



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**" DETECCIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN GÉNICA
DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 3 EN
MUESTRAS DE CÁNCER DE PENE."**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

BRENDA EDITH ALATORRE TAVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2007



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.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México en especial al Posgrado de Ciencias Biológicas, al Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS, así como a los miembros de mi comité tutorial Dr. Mauricio Salcedo Vargas, Dr. Emilio Rojas del Castillo y al Dr. Rogelio Hernández Pando y al Consejo de Ciencia y Tecnología CONACYT el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CÁNCER DE PENE	5
VIRUS DE PAPILOMA	7
GEN TERC	9
ANTECEDENTES	10
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38

Resumen

La infección con VPH afecta tanto a hombres como a mujeres por lo que al igual que con el cáncer de cérvix (CaCu), se ha observado que existe una relación del virus con el desarrollo del Cáncer de Pene (CaPe). Sin embargo, la infección con el virus no se considera suficiente para el desarrollo de una neoplasia, ya que se ha visto en pacientes con lesiones precursoras del cérvix que solo una pequeña fracción de estas lesiones progresa a cáncer, sugiriendo que algunas alteraciones genéticas puedan estar jugando un papel muy importante en el desarrollo de la neoplasia. De esta forma, se ha reportado la frecuente adquisición de copias extra del cromosoma 3q, específicamente del gen TERC, en lesiones premalignas del carcinoma cervical, en las cuales siempre está presente el VPH; debido a que es consistente con el daño a la función de p53 y pRb mediado por las proteínas virales E6 y E7, ya que los genes de telomerasa son transcripcionalmente activados por la proteína E6 de VPH. Por tal motivo, debido a que el CaPe también se encuentra relacionado a la infección por VPH, la ganancia de 3q de igual forma podría ser observada en esta neoplasia, excepto en los casos donde no se detecte la presencia del virus. Se analizaron 76 tejidos muestras de CaPe de las cuales el 75% presento secuencias virales siendo el VPH tipo 16 variante Europea (E) el más frecuente. Asimismo, se tomaron 34 muestras y fueron sometidas a PCR en Tiempo Real para determinar si el gen TERC se encontraba amplificado. De estas solo 5 mostraron resultados indicativos de la amplificación del gen por lo que se sugiere que podrían analizarse otras regiones dentro de 3q en donde podrían encontrarse otros genes candidatos a marcadores de progresión.

Abstract

HPV infection affects both men and women and as in Cervical Cancer (CC) it has been observed a relationship of the virus with the development of Penile Carcinoma (PC). However, single infection is not enough to develop a neoplasia, since it has been seen that just a minor fraction of patients with precursor lesions progress to CC, suggesting that some genetics aberrations can play a very important role in the development of a neoplasia. In this way, it has been reported the frequent acquisition of 3q extra copies, specifically TERC gene, in precursor lesions, in which, HPV is always present. This is consistent with injuries to p53 and pRb functions induced by viral proteins E6 and E7, because telomerase genes are transcripcionally activated by E6 protein of HPV. By such reason, due to PC is related to HPV infection, the 3q gain could be observed in this neoplasia, except for the cases where the presence of the virus is not detected. 76 PC samples were examined and 75% were HPV positive being HPV 16 European (E) variant the most common. Also, 34 samples were analyzed by Real Time PCR to determinate if TERC gene was amplified. Of these, only 5 samples showed gene amplification, reason why it is suggested that other regions of 3q could be considerate to find other candidates genes that can function like markers for progression.

Introducción

El Cáncer de Pene (CaPe) es un tumor que se presenta con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo. Asociado a esta enfermedad se encuentra el Virus del Papiloma Humano (VPH); el cual es transmitido por vía sexual y es considerado como el factor etiológico más importante para el desarrollo de Cáncer cérvico-uterino (CaCu) (Stoler, 2003), por lo que el CaPe es considerado como la contraparte masculina al CaCu (Iwasawa, 1993). No obstante, los VPH que están involucrados en la infección y asociación con esta neoplasia han sido muy poco estudiados (Sarkar, 1992) 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 masculina (Stoler, 2003), por lo que parece el CaPe presenta una variación geográfica.

Para el año 2001 los reportes de Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en nuestro país, registraron para una incidencia de CaPe del 1.3% (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/html>), 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 CaPe y la relación que existe con VPH. En el 2002 Lazcano y cols., (Lazcano-Ponce, 2002) 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.

Sin embargo la infección con el virus no se considera suficiente para el desarrollo de una neoplasia, ya que se ha visto en pacientes con lesiones precursoras del cérvix que solo una pequeña fracción de estas lesiones progresa a cáncer (Zur-Huasen, 2000), por lo que se ha sugerido que algunas alteraciones genéticas puedan estar jugando un papel muy importante en el desarrollo de la neoplasia. La adquisición de

cambios específicos en el número de copias del DNA y el mantenimiento de esas aneuploidías, son comúnmente observadas en los tumores sólidos (Reid, 1997) Mediante estudios de Hibridación Genómica Comparativa (HGC) se ha reportado que la adquisición de copias extra del cromosoma 3q, es una alteración genética muy frecuente en las lesiones premalignas del carcinoma cervical, en las cuales siempre está presente el VPH (Heselmeyer-Hadad, 1996, 2003, 2005).

