



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**"ASOCIACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
MUESTRAS DE CÁNCER DE PENE DE PACIENTES
MEXICANOS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BRENDA EDITH ALATORRE TAVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

TLANEPANTLA, EDO. DE MEX. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
CÁNCER DE PENE	6
VIRUS DE PAPILOMA	11
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

Resumen

La infección con VPH afecta tanto a hombres como a mujeres por lo que de igual manera que con el CaCu, se ha observado que existe una relación del virus con el desarrollo del Cáncer de Pene (CaPe), al cual se le ha considerado como la contraparte del CaCu. Actualmente se considera que la infección con VPH es una de las más comunes, ya que el virus se ha detectado no solo en parejas de mujeres que presentan alguna lesión si no que también ha sido detectada entre hombres la población abierta en un alto porcentaje. Al igual que ocurre en CaCu, se ha observado que dependiendo de la técnica empleada, la distribución geográfica así como la población estudiada pueden variar las frecuencias encontradas de VPH en CaPe. Sin embargo en la mayor parte de los trabajos reportados hasta el momento se ha podido detectar el VPH16 como el más frecuente. De este modo en este trabajo se detectaron y tipificaron secuencias del virus de papiloma humano en muestras de pacientes con cáncer de pene. que fueron negativas a VPH 16 en un primer estudio. Se analizaron 20 muestras de Cáncer de Pene (CaPe) mediante PCR oligonucleótidos generales Gp5+/6+, y secuenciación para su tipificación, comparando la secuencia onbtendida con las ya reportadas en GeneBank Se detectaron secuencias de VPH en el 65% de las muestras (13/20), siendo el VPH 31 el más frecuente. El grado de diferenciación que se presentó la mayor positividad a VPH fue el bien diferenciado, lo que podría atribuirse a que los tipos encontrados en este trabajo resultan ser menos agresivos que el tipo 16. Con estos resultados apoyan la idea de que al menos el 50% de los casos de CaPe pueden ser atribuidos a la infección por VPH.

Introducción

El papel de los virus en el proceso de carcinogénesis parece ser uno de los problemas más interesantes no solo para la oncología sino para la biología en general.¹

El Virus del Papiloma Humano (VPH); es transmitido por vía sexual y es considerado como el factor etiológico más importante para el desarrollo de Cáncer Cérvico-uterino.² Este virus está asociado con una gran variedad de procesos patológicos afectando primariamente la mucosa escamosa.³

Así mismo, el virus también se ha detectado en tejidos de carcinoma de pene (CaPe), por lo que se ha sugerido que de manera similar al carcinoma cervical, el VPH también está involucrado en la etiología del CaPe, el cual es considerado como la contraparte masculina al CaCu.⁴

Del mismo modo se ha demostrado que del 50-60% de hombres cuyas parejas presentaban VPH asociado con neoplasias intraepiteliales presentaban lesiones asociadas al VPH. Además la neoplasia intraepitelial de pene es mucho más común en parejas de mujeres con neoplasia cervicales.⁵

Sin embargo, los VPH que están involucrados en la infección y asociación con la neoplasia en los genitales externos masculinos han sido muy poco estudiados³ debido a la poca presencia de la enfermedad. En Europa y Norteamérica se ha reportado una baja incidencia de esta enfermedad (1 por cada 100 000), mientras que en algunas regiones de Sudamérica, África y Asia, el cáncer de pene es mucho más común, representando del 10-20% de los tumores malignos que se presentan en la población masculina², por lo que resulta obvio que el CaPe presenta una

invariable incidencia geográfica. Así mismo la detección de este virus también depende de la técnica que se utilice.

En México los reportes de la Secretaría de Salud registraron en el año de 1998 una incidencia de CaPe del 1.1%, por lo que resulta ser una enfermedad con una baja incidencia en comparación con el CaCu, el cual representa la primera causa de muerte en mujeres en nuestro país.

En México no existen trabajos acerca del Cáncer de Pene y la relación que existe con el VPH. Solo en el 2002 Lazcano y cols.,⁶ realizaron un trabajo en población abierta para detectar secuencias de VPH en hombres de entre 20 y 50 años encontrando que una gran cantidad de estos presentaban infección por el virus.

Por esto resulta de vital importancia realizar este tipo de estudios para conocer más acerca de la relación que existe entre ambos así como conocer la prevalencia del virus en este tipo de enfermedad y las diferencias que existen en la infección en hombres y mujeres.

Cáncer de Pene

Las alteraciones histológicas observadas en el cérvix también se pueden encontrar en los hombres, siendo descritas como neoplasias intraepiteliales (NIP) *in situ* y carcinoma invasivo de pene.⁷

El CaPe es un tumor epitelial maligno del tipo epidermoide o de células escamosas, que se presenta con mayor frecuencia entre los 40 y los 70 años de edad⁷ Clínicamente las lesiones son indoloras y no sangran hasta que la neoplasia se ulcera e infecta; suele originarse en el glande del pene o en una superficie del prepucio cerca del surco coronal.⁹ Este tumor puede ocultarse bajo un prepucio redundante o fimótico; es decir cuando existe una dificultad para retraer el prepucio sobre el glande produciendo inflamación.

Macroscópicamente se presenta de dos formas, como una masa papilar exofítica o como una lesión ulcerosa.⁸⁻¹⁰ Histológicamente el carcinoma de células escamoso es clasificado usando el sistema Broders para definir el nivel de diferenciación. Las lesiones de bajo grado (grados I a II) constituyen el 50% de los casos reportados¹¹.

Grado	Características histológicas
I	Células bien diferenciadas con queratinización. Puentes intercelulares prominentes Perlas de keratina
II-III	Atíпия nuclear Incremento de la actividad mitótica Pocas perlas de keratina Pleomorfismo nuclear marcado
IV	Numerosas mitosis Necrosis Invasión linfática y perineural No hay perlas de keratina Invasión profunda

Tabla 1. Clasificación de CaPe según el sistema Broders.



Figura 1. Imagen de Carcinoma de pene encontrándose todo el cuerpo del pene comprometido.

Cubilla y col. dividieron al CaPe en carcinoma escamosa superficialmente extendido, carcinoma vertical, carcinoma verrucoso y carcinoma multicéntrico.¹⁰

El carcinoma de expansión superficial es el más frecuente y tiene un patrón de crecimiento radial, puede extenderse a la mucosa del glande, el prepucio y surco coronal y la uretra, es infiltrativo y poco o moderadamente diferenciado.¹¹

El carcinoma vertical presenta una gran tendencia a metástasis a nodos linfáticos, son lesiones fungantes y ulceradas, invade profundamente el cuerpo cavernoso, son tumores moderadamente o poco diferenciados.

El carcinoma de tipo verrucoso se presenta como una masa vegetante en el glande y microscópicamente se encuentra extremadamente diferenciado. Se considera que el condiloma acuminado gigante es un carcinoma de este tipo⁹ el cual se encuentra relacionado etiológicamente con infección de VPH tipos 6 y 11; ya que se han encontrado en el 85% de estos ¹².

El carcinoma multicéntrico representa hasta el 5% de los casos, se presentan dos o más focos de carcinoma separados por tejido benigno, afectando más de un compartimiento epitelial, generalmente son de expansión superficial.

El CaPe también se puede clasificar de acuerdo a su histología en 6 tipos.

Carcinoma típico: se encuentran bien o moderadamente diferenciados, se encuentran nidos de células irregulares con citoplasma eosinófilo.

Carcinoma basaloide: abarca cerca del 10% de todos los casos, es de invasión profunda, con nidos de pequeñas células poco diferenciadas. Tienen una alta frecuencia de recurrencia y metástasis a ganglios linfáticos y mal pronóstico.

Carcinoma condilomatoso: son lesiones de crecimiento lento generalmente en el glande; forman largas papilas y presenta células coilocíticas características de infección por VPH.

Carcinoma verrugoso: se encuentran muy bien diferenciados exofíticos y papilares se presentan en el glande y a veces en el prepucio o surco coronal, son de crecimiento lento.

Carcinoma papilar: carcinomas exofíticos con papilas revestidas por células atípicas sin cambios coilocíticos, son bien o moderadamente diferenciados y se presentan zonas irregulares amplias de queratinización entre las papilas.

Carcinoma sarcomatoide: son muy poco comunes, agresivos y compuestos predominantemente por células fusiformes y a veces células gigantes.

