV, HPV typing, PCR-RFLP.

## INTRODUCCIÓN

La asociación de algunos virus con tejidos neoplásicos ha aportado, en las últimas décadas, argumentos decisivos para la identificación de los factores desencadenantes de la transformación celular. Esto ha permitido establecer

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología y Medicina Experimental de la Universidad de Los Andes. <sup>2</sup>Laboratorio de Histopatología e Inmunohistoquímica Domingo Stea Mérida – Venezuela. <sup>3</sup> Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela. <sup>4</sup>Centro Clínico de Estereotaxia (CECLINES). Caracas – Venezuela.

las bases genéticas del cáncer, válidas también para aquellas neoplasias no inducidas por virus (1). A nivel mundial, el carcinoma de mama presenta una incidencia del 43,1 % siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, seguido del carcinoma colorectal (14,3 %) y del carcinoma cervicouterino (14,0 %). En países en vías de desarrollo la incidencia del carcinoma de mama es del 31,3 % seguido del carcinoma cervicouterino con una incidencia del 15,4 %. En países desarrollados el carcinoma de mama presenta una incidencia del 73,4 % mientras que el carcinoma de cuello uterino presenta una incidencia de solo el 9,9 % (2 - 4). Las infecciones con el virus del papiloma humano (VPH) están estrechamente ligadas al desarrollo de carcinoma cervical y representan una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes a nivel mundial (5, 6). Desde los reportes iniciales realizados por Harald zür Hausen (7), en los años setenta, sugiriendo la participación del VPH en el desarrollo de carcinoma cervical, han sido numerosos los estudios moleculares, epidemiológicos y clínicos que claramente implican al VPH como uno de los agentes etiológicos en diversos tipos de cáncer tales como: carcinoma anogenital, cervical, de pene, de vejiga y más recientemente, carcinomas mamarios (4, 8, 9). El desarrollo del carcinoma mamario se encuentra asociado a factores tanto ambientales como genéticos. Se ha propuesto recientemente que el VPH puede ser un factor importante en la aparición y desarrollo de carcinoma de mama (10). El VPH representa un problema de salud pública, encontrándose en más del 70 % de la población venezolana (11). Este virus ha sido recientemente identificado en tejido neoplásico de mama en diferentes laboratorios alrededor del mundo, indicando que posiblemente exista un vínculo entre la presencia de VPH y el inicio de la enfermedad. Existen diferentes tipos de cáncer de mama, dentro de las más comunes están: el carcinoma ductal infiltrante, el carcinoma lobulillar infiltrante y sus contrapartes neoplásicas intraepiteliales (12, 13). El carcinoma ductal infiltrante (CDI), representa 80 % de los carcinomas de mama; el carcinoma lobulillar infiltrante el 15 % (10). La vía molecular que relaciona el papiloma virus con el carcinoma de mama es aún incierta, aunque existen varios estudios que han reportado VPH de alto riesgo en más del 50 % de biopsias de carcinoma de mama en diferentes países (14 - 22). Incluso, se ha reportado en una misma paciente, un único tipo de VPH tanto en carcinoma de mama como en carcinoma cervical (23, 24). Cifras del Ministerio del Poder Popular para la