Recientemente Heselmeyer-Hadad y cols., (2005), propusieron que la ganancia de 3q, específicamente del gen TERC, puede representar un evento temprano en la transformación maligna presente en lesiones premalignas de cérvix, pudiendo utilizarse como un biomarcador en el proceso de carcinogénesis cervical, ya que mencionan que la ganancia de la región 3q es consistente con el daño a la función de p53 y pRb mediado por las proteínas virales E6 y E7 por lo que podría indicar que los casos que presenten esta alteración progresarían a CaCu. Esto debido a que los genes de telomerasa son transcripcionalmente activados por la proteína E6 de VPH, por lo que la ganancia de este gen podría brindar una ventaja a las células epiteliales (Heselmeyer-Hadad, 2005).

Por tal motivo, debido a que el CaPe también se encuentra relacionado a la infección por VPH, la ganancia de 3q de igual forma podría ser observada en esta neoplasia, excepto en los casos donde no se detecte la presencia del virus.

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 invasor de pene (Picconi, 2000).

El CaPe es un tumor epitelial maligno del tipo epidermoide o de células escamosas, que se presenta con mayor frecuencia entre los 70 y los 90 años de edad (Picconi, 2000) 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 (Walter, 1994). 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.

Cubilla y col. dividieron al CaPe en carcinoma escamosa superficialmente extendido, carcinoma vertical, carcinoma verrucoso y carcinoma multicéntrico (Cubilla, 1993).

El carcinoma superficialmente extendido 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 infiltrante y poco o moderadamente diferenciado (Abeloff, 2000).

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 tipo (Schellhammer, 1992) el cual se encuentra relacionado etiológicamente con infección de VPH tipos 6 y 11; ya que se han encontrado en el 85% de estos (Cubilla, 1993).

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 CaPe 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 (Pukkala, 2002).

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 esmegma (Kumar, 1999), (acumulación de células epiteliales descamadas y sudor). La fimosis (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 (Katelaris, 1998).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

La familia de los papiloma virus emerge como la familia más compleja de virus patógenos para el hombre, la información genética del HPV está en forma de una doble cadena de ADN circular cubierto por una cápside y su genoma consta 8000 pb aproximadamente (Kiseljov, 1999).

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*) debido a que se expresan tardíamente en el proceso infeccioso, contiene aproximadamente 2500 pb y codifican para las proteínas de la estructura viral.

Otros siete marcos de lectura abierta, llamados *early*, (de expresión temprana) de aproximadamente 4500 pb, están implicados en el control y reproducción viral y la manifestación del potencial patógeno (Kiseljov, 1999). 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 (Stoler, 2003).

La transcripción y la replicación están ligadas al estado de diferenciación de la célula infectada (Stoler 2003). 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 (Sarkar, 1992)

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 (Iwasawa, 1993) 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 (Stoler, 2003).

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 pRb (Picconi, 2000).

Variantes VPH

Los virus se clasifican de acuerdo a su secuencia nucleotídica y hasta la fecha se han detectado más de 80 tipos virales (Muñoz, 2003). Los VPH presentan variación no solo entre tipos sino entre un mismo tipo viral, a esta variación se le considera como variante. Las variantes virales se definen como tipos virales que varíen en menos del 2% en regiones específicas del genoma viral (Yamada, 1997), mientras que para considerar un tipo viral debe de haber una variación nucleotídica de más del 2%. Debido a la alta prevalencia del VPH tipo 16, las variantes de este tipo viral son las más ampliamente estudiadas, y se dividen en 5 grandes grupos que son europea (E), Asiática (As), Asiático-Americana (A), Africana1 (Af1), Africana2 (Af2) (Giannoudis, 2001). A estas variantes se les han atribuido diferentes capacidades oncogénicas resultando ser más o menos agresivas dependiendo de cual se trate, esto en base a la

capacidad que presentan sus oncoproteínas de interactuar con genes como pRb o p53.

Gen TERC

La telomerasa es un ribonucleoproteína que depende de un templado de ARN por medio del cual va adicionando hexanucleótidos a los extremos de los cromosomas para así formar los telómeros (Nakano, 1998). La telomerasa depende de dos componentes esenciales: una proteína catalítica con actividad de transcriptasa reversa llamada hTERT y el componente de ARN, el cual sirve de templado telomérico y es llamado hTERC o hTR. En humanos TERC es transcrito por una RNA polimerasa tipo II y es procesada en su extremo 3' para producir un transcrito maduro de 451 nucleótidos, el templado para la transcripción reversa comienza cerca del extremo 5' el cual especifica la síntesis de la secuencia telomérica (Cong, 2002). Muchos experimentos han mostrado que este gen es ampliamente expresado en tejidos tumorales y no tumorales, por lo que se concluyó que no es esencial para la reactivación de la telomerasa. Sin embargo, la examinación de tumores mediante hibridación *in situ* reveló que existía una sobrerregulación de la expresión de este gen en tejidos tumorales (Guilleret, 2002). Así mismo, se ha visto que mutaciones en este gen causan disqueratosis congénita autosómica dominante y también puede ser asociada con algunos casos de anemia aplásica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Además, de servir como un templado para la transcripción reversa en la síntesis telomérica, esta subunidad está involucrada también en la actividad de la enzima probablemente con nucleótidos específicos que interactúan con componentes estructurales del sustrato de ADN y las subunidades de la proteína. La remoción o la sub-regulación de este componente de ARN conduce a la inhibición de la telomerasa, erosión de los telómeros, compromete la capacidad de crecimiento de células embrionarias altamente proliferativas, células testiculares, células hematopoyéticas en

ratón y la muerte de células HeLa y de células malignas humanas derivadas de glioma (Liu 1999).