El Cáncer de Pene ha sido relacionado con diferentes factores como son la falta de circuncisión, la fimosis o la falta de higiene. La falta de circuncisión se ha asociado con el desarrollo de la enfermedad ya que ésta casi no se presenta en varones que han sido sometidos a la circuncisión desde el nacimiento. No obstante la falta de circuncisión no ayuda al desarrollo de la enfermedad sino que

otros factores tales como socioeconómicos y genéticos así como una higiene adecuada son determinantes, ya que es concebible asociar la práctica de la circuncisión con hombres que tienen un nivel de vida más alto, por lo tanto cuentan con una mejor alimentación así como con mayor acceso a los servicios de salud. Así, las clases sociales se han descrito con un marcador de riesgo para ciertos tipos de cáncer en diferentes ciudades.¹³

Por otra parte la protección que puede conferir la circuncisión se ha atribuido en forma tradicional a su eficacia para evitar la acumulación de carcinógenos no identificados que contiene al esmegma¹⁴, (acumulación de células epiteliales descamadas y sudor). La fimosis (que es la dificultad de retraer el prepucio sobre el glande) es otro factor que se ha relacionado con el CaPe esto debido a que, puede darse una acumulación de esmegma, aunado a que el tumor puede ocultarse bajo esta condición de fimosis favoreciendo así el desarrollo de la enfermedad.¹⁵

Por último al CaPe también se le ha asociado con la infección con el Virus del Papiloma Humano, especialmente con el tipo 16,³⁻⁴ al igual que ocurre con el cáncer cérvico-uterino.

Virus del Papiloma Humano

La familia de los papiloma virus emerge como la más compleja familia de virus patógenos para el hombre, la información genética del HPV está en forma de una doble cadena de ADN circular envuelta en una cubierta cápside, su genoma consta 8000 pb aproximadamente.¹

Toda la información codificante del virus se encuentra en una sola hebra, la cual la constituyen nueve marcos de lectura abierta, dos de ellos L1 y L2, (del inglés *late*) contiene aproximadamente 2500 pb y codifican para las proteínas de la estructura viral.

Otros siete marcos de lectura abierta, llamados *early*, de aproximadamente 4500 pb, están implicados en el control y reproducción viral y la manifestación del potencial patógeno.¹ Las 1000 pb restantes están dentro de una región llamada LCR (región larga de control), la cual está localizada río arriba de los genes E6 y E7, esta contiene el origen viral de la replicación y los elementos de control para la transcripción y la replicación, la transcripción ocurre en una sola dirección.²

La transcripción y la replicación están ligadas al estado de diferenciación de la célula infectada.² El resultado de los eventos infecciosos depende principalmente de tres factores: 1) la multiplicidad de la infección, 2) la interacción con carcinógenos químicos o físicos, 3) la respuesta inmune.³

La proteína E2 funciona como represor de E6 y E7 debido a su localización cercana a la región de control; por el contrario la falta de expresión de E2 se

relaciona con la expresión de E6 y E7 y su integración al genoma de la célula.⁴ Para integrarse al ADN de la célula hospedera, debe ocurrir un rompimiento en el genoma viral. Esta separación no ocurre al azar, muchos rompimientos son encontrados en la región E1/E2 del virus. El resultado de este rompimiento aparece como una pérdida de la función de esos dos genes y una desregulación de los genes E6/E7, resultando en la transformación celular.²

El producto del gen p53 (gen supresor de tumor) es uno de los principales blancos de este gen E6 forma un complejo con p53 bloqueando su función normal y promoviendo así su degradación.

La mayor función de E7 es la desregulación de la maquinaria del ciclo celular por la inducción de la fase de transición de G₀ a S. Esto acompañado por la activación de varios genes celulares por E7 y por la interacción directa de E7 con proteínas reguladoras del ciclo celular; como pRb⁷

Antecedentes

Han sido varios los métodos utilizados para detectar la presencia del virus en carcinoma de pene: por métodos histológicos y por métodos moleculares. En estos trabajos se ha encontrado que si existe una asociación del virus a este tipo de neoplasia. Los métodos histológicos eran los más usados antes del surgimiento de las técnicas moleculares. Sin embargo, actualmente se siguen utilizando en combinación con técnicas moleculares. Consisten principalmente en la observación de células colócíticas; características de la infección por VPH.

En cuanto a las técnicas moleculares estos resultan ser mucho más sensibles. Puede realizarse la detección de proteínas virales mediante el uso de anticuerpos específicos del virus, detección de ADN viral mediante hibridaciones y mediante la amplificación de secuencias virales con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En 1984 Levine y cols., realizaron colposcopías y biopsias de pene en 34 hombres cuyas parejas sexuales presentaban condiloma y NIC. Encontraron lesiones externas en el 53% de los examinados por colposcopia, recalando la importancia de un examen clínico profundo para la detección de lesiones que posiblemente podrían asociarse a VPH¹⁶.

Por su parte Sand, en 1986 utilizó la misma técnica para estudiar a 90 hombres cuyas parejas presentaban condiloma. El 88.2% presentó evidencias histológicas de condiloma de pene después de la revisión completa, en comparación a 8 que presentaban lesiones a simple vista¹⁷

Ya en 1987, Krebs y Schneider, estudiaron mediante colposcopia, citología e histología, a 127 hombres cuyas parejas presentaban NIC de diferentes grados. De estos el 65% presentaban lesiones asociadas a VPH. Sin embargo las lesiones en cada uno de los sujetos y en su respectiva pareja diferían clínica e histológicamente en muchos de los casos. Estas diferencias podrían ser debido a infecciones con diferentes tipos de VPH.¹⁸

El hecho de que se considere al virus como un agente transmitido sexualmente, también se ha apoyado en estudios de este tipo. En 1995 Maymon y cols., estudiaron 63 hombres parejas de mujeres con infección de VPH o lesiones asociadas a este. Ambos pertenecían a poblaciones judías, donde es común la práctica de la circuncisión al momento de nacer. Maymon solo encontró en el 24% de los sujetos estudiados, evidencia histológica de condiloma, sin presentarse casos de lesiones malignas o premalignas. Una explicación que dan es el posible efecto protector de la circuncisión, la posible presencia de otros tipos virales en la población judía y ciertos factores socioeconómicos que podrían limitar la diseminación de enfermedades de transmisión sexual.¹⁹

Respecto a estudios con técnicas moleculares, en 1986 McCance y cols., estudiaron 53 carcinomas de pene en Brasil, en una comunidad con alta incidencia de CaPe, detectando el VPH 16 en el 49% de los casos y el VPH 18 en el 9% utilizando Southern Blot. Ellos sugieren una posible subdetección debido a la pequeña

cantidad de tejido examinado, y proponen al VPH como importante en la etiología del CaPe.²⁰

Una dificultad que surge en los estudios de VPH en pene es la dificultad de obtener muestras de pacientes aparentemente sanos. Una fuente de estas muestras son las circuncisiones de hombres adultos sin lesión neoplásica. Varma y col.²¹ en 1991, estudiaron dos series de muestras en parafina, una de 23 casos de neoplasias escamosas de pene, y otra de 20 controles, utilizando prepucios de circuncisiones por fimosis o postitis en adultos, sin ninguna lesión aparente. Realizaron PCR con oligonucleótidos específicos para VPH 16 y 6/11. Detectaron VPH 16 en el 65%, VPH 31/33/35 en 13% y VPH 6/11 en 9% de los casos de CCE, siendo todos controles negativos para VPH. Esto les sugiere que el CaPe está relacionado con el VPH de transmisión sexual.

Así también, Scinicariello²² y Sarkar³ en 1992, determinaron la asociación del VPH con carcinoma de pene, por medio de hibridación *in situ* y PCR. Concluyendo que el tipo 16 era el más frecuente en neoplasias intraepiteliales y en muchos carcinomas invasivos había secuencias del genoma del tipo 16; así mismo el ADN de este tipo se encontraba integrado al ADN de la célula hospedero, asociándolo como un factor etiológico en el desarrollo de la neoplasia.

Iwasawa y cols.,⁴ (1993), investigaron la frecuencia de VPH tipo 16, 18 y 33 por PCR y la localización de ADN de HPV por hibridación *in situ* usando especímenes de tejido en parafina de carcinoma de pene. Obteniendo que el tipo 16 era el más

comúnmente asociado a este tipo de lesiones, y que el ADN del virus se encontraba en el núcleo de las células.

Uganda es una de las regiones del mundo con alta incidencia de CaPe y CaCu. En 1992 Tornesello y cols, estudiaron 13 biopsias de pacientes de varias regiones de Uganda para determinar la presencia de ADN de VPH, de los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33. Ellos utilizaron la técnica de Southern Blot y por PCR en base a secuencias virales altamente conservadas. Encontraron secuencias virales en todas las muestras. Por Dot Blot encontraron VPH 16 en 31% y por PCR este mismo en 62%. Los datos sugieren un posible papel del VPH en CaPe en esta región.²³

En base a estudios morfológicos y Southern blot, Aynaud y col²⁴ (1994), evaluaron la existencia de características morfológicas específicas para la Neoplasia Intraepitelial en Pene (NIP), en parejas de mujeres con condilomas o neoplasia intraepiteliales. El ADN del virus fue detectado en 75% de los pacientes con PIN grado I, en 93% de pacientes con grado II y en todos los pacientes con grado III.