Salud, publicadas en el Anuario de Mortalidad de 2010 (25), revelan que, de las 21 185 personas fallecidas por cáncer, 10 269 fueron mujeres con carcinoma de mama, representando la primera causa de muerte por cáncer en la mujer venezolana y el mayor número de muertes se registró en edades comprendidas entre 45 y 64 años. En Venezuela, el 80 % de los casos de carcinoma de mama se detecta en etapa avanzada y el 20 % en etapa temprana, mientras en el mundo la proporción es inversa (25). Debido a esto, el presente trabajo se enfoca en realizar la detección de VPH y su tipificación en biopsias de tejido mamario neoplásico de pacientes venezolanas.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles, descriptivo, de corte transversal, de 98 biopsias de lesiones de tejido mamario embebido en parafina, colectadas aleatoriamente del Laboratorio de Histopatología e Inmuno-histoquímica Domingo Stea (Mérida-Venezuela) y del Centro Clínico de Estereotaxia (Caracas-Venezuela). Las biopsias incluyeron 57 muestras de carcinoma ductal infiltrante y 41 muestras de lesiones benignas de mama (fibroadenoma y cambios fibroquísticos). Para cada una de ellas se hicieron diez cortes histológicos de 10 µm de espesor a partir del bloque de parafina. La extracción de ADN se inició con el desparafinado mediante el método de Mirshahabi y col. (26). La purificación de ADN se realizó por el método de la precipitación fenólica (27). El pellet de ADN fue resuspendido en 50 µl de buffer TE 10 mM pH 8. La pureza y concentración del ADN obtenido fue determinada por espectrofotometría con el cociente 260/280 nm (27). La integridad del ADN total extraído se comprobó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 268 pb del gen de β-globina humana, utilizando los oligonucleótidos PC04 y GH20 (28). La detección y tipificación se realizó utilizando los oligonucleótidos degenerados MY09 y MY11 y el análisis por RFLP de estos amplificados de 450 pb del gen viral L1, con la enzima HpyCH4V (29). Se realizó una segunda amplificación anidada al primer amplicón de MY09/ MY11 (L1) con los oligonucleótidos GP5+/ GP6+, la cual tiene como propósito la detección de ADN del virus en muestras que fueron negativas para el amplificado MY09/ MY11 (30) Todos los amplicones y productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida horizontal al 6 % (31), y teñidos con bromuro de Etidio (10<sup>-3</sup> mg/ml)

para su visualización bajo luz ultravioleta. Se realizó análisis genético utilizando el programa estadístico SPSS 12.0.

## RESULTADOS

Todas las muestras arrojaron resultados positivos para la amplificación del gen  $\beta$ -globina, indicando que la extracción fue satisfactoria y el ADN conservaba su integridad. Espectrofotométricamente se determinó un promedio de concentración de ADN de 378 ng/ $\mu$ l y una pureza promedio de 1,9. Las muestras fueron sometidas a dos reacciones de PCR (reacción en cadena de polimerasa) específicas para el virus del papiloma humano. La primera de ellas amplifica parte del gen L1 del VPH con oligonucleótidos consenso MY09/MY11, los fragmentos obtenidos fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción HpyCH4V resultando en patrones de bandas característicos para cada tipo viral (31). El mayor porcentaje de positividad para ADN de VPH en los grupos en estudio, corresponde a 33 muestras de las 57 con CDI (57,89 %), los tipos virales detectados en las muestras con CDI fueron: VPH-6b 15,15 %; VPH-11 3,03 %; VPH-18 12,12 %; VPH-33 27,27 %; VPH-45 3,03 % y VPH-58 3,03 % (Figura 1). Catorce muestras resultaron positivas no determinadas para el sistema GP5+/GP6+.

De las 41 lesiones benignas de mama, 6 muestras (14,63 %) presentaban infección por VPH, los tipos virales detectados fueron: VPH-6b 33,33 %, VPH-11 16,67 %, VPH-33 16,67 % y 33,33 % positivas no determinadas (Figura 1).

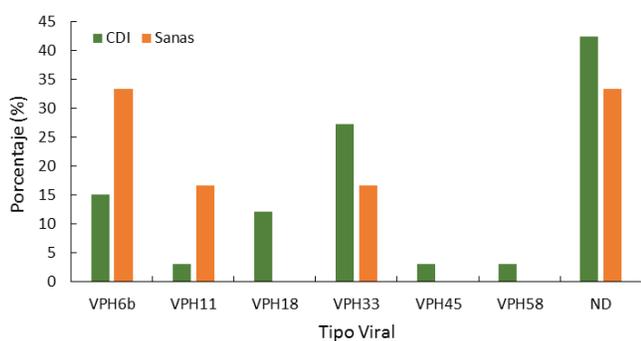


Figura 1.

Porcentaje de los distintos tipos de VPH encontrados en las muestras analizadas con cáncer ductal infiltrante (CDI) y muestras sanas. Las muestras señaladas como no determinadas (ND) fueron detectadas por el sistema GP5+/GP6+.