Antecedentes

Han sido varias las técnicas utilizadas para detectar la presencia del virus en carcinoma de pene: por métodos histológicos y por análisis moleculares. 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 coilocíticas; 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).

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 (Maymon 1995).

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 (McCance 1986).

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 cols. 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 cáncer cervical escamoso (CCE), siendo todos controles negativos para VPH. Esto les sugiere que el CaPe esta relacionado con el VPH de transmisión sexual.

Así también, Scinicariello y cols., y Sarkar y cols., 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 invasores 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., en 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. Mediante 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 (Tornesello 1992).

Levi y cols., (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 (Cubilla 1998).

Uno de los pocos estudios comparativos 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 Life Technologies, Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD) 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 (Castellsague 1999).

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 penescopía 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 (Bleeker 2002).

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 (Bezerra 2001).

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 (Villa 1986).

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 tumor (Picconi 2000). Por otra parte, como ya se mencionó se ha visto que los virus presentan variantes y que estas pueden resultar ser más o menos agresivas dependiendo de cual se encuentre presente. En CaPe solo existe un trabajo para determinar las variantes virales presentes en este tipo de tumor, el cual fue realizado por Tornesello y cols., en 1997. En este trabajo solo se analizaron 5 muestras provenientes de pacientes de Uganda por medio de PCR y secuenciación, determinándose que en todas las muestras estaba presente la variante Af1, asimismo, en 4 de las muestras se encontraron cambios nucleotídicos no reportados anteriormente, por lo que las consideraron como una subclase de Af1 y la clasificaron como Af1-u (Tornesello, 1997).

Por otra parte, como ya se menciona la sola infección con el virus no es suficiente para el desarrollo de una neoplasia, por lo que se han realizado estudios para determinar otros factores que estuvieran involucrados. Mediante estudios de HGC se

determinó que un evento recurrente en CaCu era la ganancia de 3q (Rao, 1996, Heselmeyer-Haddad, 2004, Hidalgo, 2006).

De igual forma esta ganancia de 3q se ha observado en otro tipo de tumores como los de cabeza y cuello. En 2002 Singh y cols., mediante construcciones hechas en cromosomas artificiales de levadura (YACS), e hibridación in situ fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés), determinaron que de igual forma la ganancia de esta región podía ser observada en este tipo de tumores y que podría servir como un marcador de progresión y pronóstico, ya que se presentó en el 70% de los pacientes estudiados y que habían fallecido a causa del tumor (Singh, 2002).

En el año 2003 Heselmeyer-Haddad, propusieron al gen componente de RNA de la telomerasa, ubicado en la banda 3q26 como el posible gen candidato para marcador de progresión tumoral en lesiones cervicales. Construyeron cromosomas artificiales de bacterias (BACS) los cuales contenían este gen y mediante experimentos de FISH. determinaron que en el 63% de lesiones de alto grado se observaban copias extra de 3q (Heselmeyer-Haddad, 2003). Posteriormente este mismo autor pero en el año 2005, utilizando muestras de citologías cervicales que tenían seguimiento clínico, determinó que en el 33% de muestras citológicas normales que progresaron hacia una lesión de alto grado, podía ser observada la ganancia de este gen, asimismo, señalan que esta ganancia se presentó en el 100% de las lesiones de bajo grado que progresaron hacia alto grado (Heselmeyer-Haddad, 2005).

Anteriormente, Reesink-Peters en el año 2003, realizó un estudio para ver si la detección de la telomerasa y sus componentes, podrían servir como indicadores de la presencia de lesiones cervicales de alto o bajo grado; esto mediante ensayos de repetición de amplificaciones teloméricas, y PCR de transcripción reversa (RT-PCR). De igual forma también realizaron la determinación de VPH por PCR convencional. De las 28 muestras que tenían encontraron que en el 88% de ellas se detectó actividad de

hTERC y en el 23% de hTERT, así como en el 79% se encontraron secuencias virales pertenecientes a virus de alto riesgo, sin embargo, ellos concluyen que ninguno de estos resultados por separado o en conjunto servirían como prueba diagnóstica para mujeres que se encontraban en frontera entre discariosis citológica media y moderada (Reesink-Peters, 2003).