Por su parte Cupp y cols., en 1995, en EUA, obtienen muestras en parafina de CaPe, carcinoma in situ y NIP y prepucios de circuncisiones en adultos. Realizan PCR con oligonucleótidos específicos para VPH 16 y 18, así como con oligonucleótidos generales para L1; encuentran VPH en 55% de los casos de CaPe, en 92% de los carcinoma in situ, en 92% de las NIP y en 9% de las circuncisiones en adultos. Siendo VPH 16 el más frecuente con 40% en CaPe, 84% en carcinoma in situ y 75% en NIP. Concluyen que a la diferencia significativa de infección con VPH

entre los tejidos sanos y los neoplásicos, se sostiene un papel etiológico para el VPH.²⁵

Levi y col.²⁶ (1998), evaluaron la presencia de VPH en muestras de carcinoma de pene, así como la presencia de mutaciones en p53. En su trabajo reportan prevalencia de VPH tipo 16 en el 53% de las muestras analizadas, así como mutaciones puntuales en varios exones de p53, mostrando que los VPH de alto riesgo y p53 mutado pueden coexistir en esos tumores.

Un subtipo poco común es el carcinoma de células escamosas basaloides. Cubilla y cols., en 1998 analizaron 20 casos de CaPe con esta histología. Utilizaron PCR para buscar ADN de VPH en 11 de los casos y encontraron VPH 16 en 9 de ellos. Los autores plantean que este tipo de neoplasia que suele tener un mal pronóstico se encuentra más frecuentemente asociada con VPH.²⁷

Uno de los pocos estudios comparados que existen es el realizado por Castellsague y cols., en Colombia y España. El primero es un país con alta incidencia de CaCu, en tanto que el segundo presenta baja incidencia de la neoplasia. Analizaron la prevalencia de ADN de VPH en pene en esposos de mujeres con y sin neoplasias cervicales, utilizando un kit comercial (Virapap) y PCR con oligonucleótidos generales para L1. El estudio mostró que hay 8 veces más incidencia de cáncer cérvico-uterino en Colombia que en España, así como mayor frecuencia de infección por VPH en pene en este país latinoamericano. Las diferencias entre la frecuencia de VPH en esposos de mujeres sanas y mujeres con CaCu no fue significativa en

Colombia, pero si en España. Además encontraron que la promiscuidad sexual es el factor de riesgo más importante para las infecciones en pene con VPH.²⁸

Otro estudio de este tipo es el realizado por Bleeker y cols., en 2002. Ellos identificaron la presencia de lesiones en el pene y VPH en raspados de hombres cuya pareja presentaba una lesión cervical. En este estudio participaron 175 hombres analizados mediante penoscopia para identificar VPH. En el 68% de los hombres se observaron lesiones. Más de un tipo de lesión (planas, pápulas o condilomas) fue diagnosticada en el 15% de los sujetos. El VPH fue detectado en 59% de los raspados de pene, conteniendo principalmente VPH oncogénicos. Cuando las lesiones eran visibles se detectó 67% de VPH mientras un 37% fue en muestras donde no se veían las lesiones a simple vista. Ellos concluyen que las lesiones en el pene son muy frecuentes en parejas sexuales de mujeres con lesiones cervicales, y que muchas de estas lesiones son subclínicas y están frecuentemente asociadas con la presencia de VPH de alto riesgo, indicando que estos hombres pueden constituir un reservorio para este tipo de virus.²⁹

En 2001 Bezerra y cols., analizaron las características clínicopatológicas y el estado del ADN viral en 60 carcinomas escamosos de pene y 11 carcinomas verrugosos. No se encontraron diferencias significativas en edad y etapa clínica entre los dos grupos de tumores. Ningún paciente de carcinoma verrugoso murió de la enfermedad comparado con 19 de 60, en el grupo de carcinoma escamoso. En cuanto al ADN viral, este se encontró más asociado con carcinoma verrugoso

(45.5%) que con el escamoso (26.7%). Los resultados sugieren que el carcinoma verrugoso es menos agresivo y confiere un mejor pronóstico que el carcinoma típico escamoso del pene.³⁰

Todos estos estudios indican que el VPH más frecuente en CaPe resulta ser el VPH 16, por lo que este puede tener un papel potencial en la neoplasia. Sin embargo, también se ha visto que el virus presenta una alta incidencia geográfica.

En este mismo contexto Villa y cols., en 1986 detectaron la presencia de VPH en CaPe. Se estudiaron 18 carcinomas escamosos provenientes de pacientes de Brasil, mediante Southern Blot. Encontraron en 44% de las muestras presencia viral, (8/18), y 7 de estas muestras presentaban VPH tipo 18. En este estudio no se encontraron secuencias virales del tipo 16. Ellos concluyen que la ausencia de VPH 16 podría indicar alguna asociación geográfica o al tamaño de la muestra en este estudio.³¹

Por último, en el año 2000 Picconi y su equipo investigaron las relaciones entre el VPH y el cáncer de pene en Argentina por medio de PCR combinada con estudios de *Single Strand Conformational Polymorphisms* (SSCP). Encontrando al tipo 18 como el más frecuente. Sugiriendo un potencial papel viral a la progresión del tumor⁷.

Esto último resulta interesante, ya que los datos muestran que en muchas ciudades el tipo 16 es más predominante, sin embargo, en Sudamérica ha encontrado que el más frecuente es el tipo 18. Tales contrastes pueden ser atribuidos a la diferencias en la distribución geográfica del VPH. Es por esto que es de gran importancia

evaluar la prevalencia de este tipo de virus en países latinoamericanos como el nuestro y conocer las relaciones de este, con el CaPe, así como las diferencias con otras ciudades del mundo.

Justificación

En nuestro país existe una gran incidencia de CaCu, y representa la primer causa de muerte por neoplasia entre la población femenina. Debido a que el principal agente etiológico de esta enfermedad es el VPH, se puede suponer que una gran cantidad de hombres se encuentra infectada con este virus ya que se trata de un virus de transmisión sexual. Así mismo, también se ha visto la asociación de este virus con el cáncer de pene, sin embargo, la incidencia de esta neoplasia es muy baja. No obstante se pueden presentar lesiones premalignas en el pene, sin que éstas sean detectadas, por lo que podrían representar una población de alto riesgo.

Así, resulta de gran importancia realizar estudios sobre el virus y su relación con el CaPe. Se ha visto que el porcentaje de detección del virus en estos estudios es variable, lo cual podría deberse a una subdetección, ya que la mayoría de estos estudios están proyectados para la detección de los tipos 16,18 o 6/11 por lo que al ampliar el rango y la sensibilidad del método utilizado para la detección de otros tipos virales aumentaría el porcentaje de muestras positivas, sobre todo en regiones como la nuestra en donde se ha visto que otros tipos virales diferentes al 16 o 18 tienen una fuerte incidencia en CaCu, lo cual podría estar ocurriendo del mismo modo en CaPe. En el presente trabajo se utilizaron muestras que fueron evaluadas previamente para detectar la presencia viral mediante PCR con oligonucleótidos específicos para el tipo 16³². En este estudio preliminar se detectaron secuencias del VPH16 en el 65% de las muestras (37/57). De esta manera las muestras que resultaron negativas fueron sujetas a un nuevo análisis para determinar la presencia de otros tipos de VPH diferentes al tipo 16; mediante oligonucleótidos generales.

Hipótesis

Dado que el VPH es un agente de transmisión sexual se espera encontrar frecuencias virales similares a lo reportado para cáncer cérvico-uterino.

OBJETIVOS

General

Detectar la presencia de secuencias de Virus de Papiloma Humano en muestras de cáncer de pene.

Particulares

Detectar la presencia viral por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos generales para el gen L1 viral en muestras negativas para.

Determinar el tipo viral presente, mediante secuenciación automatizada, y la utilización del programa BLAST.

Material y Métodos

Obtención de las muestras

Se utilizaron 20 tejidos de cáncer de pene incluidos en parafina VPH 16 negativas, obtenidos del registro histopatológico del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI; que comprenden del período de 1988 al 2002. De cada muestra se hizo un corte de 5µm para teñirlo con Hematoxilina y Eosina con la finalidad de obtener el diagnóstico, y señalar el área del tumor de donde se obtendría el ADN.

Extracción del ADN

Mediante una aguja de extracción de médula ósea se obtuvo un cilindro del tumor de 2mm de diámetro que se colocó en un tubo de 1.5 µl con 150 µl de xilol y fueron incubados durante 20 minutos a 56°C o hasta que se eliminara la parafina, se centrifugaron y decantaron, y finalmente se dejaron secar. Las muestras fueron digeridas con 150µl de solución de lisis nuclear y 4µl de proteínasa K (1mg/ml) durante 24 horas. Posteriormente se les agregó 3µl de RNAsa (10µg/ml), y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Después de esto, las proteínas fueron removidas por una solución de precipitación de sales, la cual precipita las proteínas dejando el ADN genómico de alto peso molecular en solución. Finalmente el ADN fue concentrado y lavado mediante precipitación por isopropanol y se resuspendió en 50 µl de agua destilada. La aguja fue limpiada y esterilizada mediante calor después de cada extracción.