En la tabla 1 se agrupan los resultados de diagnóstico de todas las muestras en estudio, mostrando el porcentaje de biopsias positivas y negativas para ADN viral en cada grupo de estudio. El análisis de Chi-cuadrado arrojó un valor de  $\chi^2 = 26,335$  (valor mínimo esperado: 4,29), para evaluar en qué medida se relaciona la presencia del VPH con el desarrollo de carcinoma de mamas. El valor obtenido, es considerablemente mayor al valor mínimo esperado, indicando que la presencia del VPH debe estar vinculada con el desarrollo de tumores mamarios malignos. Además de esto, se obtuvo un OR de 10,77. Esto significa que hay un 91,5 % de probabilidades de desarrollar carcinoma de mamas si se tiene infección por VPH.

Tabla 1.

Distribución de la presencia de ADN de VPH en las muestras estudiadas. Las muestras con carcinoma ductal infiltrante (CDI), son comparadas con muestras con lesiones de mama benignas de etiología variada.

Lesión de mama	Presencia de ADN de Virus de Papiloma Humano	
	Positivo N (%)	Negativo N (%)
Carcinoma ductal infiltrante (N=57)	33 (57,8)	24 (42,11)
Lesiones benignas (N= 41)	6 (14,63)	35 (85,37)

$\chi^2 = 26,335$  OR 10,77

## DISCUSIÓN

En el presente estudio fue posible la extracción y purificación de ácidos nucleicos de buena calidad a partir de las muestras de tejido embebido en parafina, provenientes de pacientes con lesiones mamarias. Para la tipificación, los amplificadores generados en la reacción MY09/MY11, fueron sometidos a RFLP según se mencionó en la metodología. Entre los patrones obtenidos, pudo identificarse claramente los tipos VPH-6, VPH-11, VPH-18, VPH-33, VPH-45 y VPH-58; el tipo viral encontrado con mayor frecuencia fue VPH-33 (30,3 %). En otros casos, la identificación fue más complicada debido a la presencia de más de un tipo viral en la misma muestra, por lo que el resultado asignado a estos casos resultó "Positivo VPH No Determinado" (ND). En ocasiones, en los patrones mezclados pudo identificarse uno o ambos de los tipos virales presentes.

Reportes anteriores, varían ampliamente en el porcentaje de prevalencia de las infecciones por VPH en lesiones mamarias, abarcando desde un 4,4 % (32), hasta un 86,2 % (8). Sin embargo, algunos de ellos fallan en la detección de este virus y generan controversia en relación al papel oncogénico del VPH en la patogénesis del carcinoma de mama (33-35). Esta controversia puede ser explicada, de acuerdo al origen de las muestras, p.ej. punción con aguja fina (35), o debido al método utilizado para la detección viral; como es el caso del método de hibridación con sondas tipo específicas para uno o dos tipos de VPH, lo cual puede excluir otros tipos virales infectantes que, por lo tanto, no son detectados en las muestras en estudio.

Estos resultados confirmaron, que el VPH puede tener algún papel en el desarrollo de la malignidad del tejido mamario, y corrobora lo publicado a nivel mundial, indicando que una infección con VPH de alto riesgo hace a un individuo más propenso al desarrollo de lesiones malignas, en este caso, carcinoma mamario. Es decir, aquellas pacientes infectadas con VPH de alto riesgo son más susceptibles a la inmortalización celular, debido a que las oncoproteínas virales E6 y E7, a diferencia de las de bajo riesgo, modulan vías celulares y por lo tanto regulan la proliferación y supervivencia celular. Sólo el 14,63 % de las lesiones benignas se encontraban infectadas con VPH, en su mayoría, con tipos virales de bajo riesgo y aquellas lesiones malignas positivas para VPH de bajo riesgo, presentaban en ocasiones, infección mixta con tipos virales de alto riesgo (Figura 1). Al agrupar las muestras positivas, de acuerdo al riesgo del tipo de VPH, se obtuvo que en 39,5 % se detectó VPH de alto riesgo. Sin embargo, el alto número de muestras sin tipificar (ND=16), no permite una correcta apreciación de este resultado. Se ha reportado que el VPH-18 de alto riesgo, además de presentar tropismo por epitelio mucoso, también tiene tropismo glandular (36). Esto coincide con reportes que relacionan a este tipo de VPH con carcinomas mamarios. El segundo tipo de VPH encontrado con mayor incidencia en el presente estudio fue VPH-18. Esta observación, concuerda con lo mencionado anteriormente y coincide con previos reportes donde el mismo tipo viral fue encontrado con mayor frecuencia en biopsias de carcinoma de mama (36 - 38).