Finalmente en el año 2006 Hopman y cols., evaluaron la correlación entre el número de copias del gen hTERC y el estado físico de VPH durante la progresión en neoplasias cervicales, por medio de experimentos de FISH, ellos concluyen que la ganancia y aneusomías de hTERC correlacionan fuertemente con la transición de una lesión de alto grado a carcinoma microinvasor, y además puede asociado con la integración viral, por lo que estos dos eventos parecen estar asociados con la progresión (Hopman A.H. y cols., 2006).

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. Asimismo, 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.

Se ha visto que la simple infección con VPH no es suficiente para el desarrollo de un tumor, por lo que otros eventos deben de estar involucrados en el proceso tumorigénico. Se ha mencionado que uno de estos es precisamente la ganancia de 3q, y específicamente la ganancia del gen hTERC, el cual se encuentra dentro de esta región. A este gen se le ha atribuido la capacidad de servir como un marcador de progresión tumoral, ya que se menciona que su ganancia coincide con el compromiso de los genes TP53 y RB1 mediado por VPH, lo que promueve la tumorigénesis y la adquisición de aneuploidias presentes en muchos carcinomas (Heselmeyer-Haddad, 2003). Por tal motivo, debido a su presunta asociación del mismo virus con CaPe esta misma ganancia podría ser observada en las muestras que resultaran positivas para la presencia del virus, y no así en las que no presentan secuencias virales.

Hipótesis

En muestras de CaPe donde se encuentre presencia viral se podrá observar la amplificación del gen hTERC.

OBJETIVOS

General

Determinar la amplificación génica del gen hTERC en muestras de Cáncer de Pene.

Particulares

- Detectar presencia de VPH en muestras de CaPe por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Determinar el tipo y/o variante viral presente, mediante secuenciación automatizada.
- Determinar la amplificación de 3q mediante PCR en Tiempo Real.

Material y Métodos

Obtención de las muestras

Se utilizaron 76 tejidos de cáncer de pene incluidos en parafina, obtenidos del registro histopatológico del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Hospital General de México que comprenden del período de 1988 al 2005. 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 de 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. Todas las muestras fueron sometidas a amplificación del gen RET para determinar la calidad del ADN antes de comenzar con la tipificación de las muestras.

Detección de ADN de VPH

La amplificación del ADN se realizó mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para una región del gen E6 de VPH16, E6VPH16 (Terris,1997) los cuales amplifican un fragmento de 126 pb, las muestras que resultaran negativas fueron sometidas a un segundo análisis con los oligonucleótidos Gp5+ y Gp6+ (Snijders,

1990), 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 1**). Como templado se utilizaron 100 ng de ADN. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50µl que contenía MgCl₂ 1.5 Mm, buffer de PCR 10x, 10mM de cada dNTP, 50 pmoles de oligonucleótido y 1U de Taq polimerasa (Promega, Madison WI, USA). Los tubos de reacción fueron colocados en un termociclador (MJ Research Minicycler) y la reacción se llevó a cabo en 35 ciclos de amplificación con el siguiente programa: desnaturalización 94°C por 30 seg, alineamiento 55°C por 1.5min y extensión 72°C por 1.5 min. con una extensión final a 72°C por 7 min. La PCR para Gp5+/6+ se llevó a cabo de la siguiente manera: 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 líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio en el equipo EagleEye 2 Strategene.

Secuenciación

Los productos obtenidos fueron purificados con el kit Wizard Gel Clean (Promega Madison WI, USA), el cual consta de columnas con una membrana de silica la cual deja libres los productos de cualquier residuo de sales u oligonucleótidos 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, Ontario, Canada). Se realizó el marcaje de los mismos mediante una reacción de PCR con el kit BigDye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City CA, USA) utilizando los oligonucleótidos E6/VPH16+ para determinar la variante de VPH16 presente, y GP5+ para determinar el tipo viral. 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, California USA) 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 que variante de o tipo viral se trataba (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/gorf/gorf.html>).

PCR cuantitativa en Tiempo Real

Para determinar si el gen hTERC se encontraba amplificado en las muestras se realizó una cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real, en el equipo LightCycler 2.0 (Roche). Se utilizó el sistema de oligonucleótidos D-LUX (Invitrogen, Carlsbad California USA), este sistema consiste de un par de oligonucleótidos de los cuales solo uno de ellos tiene un fluoróforo unido al extremo 3'. Este oligonucleótido marcado contiene una pequeña secuencia de 4-6 nucleótidos en el extremo 5' que es complementario al extremo 3' del oligonucleótido. Esto da como resultado una estructura de tallo y burbuja que sirve para apagar (*quench*) la fluorescencia. Cuando el oligonucleótido es incorporado al ADN, el fluoróforo es liberado y se observa que al amplificarse el ADN la señal se incrementa. Se diseñaron oligonucleótidos mediante el programa *D-Lux designer* (<https://orf.invitrogen.com/lux/?cid=fl-DLUXDESIGNER>) para el gen hTERC así como para β_2 -M, el cual se utilizó como gen de referencia. Se amplificaron productos de 112 y 68 pb para hTERC y β_2 -M respectivamente (Tabla 1), ambos oligonucleótidos fueron marcados con el fluoróforo FAM. Se utilizaron 25ng de ADN genómico como templado y la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l que contenía 2mM de cada oligonucleótido, 5 μ l de qPCR Supermix UDG