DetECCIÓN DEL ADN DE VPH

La amplificación del ADN se realizó mediante la utilización de los oligonucleótidos Gp5+ y Gp6+³³, los cuales reconocen una gran cantidad de tipos virales (11, 16, 18, 30,31, 33, 35, 39, 40, 43, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 66 etc.); y amplifican un fragmento de 150 pb de la región L1 del virus (**Tabla 2**). Como templado se utilizaron 200ng de ADN. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50µl que contenía MgCl₂ 3.5 Mm, buffer de PCR 10x, 10mM de cada dNTP, 50 pmoles de oligonucleotido y 1U de Taq polimerasa (Promega). El ADN fue desnaturalizado a 94° durante 4 minutos y la reacción se llevó a cabo en 40 ciclos, cada ciclo incluyó 1 minuto de desnaturalización a 94°, la alineación a 40° durante 2 minutos, y finalmente la extensión a 72° durante 1.5 minutos. Como control positivo se utilizó ADN de papiloma laríngeo. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio en el equipo EagleEye 2 Strategene.

Primer	Tamaño	Secuencia	Posición	Fragmento
GP5+	23 pb	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'	6624-6646	150 pb
GP6+	25 pb	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	6719-6746	

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados. La posición esta dada en base al VPH16.

Secuenciación

Los productos obtenidos fueron purificados con el kit Wizard Gel Clean (Promega), el cual consta de unas columnas con una membrana de silica que no permite pasar dejando libres los productos de cualquier residuo de sales u oligonucleótidos, así como nucleótidos no incorporados, dejando solamente el producto de PCR.

Posteriormente estos fueron cuantificados en un gel de agarosa al 2% mediante el sistema Low Mass (Fermentas). Se realizó el marcaje de los mismos mediante una reacción de PCR con los oligonucleótidos GP5+ o Gp6+ para los fragmentos del gen L1, con el kit BigDye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µl que contenía 2.5µl de Terminador Ready Mix, 3 ng del producto, 3.2pmol del oligonucleótido utilizado y agua. La reacción de marcaje se llevó a cabo durante 25 ciclos. Cada ciclo consistió de desnaturalización a 96° por 1 minuto, 95° 30 segundos, alineamiento del oligonucleótido a 55° 10 segundos, elongación 60° por 4 minutos y por último 1 ciclo de extensión a 72° por 1 minuto. Posteriormente las muestras fueron purificadas con el kit DyeEx (Quiagen) y liofilizadas. La secuenciación se realizó el secuenciador automático de Applied Biosystems 373. Una vez obtenidas las secuencias se compararon con las reportadas anteriormente en GeneBank mediante el programa BLAST para determinar de qué tipo de VPH se trataba.³⁴

Resultados

Con la finalidad de detectar presencia de VPH en muestras de CaPe, se llevaron a cabo experimentos de PCR y secuenciación. Así mismo, se recolectaron datos clínicos e histopatológicos de las muestras. Las muestras estudiadas fueron evaluadas anteriormente con oligonucleótidos específicos para el VPH tipo 16 resultando negativas. Por esta razón, se decidió analizarlas con un nuevo juego de oligonucleótidos, Gp5+ y Gp6+, que generan un amplificado de 150 pb, los cuales detectan una gran cantidad de tipos virales (11, 16, 18, 30,31, 33, 35, 39, 40, 43, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 66 etc.)³³.

Presencia de tipos Virales

Se procesaron un total de 20 muestras de las cuales el 65% (13/20) resultaron positivas para VPH. (Fig. 2). Posteriormente los productos de PCR fueron purificadas y marcadas para su secuenciación y así determinar el tipo viral presente, comparando la secuencia obtenida con las ya reportadas en el GeneBank mediante la utilización del programa BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Figuras 3-5)

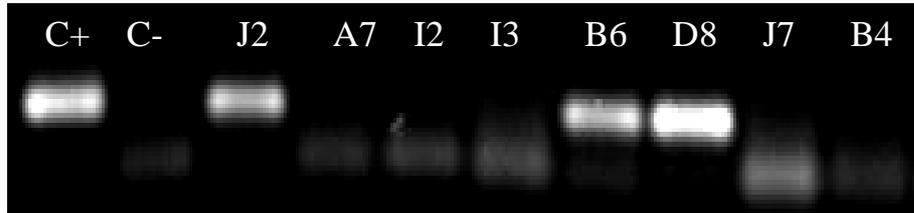


Figura 2. Amplificaciones del de Virus de Papiloma Humano en muestras de Cáncer de Pene en parafina, obtenidas con los oligonucleótidos Gps (150 pb).

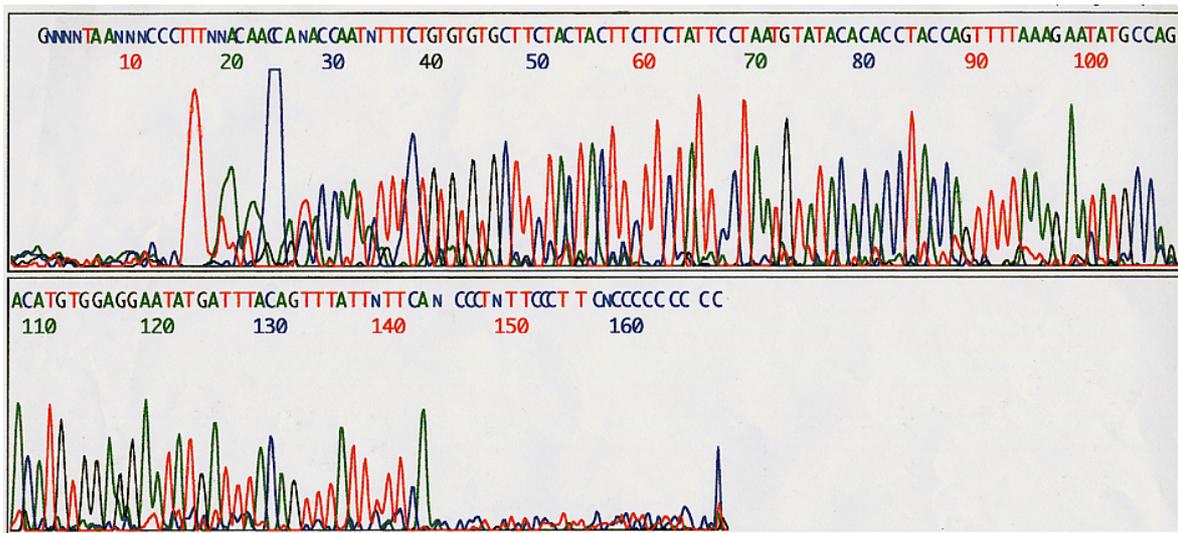


Figura 3. Electroferograma de la secuencia de un fragmento del gen L1 de VPH 59.

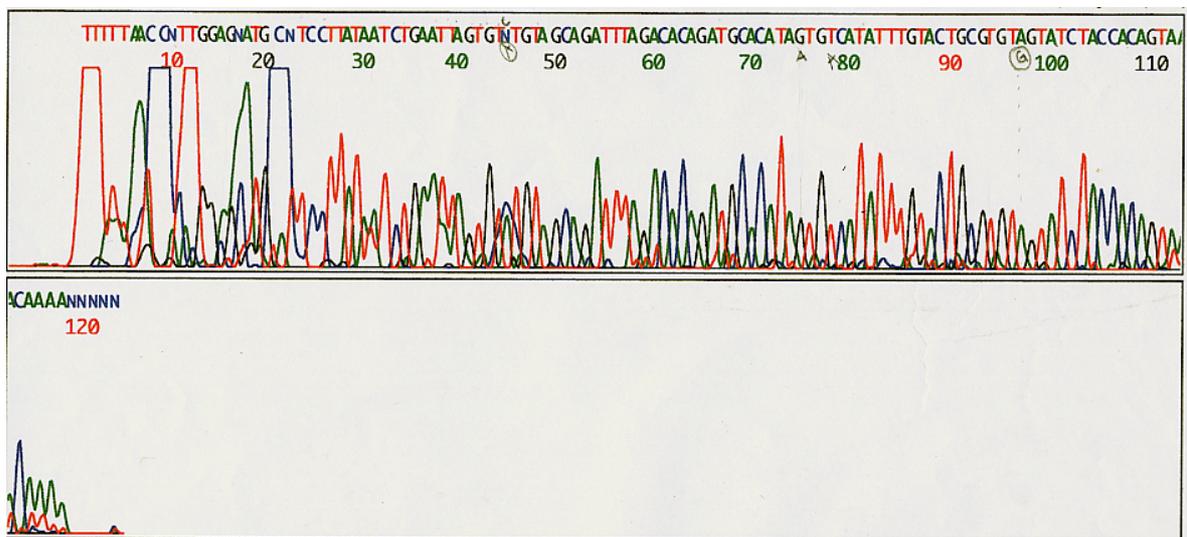


Figura 4. Electroferograma de la secuencia de un fragmento del gen L1 de VPH 11.