Al evaluar estadísticamente los resultados obtenidos, con la prueba de Chi-cuadrado, se encontró una diferencia altamente significativa, que indicó un

vínculo real entre el desarrollo de carcinoma mamario y la presencia del VPH. Según la razón de las ventajas (OR), la relación entre estas dos variables es de 10,77:1, indicando que es 10,77 veces más probable desarrollar carcinoma si se tiene VPH, a padecer de este mal si el virus no está presente; esto indicó que hay un 91,5 % de probabilidades de desarrollar carcinoma de mamas en presencia de este virus. Así, una posible explicación para la inmortalización de las células de tejido mamario infectado, sería la presencia de las oncoproteínas virales de los VPH de alto riesgo.

Se concluye que en el presente estudio fue posible detectar ADN de VPH en biopsias de tejido mamario. Además, pudo demostrarse que 57,89 % de las muestras de carcinoma de mama presentaban infección por VPH, principalmente del tipo VPH-33 de alto riesgo. Las muestras de CDI presentaron un porcentaje de infección con VPH considerablemente mayor que las muestras de tumores benignos, indicando que posiblemente este virus esté relacionado con la inmortalización de las células mamarias. En algunos casos la carga viral de la muestra se mostró insuficiente para proporcionar un amplificado tipificable, de modo que se realizó la detección de ADN viral con los oligonucleótidos GP5+/GP6+. En estos casos, el diagnóstico final para estas muestras fue “ND”, es decir, VPH positivo, tipo viral no determinado y se recomienda secuenciación de ADN. De acuerdo a la fisiología del VPH y a reportes previos, en este estudio se considera muy probable que este virus inmortalice células de tejido mamario de la misma manera que lo hace en cérvix.

Este trabajo fue financiado con recursos propios del Laboratorio de Biología y Medicina Experimental de la Universidad de Los Andes (LABIOMEX-ULA).

Los autores expresan su agradecimiento al personal técnico y administrativo de LABIOMEX-ULA por su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

## REFERENCIAS

1. Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3): 405-426.
2. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre) [Internet]. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. [15 diciembre de 2016, citado diciembre 2016].

DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN BIOPSIAS DE CARCINOMA DUCTAL INFLTRANTE Y LESIONES BENIGNAS DE MAMA EN MUJERES VENEZOLANAS