(Invitrogen Carlsbad California USA), 0.4µl de MgCl₂ 50Mm, 1µl de BSA 5mg/ml y 0.3 U Taq polimerasa Platinum (Invitrogen Carlsbad California USA), utilizándose el siguiente programa: activación de la enzima 2min 50°C, desnaturalización 94° 2 min, y 45 ciclos de desnaturalización 95°C por 10 seg, alineamiento 62°C por 5 seg y extensión 72°C por 10 seg, adquiriéndose la fluorescencia una sola vez durante el ciclo de alineamiento. Así mismo, se llevó a cabo un ciclo adicional para obtener una curva de fusión, esto con la finalidad de verificar que no se estuvieran amplificando productos inespecíficos. Este consistió de un ciclo de 95°C , 70°C por 10 segundos y finalmente 95°C realizándose la adquisición continua de la fluorescencia durante esta última temperatura. Algunos productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% para verificar que solo se obtuviera el producto deseado. Las muestras fueron analizadas en duplicados y los resultados fueron examinados con el Software LightCycler 4.2 dentro de Cuantificación Relativa, tomándose como amplificado un resultado gene/referencia igual o mayor de 2.

Oligonucleótido	Secuencia	Gen	Fragmento
Sentido	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'	E6	126pb
Antisentido	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'		
Sentido	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'	Gp`s	150 pb
Antisentido	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'		
Sentido	5'-cggttTTAAGGTAGTCGAGGTGAACcG-3'	TERC	112 pb
Antisentido	5'-TGCGTCTTTACTTCCGACCTTC-3'		
Sentido	5' ACATACCTTGTTGATCCACTT-3'	β ₂ -M	68pb
Antisentido	5- catctgTTGCTCTATACGTGGCAGATG-3'		

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Análisis Estadístico

Se realizaron pruebas de Chi cuadrada para determinar si existía alguna relación entre los resultados obtenidos con los datos clínicos obtenidos, mediante el paquete

estadístico SPSS 12.0 para MacOS. Estas pruebas fueron consideradas como significantes cuando los valores de P fueron menores de 0.05.

Resultados

Con la finalidad de determinar la posible relación de hTERC y CaPe se determinó la amplificación de este gen por medio de experimentos de PCR en Tiempo Real. Asimismo, se realizó la búsqueda de secuencias de VPH en las muestras y se recolectaron datos clínicos e histopatológicos de las mismas.

Presencia de tipos Virales

Se procesaron un total de 76 muestras de las cuales el 75% (57/76) resultaron positivas para VPH. (Fig. 2). Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados para determinar el tipo y/o variante de VPH16.(Figura 2)



Figura 1. Amplificaciones del de Virus de Papiloma Humano en muestras de Cáncer de Pene en parafina, a) oligonucleótidos E6/VP16 (126pb) C+ Control positivo, C- Control negativo, B5-A2 muestras b) oligonucleótidos Gps (150 pb) C+ Control positivo B7-H1 muestras.

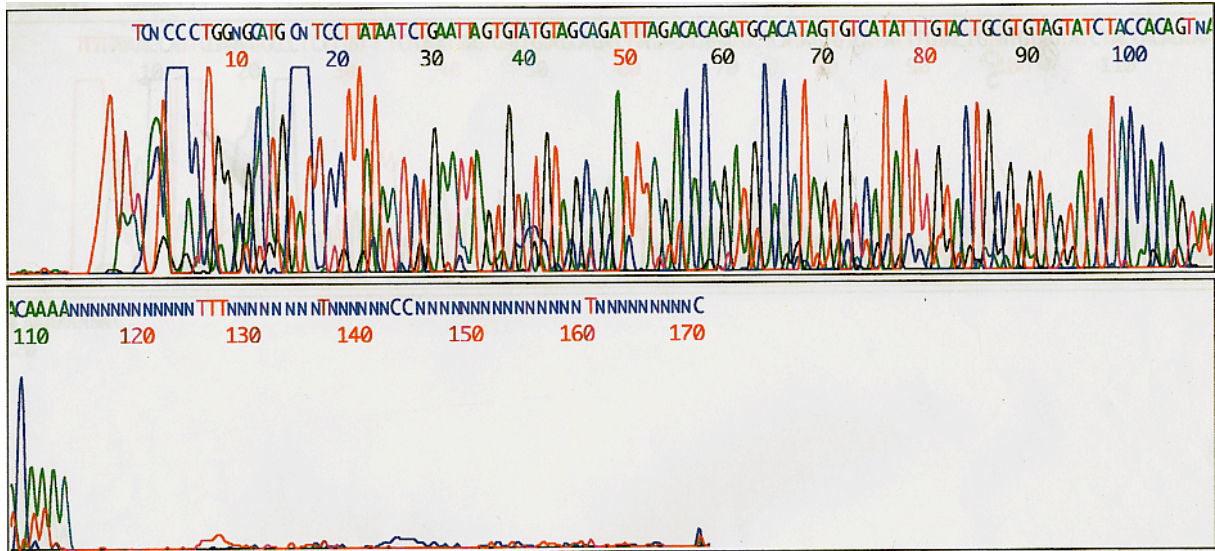


Figura 2. Electroferograma de la secuencia de un fragmento del gen L1 de VPH

16

Frecuencia de VPH en CaPe

Tal como sucede en CaCu, se detectaron diferentes tipos virales. El VPH tipo 16, fue el más frecuente (82%), seguido por los tipos 31 y 11 (5% cada uno) así como por los tipos 18, 33, 58 y 59 (2% cada uno). Interesantemente, se detectó la presencia de VPH 16 en muestras que en un principio habían salido negativas a este tipo (15%); por lo que la frecuencia total de VPH16 aumentó al considerar estos nuevos resultados (Figura 3).