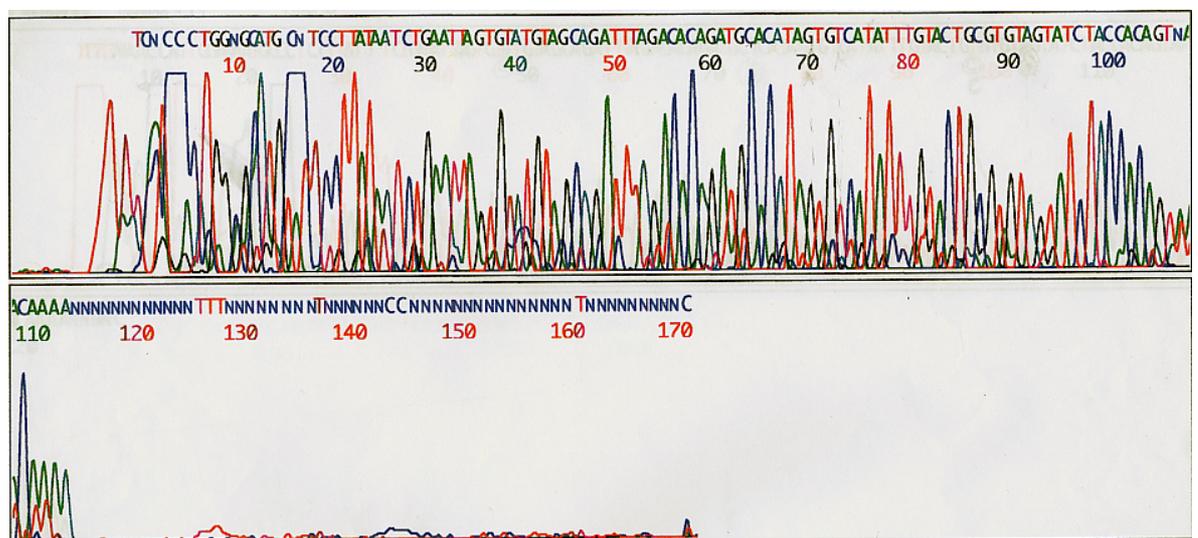


Figura 5. Electroferograma de la secuencia de un fragmento del gen L1 de VPH 16.

Tal como sucede en CaCu diferentes tipos virales fueron detectados. El VPH tipo 31, así como el tipo 11 fueron los más frecuentes (4/13, 30%) detectados en las muestras. Interesantemente, se detectó la presencia de VPH 16 en 2 de 13 muestras (15%). Por último, también se detectaron los tipos 59,18 y 33 (1/13, 7% cada uno).

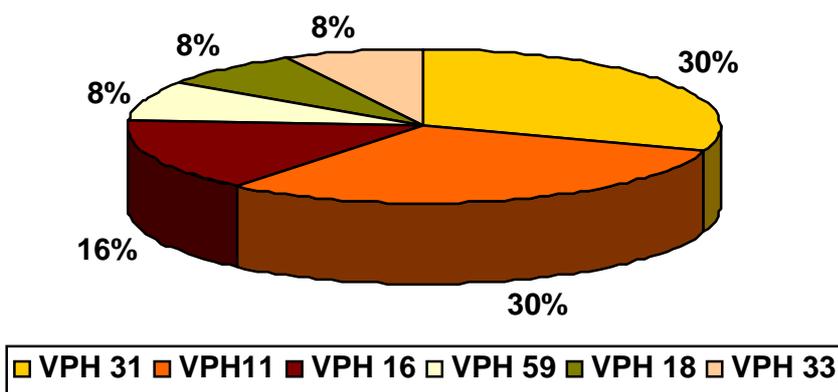


Figura 6. Tipos de VPH detectados en muestras de Cáncer de Pene VPH 16 negativas, incluidas en parafina.

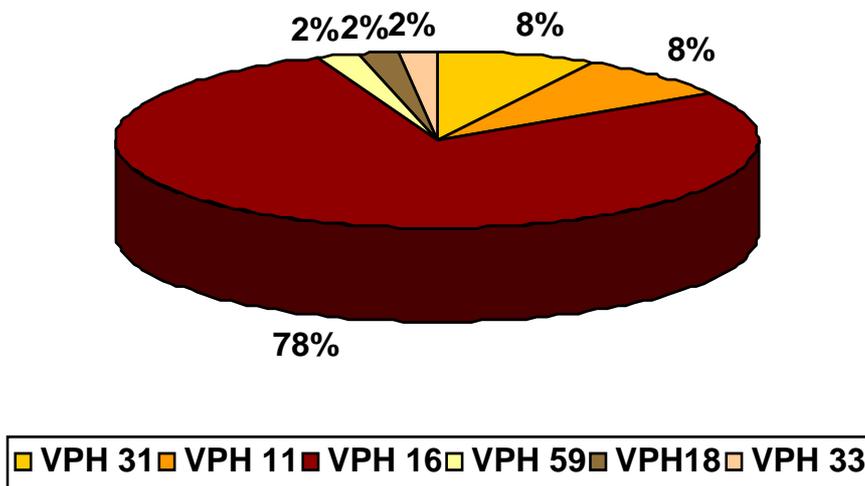


Figura 7. Total de tipos de VPH detectados en muestras de Cáncer de Pene incluidas en parafina³⁷.

Datos Clínicos e histopatológicos

La edad de los pacientes fluctuó entre los 37 y 94 años de edad, siendo la media de 63.3 años. De todos los pacientes, solo 2 eran menores de 40 años (10%). El 40% se encontraban entre los 41 y 60 años (8/20), y por último el 50% eran mayores de 61 años (10/20). Así mismo, el 90% de los pacientes no presentaban la circuncisión, y para el resto de los casos no se contó con esta información.

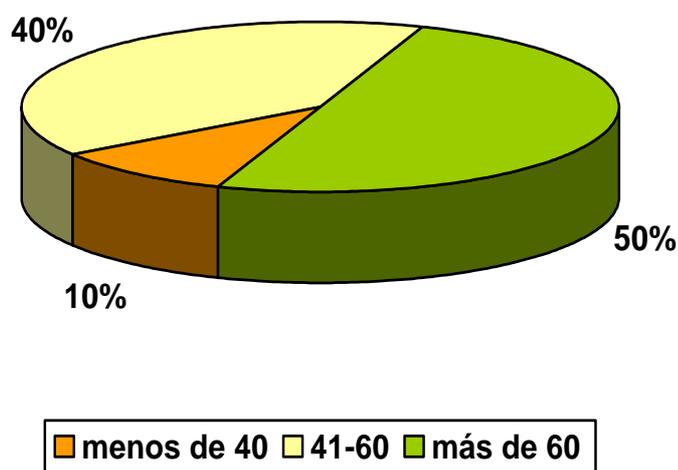


Figura 8. Edades de los pacientes con CaPe (n=20)

Un dato importante resulta ser el número de parejas sexuales, sin embargo, fue la variable para la que se obtuvo menor información. Dos pacientes reportaron haber tenido 4 parejas sexuales (10%), 3 reportaron que habían tenido 3 parejas sexuales (15%), y un paciente dijo haber tenido de 3 a 6 parejas (5%). Para el resto de los casos (70%), no se contó con esta información.

En cuanto a los datos histopatológicos se pudo observar que el 65% de los casos (13/20) correspondían al subtipo histológico típico, el 15 % (3/20) fueron mixtos, el 10% (2/20) fueron papilares y también se presentaron un caso verrugoso y 1 condilomatoso (5% cada uno).

El tipo de crecimiento que se presentó con mayor frecuencia fue el vertical, representando el 80% (16/20) de los casos, así mismo, se presentaron 2 casos de crecimiento mixto (10%), 1 caso de crecimiento verruciforme, y uno de diseminación superficial (5% cada uno).

En cuanto al grado de diferenciación el 65% (13/20) de los casos fueron moderadamente diferenciados, el 25% (5/20) fueron bien diferenciados y el 10% (2/20) fueron poco diferenciados. Por último, el 55% (11/20) de las muestras presentaban lesiones morfológicas asociadas a la infección por VPH, en tanto que 5% (1/20) mostraban una morfología que sugería la infección y un 40% (8/20) no presentaban este tipo de lesiones.