- Disponible en: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
- Garland S, Tabrizi S. Methods for HPV detection: Polymerasa Chain Reaction Assay. En: Monsonego J, editor. *Emerging Issues on HPV Infections. From Science to Practice*. París: Karger Publishers; 2006. p 63-72.
  - de León 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; 9: 26-31.
  - Bosch FX, de Sanjosé S, Castellsagué X. Virus del Papiloma Humano: riesgo oncogénico y nuevas oportunidades para la prevención. *An Sist Sanit Navar*. 2001; 24: 7-13.
  - Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16 (1): 1-17.
  - zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009; 384 (2): 260-265.
  - de Villiers EM, 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-R11.
  - Meisels A, Morin C. Morphology of lesions of the uterine cervix related to human papillomavirus (HPV). *Arch Anat Cytol Pathol*. 1997; 45(5): 261-267.
  - Kan C. Human Papillomavirus in human breast cancer and cellular immortalization. [Thesis for the degree of Doctor of Philosophy]. Sydney – Australia: University of New South Wales; 2007.
  - Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Marquez L, Puig J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2008; 68 (1): 25-31.
  - Perry C, Phillips B. Quick Review: Breast Cancer. *IJO*. 2002; 1 (2): [about 5 p] Disponible en: <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/10174>
  - Lawson JS, Glenn WK, Whitaker NJ. Reply: Breast cancer, human papilloma virus and sexual activities. *BJC*. 2008; 98 (2): 510-511.
  - 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; 6 (1): 7-13.
  - Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, et al. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer*. 2000; 7(1): 33-36.
  - Mallia R, Mangion JP, Camenzuli C, Cassar A, Cacciottolo P, Cauchi J, et al. HPV positivity varies with technique and primer set, in formalin-fixed paraffin-embedded benign and malignant breast tissue from Malta. *AJMB*. 2011; 1(3): 183-188.
  - 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. *Breast*. 2007; 16 (2): 172-177.
  - 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 in Indian women. *BMC Cancer*. 2011; 11: 27-36.
  - Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC. 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.
  - Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Moustafa AE. 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.
  - Choi YL, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, et al. Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinoma of Korean women. *Tumour Biol*. 2007; 28(6): 327-332.
  - Khan NA, 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.
  - Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Muller-Holzner E, Marth C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer patients with cervical cancer history. *J Clin Virol*. 2004; 31(4): 292-297.
  - Choi J, Lim H, Kim W, Lee S, Kim S, Kim S, et al. Detection of human papillomavirus DNA from the breast carcinomas and the cervix: Are they correlated? *JCO*. 2009; 27(15S): 1544-1544.
  - Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Anuario de Mortalidad – Gobierno Bolivariano de Venezuela. 2010; <http://www.mpps.gob.ve>.
  - Mirshahabi H, Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mohamad-Hassan Z, Meshkat M. Different DNA extraction methods for paraffin-embedded pathological samples. *Iran J Pathol*. 2007; 2(4): 159-164.

27. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003.
28. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230 (4732):1350-1354.
29. Nobre RJ, de Almeida LP, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol*. 2008; 42 (1): 13–21.
30. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang C, Ho G, Klein R, Burk D. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems *J Clin Microbiol*. 1997; 35 (6): 1304–1310
31. Cruz J, Quintero M, Bastidas M, Quintero W, Hernández H, Duque C, et al. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida en la detección y tipificación del virus de papiloma humano. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2015; 75 (3):172-176.
32. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Moran-Moquel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 114(1): 189-194.
33. Cerdera V, Puizzi M, Soto S, Acosta P, Cerdera A. Virus Papiloma Humano y su relación con cáncer de mama. Informe preliminar. UNNE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2004; M-082.
34. de Cremoux P, Thiouxl 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.
35. Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat*. 1996; 39(2): 197-202.
36. Clifford G, Franceschi S. Members of the human papillomavirus type 18 family (alpha-7 species) share a common association with adenocarcinoma of the cervix. *Int. J. Cancer*. 2008 122 (7): 1684-1685.
37. Gumus M, Yumuk PF, Salepsi 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. *J.Exp Clin Cancer Res*. 2006; 25 (4): 515-521.
38. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2005; 93(8): 946-948

---

*Viene de pág. 224*

## 10 datos sobre la salud de la mujer

6. La cifra de embarazo en adolescentes es alarmante. Según la OMS, 14 millones de adolescentes se convierten en madres anualmente. La proporción es más elevada en países en desarrollo.
7. Ligado al punto anterior, la razón de muerte materna también es elevada. Diariamente, según la OMS, 1600 mujeres y más de 10 000 recién nacidos mueren por complicaciones prevenibles del embarazo y del parto. Al igual que la tasa de embarazo en adolescentes, casi la totalidad de la mortalidad materna (99 %) ocurre en países en desarrollo.
8. Los mosquiteros tratados con insecticida reducen los casos de paludismo en las embarazadas y sus hijos. Esto podría ser una medida importante también para la prevención de otras enfermedades como dengue, chikungunya y zika. Sin embargo, el uso de los mosquiteros está relacionado con pautas de sueño que a veces impiden su uso a las mujeres.
9. En la mayoría de los países la cocina suele ser una ocupación femenina. Cuando cocinan en fuego o en cocinas tradicionales, respiran una mezcla de contaminantes que son causas de 500 mil a más de un millón de muertes anuales por neumopatías obstructivas. Solo 12 % de las muertes en hombres por neumopatías obstructivas, está relacionado con esta causa.

*Continúa en pag. 302.*