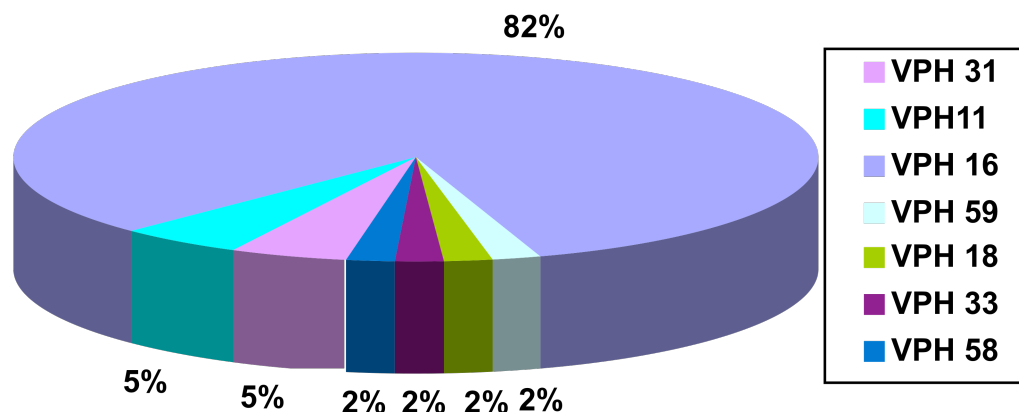


Figura 3. Frecuencia de VPH detectados en muestras de CaPe VPH16 negativas, incluidas en parafina

Variantes de VPH16

Las muestras positivas para VPH 16 fueron secuenciadas con la finalidad de determinar de que tipo de variante viral se trataba. Los resultados nos muestran que la variante Europea prototipo fue la más común en las muestras presentándose en el 65%, seguida por la variante EC188T en el 27% y por último las variantes Asiático-Americanas se presentaron en el 8% de las muestras. Cabe mencionar que las dos primera variantes son de tipo europeo por lo que más del 90% de las muestras pertenecen a este grupo. Se detectaron cambios nucleotídicos presentes en dos muestras que anteriormente no se han reportado, estos son en el nucleótido 153, G a C, codificando para Arg → Thr en la posición 24, y G a A en el nucleótido 204, resultando en un cambio de Lys → Arg en la posición 41.

Datos Clínicos e histopatológicos

La edad de los pacientes fluctuó entre los 24 y 94 años de edad, siendo la media de 58 años. La distribución por grupos de edad fue 43% (24) eran mayores de 65 años, 39% (22) estaban entre los 41 y 65 años, y solo 7% eran menores de 41 años. 33% de los pacientes VPH16 positivos fueron mayores de 65 años, 19% tenían entre 41 a 65 años y 5.2% fueron más jóvenes de 41 años. Por otra parte el 75% de los pacientes

positivos para VPH31 fueron mayores de 65 años, lo cual fue similar a los casos positivos para VPH11 y VPH18. Los tipos 59 y 33 estuvieron presentes en pacientes entre los 41 y 65 años. El 40% de todos los pacientes VPH16 positivos se encontraban entre los 54 y 73 años, representando ligeramente más de un tercio del total de las muestras positivas.

Los mayores picos de incidencia de presencia viral se presentaron entre los 61 y 70 años, así como, entre los 81 y 90 años, sin embargo, se puede ver que la presencia del virus se mantuvo aproximadamente en la mitad de los casos.

Respecto a los datos histopatológicos se pudo observar que el 68% de los casos (52/76) correspondían al subtipo histológico típico, el 19% (15/76) fueron mixtos, el 5% condilomatosos (4/76), el 3% (2/76) papilares, 2% verrugosos (2/76) y también se presentó un caso de tipo sarcomatoide (1%). El tipo de crecimiento vertical, se presentó en todos los casos.

En cuanto al grado de diferenciación el 61% (46/76) de los casos fueron moderadamente diferenciados, el 21% (16/76) fueron bien diferenciados y el 17% (13/76) fueron poco diferenciados. Por último, el 63% (47/76) de las muestras presentaban lesiones morfológicas asociadas a la infección por VPH, en tanto que 10% (7/76) mostraban una morfología que sugería la infección y un 27% (20/76) no presentaban este tipo de lesiones.