Datos moleculares y variables histopatológicas

Como ya se mencionó el carcinoma típico fue el más frecuente presente en las muestras, sin embargo, los tipos condilomatoso y verrugoso fueron los que presentaron la más alta positividad a VPH (Tabla 3). Así mismo, el carcinoma de crecimiento vertical solo se pudo detectar presencia viral en el 50% de los casos, mientras que para los otros tipos de crecimiento se logró la amplificación del ADN viral en todos los casos presentados (Tabla 4). De igual forma todos los casos de

carcinoma bien diferenciado presentaron secuencias virales (Tabla 5). En cuanto a la morfología citológica, la referida como positiva a VPH fue la que presento el mayor número de casos positivos asociada a infección por VPH (Tabla 6).

Tipo histológico	n	VPH + (%)	VPH16 (%)	VPH18 (%)	VPH31 (%)	VPH33 (%)	VPH59 (%)	VPH11 (%)
Típico	13	8 (61.5)	2 (25)	1 (12.5)	3 (37.5)	1 (12.5)	0	1 (12.5)
Mixto	3	2 (66.6)	0	0	0	0	0	2 (100)
Papilar	2	1 (50)	0	0	1 (100)	0	0	0
Condilomatoso	1	1 (100)	0	0	0	0	0	1 (100)
Verrugoso	1	1 (100)	0	0	0	0	1	0

Tabla 3. Tipos de VPH identificados en muestras de CaPe y su correspondiente subtipo histológico.

Tipo de Crecimiento	n	VPH+ (%)	VPH16(%)	VPH18(%)	VPH31(%)	VPH33(%)	VPH11 (%)	VPH59(%)
Vertical	16	9(56.2)	2 (22.2)	0	4 (44.4)	1 (11.1)	2 (22.2)	0
verruciforme	1	1 (100)	0	0	0	0	1 (100)	0
Dis. Superficial	1	1 (100)	0	1 (100)	0	0	0	0
Mixto	2	2 (100)	0	0	0	0	1 (50)	1 (50)

Tabla 4. Tipos de crecimiento de CaPe y su correspondiente tipo de VPH.

Grado de Diferenciación	N	VPH+	VPH16(%)	VPH18(%)	VPH31(%)	VPH33(%)	VPH59(%)	VPH11(%)
Moderadamente diferenciado	13	7 (53.8)	1 (14.2)	0	3 (42.8)	1 (14.2)	0	2 (28.5)
Bien diferenciado	5	5 (100)	0	1 (20)	1(20)	0	1(20)	2 (40)
Poco diferenciado	2	1 (50)	1(100)	0	0	0	0	0

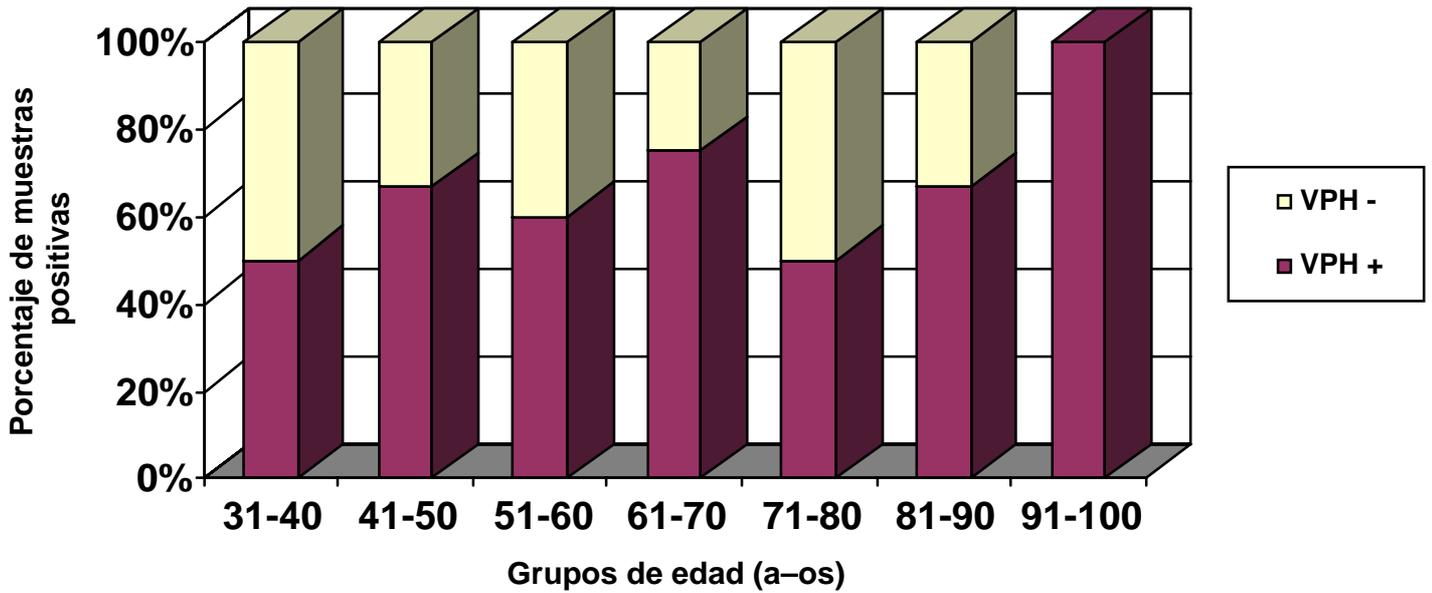
Tabla 5. Grados de diferenciación en CaPe y su correspondiente tipo de VPH.

Morfología	n	VPH+ (%)	VPH16(%)	VPH18(%)	VPH31(%)	VPH33(%)	VPH59(%)	VPH11(%)
VPH positivo	12	10 (83.3)	2 (22.2)	1 (11.1)	2 (201)	1 (11.1)	0	4 (44.4)
VPH negativo	8	3 (37.5)	0	0	2 (66.6)	0	1 (33.3)	0

Tabla 6. Detección morfológica de infección por VPH y su correspondiente tipo de VPH.

Por otra parte, se puede ver que el mayor porcentaje de muestras positivas se encuentra entre los grupos de edad más jóvenes (Figura 5).

Figura 5. Porcentaje de muestras positivas para de VPH en los diferentes grupos de edad de los pacientes con CaPe.



Discusión

En este trabajo se analizaron muestras de cáncer de pene con la finalidad de detectar secuencias génicas del Virus de Papiloma Humano, mediante PCR y secuenciación. Las muestras que aquí se utilizaron anteriormente habían sido evaluadas para determinar si existía presencia viral, pero solo del VPH tipo 16, dejando de lado a las muestras que presentaran un tipo viral distinto a 16. Por esta razón fue que se decidió realizar las muestras que resultaron negativas en ese primer análisis. Se utilizaron oligonucleótidos generales que reconocen una gran cantidad de tipos virales, y así tener un espectro de detección más amplio.

De este modo se decidió utilizar a los oligonucleótidos Gp5+ y Gp6+, los cuales reconocen un fragmento del gen L1 de una gran cantidad de tipos virales y se obtienen un producto de 150 pb. Al obtener productos pequeños como este, se pueden evitar problemas en la amplificación, debido a la pobre calidad del ADN, ya que se trata de muestras incluidas en parafina. Así mismo, al tratarse de un fragmento pequeño se puede evitar el problema de la subdetección de VPH debido a la degradación del ADN. De igual forma se ha planteado que la integración del ADN viral dentro del genoma de la célula puede resultar en la ruptura o pérdida del gen L1, por lo que el amplificado tampoco se ve afectado debida a esta fragmentación o pérdida de ADN durante la integración viral.

El porcentaje de muestras que contenían secuencias virales en este estudio fue de 65%. Este resultado es similar a lo reportado por otros autores^{4, 20,25}. Sin embargo, debe considerarse que en este trabajo solo se tomaron en cuenta las muestras

que resultaron negativas para VPH16, por lo que al considerar el total de las muestras positivas para VPH, el porcentaje aumentaría³².

En cuanto a la edad, la media encontrada en los pacientes con CaPe, no difiere a la encontrada en otros países^{25-26, 35} Sin embargo, se pudo observar una ligera tendencia de un mayor número de muestras positivas para VPH en los grupos de pacientes más jóvenes. Por otra parte la literatura se reporta al VPH 18 en segundo lugar de frecuencia,^{4 23, 30, 36} después del VPH 16, sin embargo en este trabajo se observó una mayor presencia de VPH 31. Esta diferencia puede deberse a diferencias geográficas resultando en una diferente distribución del virus. Así mismo, cabe mencionar que anteriormente el VPH31, era considerado como virus de mediano riesgo, sin embargo, recientemente en base a datos epidemiológicos ya se considera a este como un virus de alto riesgo³⁷. Así mismo, nuestros datos apoyan que el VPH 31 es un VPH de alto riesgo.