Por otra parte, el 90% de los pacientes no presentaban la circuncisión, y para el resto de los casos no se contó con esta información. De igual forma el número de parejas sexuales, fue la variable para la que se obtuvo menor información, por lo que estos datos no se tomaron en cuenta.

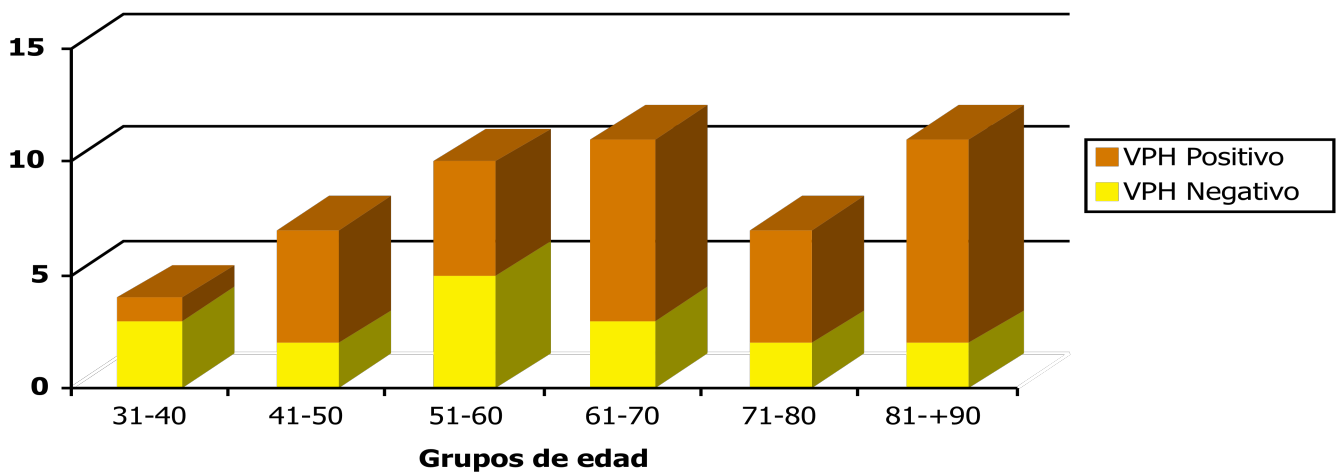


Figura 5. Porcentaje de muestras positivas para de VPH en los diferentes grupos de edad de los pacientes con CaPe.

Datos moleculares y variables histopatológicas

Todos los casos verrugosos y condilomatosos resultaron positivos para VPH, mientras que los casos típicos y papilares el 88 y 50% de las muestras respectivamente, presentaron secuencias virales. Por otra parte, todos los casos bien diferenciados, así como el 77% de los moderadamente diferenciados, y el 80% de los poco diferenciados presentaron secuencias virales. En cuanto a la morfología citológica, la referida como positiva a VPH fue la que presentó el mayor número de casos positivos asociada a infección por VPH.

Se realizaron pruebas estadísticas para determinar si había una relación entre tipo viral subtipo histológico del tumor, patrón de crecimiento o grado de diferenciación, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). No obstante, el análisis histopatológico mostró que las muestras que presentaban el tipo escamoso (68%) con patrón de crecimiento vertical (88%), moderadamente diferenciado 59% fueron las más comunes.

Amplificación del gen hTERC

Mediante el uso de PCR en tiempo Real se midió la amplificación del gen hTERC tomando el gen de una sola copia β_2 -M como gen de referencia. Utilizando el software de LightCycler 4.0 las muestras fueron examinadas mediante el análisis de Cuantificación Relativa. Con este se obtiene una tasa entre el gen de referencia y el gen problema en la muestra problema y la referencia, una tasa gen/referencia igual o mayor a dos fue tomada como amplificación.

Se analizaron un total de 34 muestras para determinar el estado del gen hTERC, solo en 5 muestras los datos que se obtuvieron fueron indicativos de la amplificación del gen, en las muestras restantes la tasa gen/referencia resulto por debajo de 2 (**Tabla 2**).

Se analizaron 26 muestras positivas para VPH y 8 negativas, en ninguna de las muestras negativas se obtuvieron resultados de amplificación del gen. Debido a que solo resultaron 5 las muestras amplificadas no se realizaron pruebas estadísticas para ver si existía correlación entre la presencia /ausencia del virus y el estado del gen.

	Muestra	HPV	Tasa gen/referencia
1	A8		16 4.48
2	E5		16 4.47
3	H9		16 3.31
4	A3		16 2.50
5	H7		16 2.41
6	E6		16 1.87
7	F4		16 1.62
8	J4		16 1.04
9	A5		0.91
10	D8		59 1.14
11	C1		0.19
12	J7		1.28
13	D6		16 0.13
14	I6		0.13
15	G5		16 0.12
16	J6		16 1.41
17	A9		0.64
18	A1		0.34
19	H8		16 1.80
20	H6		16 0.47
21	A6		0.31
22	C5	16/31	0.66
23	H3		16 0.56
24	B6		18 0.21
25	D2		16 0.52
26	B7	16/31	0.87
27	B3	16/31	0.28
28	B4	16	1.43
29	J5		16 0.55
30	I2		11 4.84
31	D7		0.43
32	C3		16 0.42
33	E3		16 0.19
34	G7		16 1.27

Tabla 2: Muestras analizadas para la determinación de la amplificación de hTERC. La tasa se refiere a la tasa normalizada entre hTERC y el gen de referencia β_2M .