Un dato interesante que se encontró fue la presencia de VPH 11 en los tumores. ya que en cérvix causa lesiones benignas, por lo que es considerado como un virus de bajo riesgo. Sin embargo la asociación entre VPH de bajo riesgo y otras lesiones ha sido reportada. Dianzani C, y cols., previamente detectaron VPH 11 en un caso de carcinoma de pene invasivo del tipo verrucoso³⁸. Heinzl P. y cols., encontraron un paciente con lesiones benignas en cérvix y lesiones malignas en laringe, ambas provocadas por VPH 11³⁹. De igual forma Rubin y cols., detectan en 8.3% de muestras de cáncer de pene positivas para VPH 6, otro tipo viral de igual forma considerado como de bajo riesgo.⁴⁰ Sin embargo, no descartamos una

posible coinfección con un virus de alto riesgo presente en un número de copias muy bajo.

En la detección de VPH y la circuncisión, no se pudo establecer una relación, ya que el 90% de los pacientes no presentaba la circuncisión, y para el resto no se contó con esta información. Sin embargo, respecto a esto, Aynaud y cols.,²⁴ encontraron que no hay diferencia significativa entre las lesiones asociadas a VPH y la circuncisión. Por otro lado Fleiss P, opina que la circuncisión es en realidad un indicador de la clase social y no un factor de asociación por si mismo en la etiología del CaPe u otras enfermedades sexualmente transmisibles⁴¹. Se ha manejado que la falta de circuncisión es común en hombres de estratos sociales más bajos y escasa educación con historia de múltiples parejas sexuales, infecciones venéreas y difícil acceso a servicios médicos, entre otras cosas. Por lo tanto, estos hombres, tienen mayores posibilidades de contraer VPH y desarrollar cáncer de pene.

Sin embargo, Maymon y cols. Realizaron un estudio en una población judía, reportando una tasa muy baja (2.4%) de lesiones asociadas a VPH en hombres no circuncidados, cuyas parejas sexuales tenían NIC.¹⁹ Es probable que la falta de circuncisión se encuentre asociada en muchos casos a una mala higiene, múltiples contactos sexuales y a la falta de asistencia médica, sobre todo en países en vías de desarrollo como el nuestro. En este contexto es coherente pensar en una correlación entre la falta de circuncisión y el desarrollo de cáncer de pene, ya que debido una mala higiene se podría favorecer una infección con VPH.

Es por esto que se ha considerado que la circuncisión, lo que representa en realidad no es un efecto profiláctico, sino un riesgo reducido para el desarrollo del CaPe. De igual forma en el caso de hombres con historia de múltiples parejas sexuales, puede representar un riesgo reducido de desarrollar cáncer cervical en su pareja.^{13, 42}

Por otra parte, Castellsague y cols., encuentra una fuerte asociación entre la presencia de ADN de VPH en pene y el aumento del número de parejas sexuales²⁸ Desgraciadamente, para la variable del número de parejas sexuales en este estudio no se contó con mucha información. Por lo que la falta de estos datos representan un importante no nos permitieron realizar una correlación entre el número de parejas sexuales y el riesgo a desarrollar CaPe

El subtipo histológico típico fue el más frecuente con un 65%. El cual se encuentra un poco por debajo de lo reportado en la literatura que es del 70%³⁵. Así mismo, en la literatura el tipo basaloide es el segundo tipo más común, con un 10% de incidencia ¹⁴, sin embargo en este estudio no se presento ningún caso de este tipo. Respecto a los otros tipos nuestros resultados concuerda con los reportados anteriormente por Amin y cols, con un 10% de carcinoma papilar. En cuanto a los tipos verrugoso y condilomatoso encontramos 5% de cada uno, muy parecido a lo reportado por ellos con un 6 y 3% respectivamente.

El tipo de crecimiento más frecuente fue el vertical (80%), seguido por el de crecimiento mixto (10%). En contraposición a Cubilla y cols.¹², que encuentra el de

expansión superficial como más común (42%). Estas diferencias podrían deberse a diferentes etiologías en zonas geográficas en estudio. Así mismo, tal vez las infecciones con distintos tipos de VPH en las dos zonas podría estar influenciando este tipo de diferencias. Desafortunadamente, hasta el momento no se han podido encontrar asociaciones entre tipos de VPH y ciertos tipos de crecimiento. Sin embargo, si se ha mencionado que existe una mayor frecuencia de VPH 16/18 en carcinomas de crecimiento vertical, considerados de alto grado y profundamente invasivos, comparado con tumores de bajo grado, como los de crecimiento verruciforme, que son frecuentemente negativos para VPH.¹² Cabe mencionar que en este estudio si se pudo detectar secuencias virales de VPH en este tipo de tumor, sin embargo se trató de VPH 11 el cual es considerado como un tipo de bajo riesgo.

En cuanto al grado de diferenciación el carcinoma bien diferenciado presento el porcentaje más alto de positividad a VPH (100%) seguido por el moderadamente (53.3%) y el poco diferenciado (53%). Lo cual difiere a lo encontrado en el estudio anterior donde se tomaron en cuenta solo muestras VPH16 positivas, donde el poco diferenciado fue el que presentó el porcentaje más alto de positividad. Así mismo, los casos identificados en el presente trabajo como VPH 16, se registraron como moderada y poco diferenciados. De este modo, podría considerarse el grado de diferenciación del tumor, asociado mayormente a ciertos tipos virales.

Respecto a la morfología característica de la infección con VPH, se encontró que el 37.5% de muestras considerada como negativas presentaban secuencias virales. En este respecto, Schultz y cols., mediante Southern blot, encuentran 16%

de positividad a VPH, en muestras clasificadas como morfológicamente negativas⁴⁷. Con esto se puede ver que para la detección de VPH, el método de morfología histopatológica no resulta del todo confiable, y algunas de las muestras que no presentan cambios morfológicos característicos, pueden contener secuencias virales.

Los resultados obtenidos aquí muestran que el 65% de las muestras resultaron positivas para VPH, siendo el VPH 31 el más frecuente. Es posible que en distintas regiones geográficas se presenten distintos porcentajes de tipos de VPH, lo cual podría estar relacionado con factores genéticos o ambientales. Sin embargo, puede mencionarse que al menos el 50% de los casos de CaPe se relacionan a VPH. Poblet y cols., sugieren que podría haber dos grupos de casos de CaPe, uno involucrado con VPH y otro en el que los VPH no estén relacionados, en ambos casos podrían estar implicados factores geográficos o epidemiológicos. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que hay estudios de cáncer de pene y VPH, donde se han reportado porcentajes cercanos al 100%^{23,25} de muestras positivas para VPH; esto se ha visto dependiendo de la técnica empleada o la población estudiada.

Por último, al observar la baja incidencia de CaPe en comparación con CaCu, se piensa en las diferencias de infección viral en pene y cérvix. Se sugiere que otros factores además de VPH pueden jugar un papel importante en el desarrollo de una neoplasia. Se ha mencionado que la zona de transición en cérvix es

particularmente vulnerable a la infección y al desarrollo de una lesión premaligna. Así mismo, algunos autores han mencionado que tal vez en CaPe el período de incubación del virus puede ser más largo que para el cáncer cérvico-uterino. Por lo que el CaPe podría desarrollarse en una etapa más tardía, que el cáncer de cérvix⁴⁵ Sin embargo, no se sabe si el desarrollo de una lesión premaligna del pene se da en una etapa temprana de la vida, ya que a diferencia de las mujeres, para los hombres no existen métodos de detección temprana de este tipo de lesiones; por lo que podría no existir una diferencia real en el período de incubación del virus entre hombres y mujeres, sino que las diferencias observadas se pueden deber al mejoramiento de los métodos de diagnóstico de lesiones premalignas en las mujeres.

Por último, no habiendo duda de la transmisión sexual del VPH se debe reconocer la importancia del tratamiento de los hombres con lesiones premalignas o cáncer de pene como un mecanismo de control de la infección con VPH y sus repercusiones en CaCu en nuestro país.

Conclusiones

- El 65% de las muestras estudiadas resultaron positivas para VPH.
- Al igual que sucede en cáncer cérvico-uterino, una gran cantidad de tipos virales fueron detectados, siendo el VPH 31 el más frecuente presente en las muestras.
- La falta de circuncisión asociada a otros factores puede conferir un riesgo reducido al desarrollo de cáncer de pene.
- El grado de diferenciación que mostró la mayor positividad a VPH fue el bien diferenciado con el total de las muestras positivas.
- No se pudo encontrar relación entre el subtipo histológico del tumor y algún tipo viral.
- Más de la mitad de los casos de cáncer de pene pueden ser atribuidos a la infección con VPH.

Referencias

1. Kiseljov, F.L. 1999. Virus-Associated Human Tumours: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses.
2. Stoler, MH The virology of cervical neoplasia: an HPV-associated malignancy Cancer J. 2003 Sep-Oct;9(5):360-7.6.
3. Sarkar, F.H. Miles, B.J. Plieth, D.H. crissman, J.D. 1992. Detection of Human Papillomavirus in Squamos Neoplasm of the Penis.J Urology. 147:389-392.
4. Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. 1993. Detection of Human Papilloma virus Deoxyribonucleic Acid in Penile Carcinoma by Polimerasa Chain Reaction and in Situ Hibridization. J Urol 149:59-63.
5. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, de Sanjose S, Ghaffari AM, Gonzalez LC, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Navarro C, Vergara A, Ascunce N, Guerrero E, Shah KV. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain.J Natl Cancer Inst. 1996 Aug 7;88(15):1060-7.
6. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Hernandez-Avila M, Salmeron J, Leyva A, Meijer CJ, Walboomers JM High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican males: comparative study of penile-urethral swabs and urine samples. Sex Transm Dis. 2001 May;28(5):277-80.
7. Picconi, M.A. A.M. Eijan, Distéfano A.L. Pueyo S. Alonio L.V. Gorostodi, S. Teyssié A.R. Casabé A. 2000 Human Papillomavirus (HPV) DNA in Penile Carcinomas in Argentina: Análisis of Primary Tumors and Lymph Nodes.
8. <http://plazasol.uson.mx/hge/revista/3/dos.htm>.

9. Walter, J.B. 1994. Patología Humana. El Manual Moderno. México. 734.
10. Schellhammer, PF, Jordan, GH and Scholssberg, SM. Tumores del pene. Campbell Urología, 6ª. 6ª.Edición, P.C. Walsh, A.B. Retick, T.A. Stamey y E.D. Vaughan, Jr., Philadelphia: W.B.B. Saunders Co.,1992 Vol. 2, Capítulo 31, Pg. 1263-1297.
11. Abeloff M.D. J.O. Armitage, Lictor.S.A. Niederhuber J. 2000. Clinical Oncology 2ª Ed. USA. 1885-1896.
12. Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Riveros M. 1993.Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. A prospective study of 66 cases. Am J Surg Pathol. Aug;17(8):753-63.
13. Pukkala E, Weiderpass E. 2002.Socio-economic Differences in Incidence Rates of Cancers of the Male Genital Organs in Finland, 1971–95 int. j. cancer: 102, 643–648.
14. Kumar M.D. Ramzi, S. Cotran M.D. Robbins, S. L. 1999. Patología Humana.6ª Ed. McGraw Hill Interamericana. México. 1112-1115.
15. Katelaris, P.M., Y. E. Cossart, Rose B.R. Thompson C.H., Sorich E. Nightingales B. Dallas P.B. Morris J. Human papillomavirus: The Untrated Male Reservoir.1998.J Urol 140: 300-305.
16. Levine RU, Crum CP, Herman E, Silvers D, Ferenczy A, Richart RM. Cervical papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a study of male sexual partners. Obstet Gynecol. 1984 Jul;64(1):16-20

17. Sand, P. K. Bowen, L. W. Blischke, S. O. Ostergard, D. R. 1986. Evaluation of male consorts of women with genital Human Papillomavirus infection. *Obstet Gynecol* 1986, 68: 679-681.
- 18 Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology, and histology. *Obstet Gynecol.* 1987 Sep;70(3 Pt 1):299-304.
- 19 Maymon R. A. Bekerman, Werchow M., Maymon, B.B., Segal, R. Faktor, J.H. 1995. Clinical and subclinical condyloma rates among males sexual partners of womwn with genital Human Papillomavirus infection *J. Reprod Med* 51:587-592.
20. McCance, D.J., A. Kalache, K. Ashdown, L.andrade,, F. Menezes, Smith, P. R.Dool. 1986. Human Papillomavirus type 16 y 18 in Carcinomas of the Penis from Brazil.
- 21 Varma, V.A. Sánchez.Lanier, M. Unger, E.Clark, C. Tickman, R. Hewan-lowe, K. Chenggis, M.L. Swan, D.C.1991. Association of human Papillomavirus with Penile Carcinoma. *Human Pathology* 22(9):908-913
22. Scinicariello, F. Rady, P. Saltzstein D. Orihuela E. Stephen K. T.1992.Human Papillomavirus Exhibits a Similar Integration Pattern in Primary squamos cell Carcinoma of the Penis and in Its Metastasis. *Cancer* 70(8): 2143-2148.23. Tornesello M, Bounaguro F. 1992. Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma and in Two cell Lines from High-Incidence Areas for Genital Cancers in Africa. *Int J Cancer* 51, 587-592.
24. Aynaud O. Ionesco, M. Barrasco, R.1994. Penile Intraepithelial Neoplasia. *Cancer* 74 (6):1762-1767.

25. Cupp MR, Malek RS, Goellner JR, Espy MJ, Smith TF. Detection of human papillomavirus DNA in primary squamous cell carcinoma of the male urethra. *Urology*. 1996 Oct;48(4):551-5.
26. Levi, J.E. Rahal, P. Sarkis, A.S. Villa, L.L. 1998. Human Papillomavirus DNA and p53 Status in Penile Carcinomas. *Int. J Cancer*. 76: 779-783.
27. Cubilla AI. Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster W, Fair W. 1998. Basaloid Squamous Cell Carcinoma: A Distinctive Human Papilloma Virus-related Penile Neoplasm. *American J Surgical Pathol* 22(6): 775-761.
28. Castellsague X, Ghaffari A, Daniel RW, Bosch FX, Munoz N, Shah KV. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176(2):353-61.
29. Bleeker M, Hogewoning JA, van den Brule A, Voorhost F, van Adel RE, Risse EKL, Starink TM, Meijer C. 2002. Penile lesions and Human Papillomavirus in Male Sexual Partners of Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Am Acad Dermatol*. 47(3): 351-357.
30. Bezerra A, Lopes A, Lindman G, Aloncar G, Torloni H, Villa L. 2001. Clinicopathologic Features and Human Papillomavirus DNA Prevalence of Warty and Squamous Cell Carcinoma Of the Penis. *Am J Surg Pathol* 25(5): 673-678.
31. Villa, L, Lopes, A. 1986. Human Papillomavirus DNA Sequences in Penile Carcinomas in Brazil. *Int J Cancer*. 37, 853-855.

32. Iglesias C. 2001. El papel Potencial del Virus del Papiloma Humano en muestras de Cáncer de Pene. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. P.p 45-33.
33. Snijders, P.J.F., van den Brule A.J.C., Schrijnemakers H.F.J. Snow G. Meijer, C.J.L.M., Waalboomers J.M.M. 1990. The Use of General Primers in the Polymerase Chain Reaction Permits the Detection of a Broad spectrum of Human Papillomavirus Genotypes. *J Gen Virol* 71: 173-181.
34. <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/gorf/gorf.html>
35. Amin, M Cubilla, A. Young, Rh. Tumors of the prostate, seminal vesicles, male urethra and penis. Atlas of Tumor Pathology. AFJP Fascicles.
36. Bezerra A, Lopes A, Santiago H., Ribeiro K., Latorre M., Villa L., 2001. Human Papilloma Virus as a Prognostic Factor in Carcinoma of the Penis. *Cancer* 91(12):2315-2321.
37. Munoz N. 200. Human Papilloma Virus and Cancer: the Epidemiological evidence. *J Clin Virol* (1-2):1-5.
38. Dianzani C. Bucci., M, Pierangeli A, Calveri S, Degener AM. 1998. Association of human papillomavirus type 11 with carcinoma of the penis. *Urology*. 51:1046-1048.
39. Heinzl PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, et al. 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33 (7):1746-54.

40. Rubin M, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla A, Quint WG, Pirog E, 2001. Detection and typing of human papillomavirus DNA in Penile Carcinoma. *Am J Pathol* 59(4): 1211-1218.
41. Fleiss, P.M., 1996The detection of Human papillomavirus deoxyribonucleic acid intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis (letter to editor). *J Urol* ; 155: 2034-5; discussion 2035-6.
42. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, Eluf-Neto J, Ngelangel CA, Chichareon S, Smith JS, Herrero R, Moreno V, Franceschi S; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2002. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med*. Apr 11;346(15):1105-12
43. Schultz R. E., Miller J. W. MacDonald GR, Auman J,R, Peterson N.R., Ward, B. E., Crum C.P. 1990. Clinical and molecular evaluation of acetowhite genital lesions in men. *J Urol* 143:920-923.
44. Poblet E, Alfaro L, Fernader-Segoviano, P. Jiménez-Reyes, Salido j, E.C. 1999. Human papillomavirus-associated penile squamous cell carcinoma in HIV-positive patients. *Am J Surg pathol*. 23: 1119-1123.
45. Iversen T, Tretli S, Johansen A, Holte T.1997. Squamous cell carcinoma of the penis and of the cervix, vulva and vagina in spouses: is there any relationship? An epidemiological study from Norway, 1960-92. *Br J Cancer*. 1997;76 (5):658-60.