Discusión

En este trabajo se analizaron muestras de cáncer de pene con la finalidad de detectar la amplificación del gen hTERC, a estas mismas se les realizaron pruebas de PCR para determinar si eran VPH+ y determinar si existía alguna correlación.

Se utilizaron oligonucleótidos generales que reconocen una gran cantidad de tipos virales, y así tener un espectro de detección más amplio. De igual forma por tratarse de muestras que habían sido fijadas en parafina se decidió utilizar oligonucleótidos que producen pequeños fragmentos con la finalidad de no obtener falsos negativos debido a la pobre calidad del ADN.

El porcentaje de muestras que contenían secuencias virales en este estudio fue de 75%. Este resultado es similar a lo reportado por otros autores (Cupp, 1996; Iwasawa, 1993; McCance, 1986; Villa, 1896; Senba M. 2006)

En cuanto a la edad, la media encontrada en los pacientes con CaPe, no difiere a la encontrada en otros países (Cupp, 1996, Levi, 1998, Amin,). Por otra parte la literatura se reporta al VPH 18 en segundo lugar de frecuencia (Cupp, 1996, Tornesello, 1992, Becerra, 2001), después del VPH 16, sin embargo en este trabajo se observó una mayor presencia de VPH 31. La presencia de VPH 11 en las muestras analizadas es un dato que resulta interesante, ya que este es considerado como un virus de bajo riesgo, sin embargo, anteriormente se ha reportado a este virus presente en otros tumores incluyendo CaPe (Dianzani, 1998), asimismo, Senba y cols., en 2006 reportó haber encontrado al VPH 6, un virus que de igual forma es considerado como de bajo riesgo, en segundo lugar de frecuencias en un trabajo que se realizó con muestras de CaPe de pacientes tailandeses. No obstante, no se descarta la posibilidad de infecciones múltiples con virus de alto riesgo pero en un número de copias menor.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el 65% de las muestras resultaron positivas para VPH, siendo el VPH 16 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 (Poblet, 1998). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que hay estudios de cáncer de pene y VPH, donde se han reportado porcentajes cercanos al 100% de muestras positivas para VPH (Cupp, 1996; Tornesello, 1992); esto se ha visto dependiendo de la técnica empleada o la población estudiada.

Respecto a las variantes de VPH16 encontradas, interesantemente, se observa una alta frecuencia de variantes Europeas (92%), similar a lo reportado para CaCu en Centro, Sudamérica y España (Berumen, 2001). Se ha propuesto que las distintas variantes de VPH correlacionan con la etnicidad de las poblaciones más que con la distribución geográfica (Lichtig, 2006) sin embargo, la frecuencia de variantes AA encontrada en este estudio fue más baja que la reportada en CaCu en otros estudios en México, en los cuales la frecuencia de AA es igual o incluso más alta que la de variante E (Calleja-Macias, 2004, Thompson, 1990). Este hecho puede simplemente reflejar la baja incidencia de CaPe comparado con CaCu, aunado a esto, podría existir una preferente asociación de este tipo de variantes con el epitelio de pene, así como a su microambiente. No obstante, en un trabajo publicado recientemente de México la variante de tipo E fue más prevalente sobre las de tipo AA (Lizano, 2006) en CaCu por lo que estos datos concuerdan con nuestros resultados.

Por otra parte, la media de edad fue de 58 años, y el pico de más alto de muestras positivas se encontró dentro del grupo de 61-70 años y 81-90 años, esos datos difieren de las prevalencias de VPH reportadas en hombres sanos en México, donde el pico más alto se encontró en hombres menores de 25 años (13.6%) y disminuye hasta los 40 años o más (6%) (Vaccarella, 2006). Este hecho resulta interesante

debido a que podría ser similar a lo que ocurre en cérvix, donde la frecuencia de VPH es más alta en casos que en mujeres sanas, habiendo un claro aumento en la prevalencia de VPH conforme el grado de la lesión va aumentando.

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. Algunos autores han mencionado que tal vez en CaPe el período de incubación del virus puede ser más largo que para CaCu, por lo que el CaPe podría desarrollarse en una etapa más tardía, que el cáncer de cérvix (Iversen, 1997). 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 otra parte, la infección con el virus no se considera suficiente para el desarrollo de alguna neoplasia, ya que solo un pequeño porcentaje de las lesiones provocadas por este virus, avanzan hacia etapas posteriores, por lo que además de la integración del virus dentro del genoma celular, otras alteraciones genéticas pueden estar jugando un importante papel en el desarrollo de la neoplasia. Dentro de estas se han apuntado la acumulación de aberraciones cromosómicas y el desarrollo de inestabilidad genómica, como por ejemplo, la ganancia del brazo largo del cromosoma 3, un evento que se ha reportado muy recurrente en CaCu. Dentro de esta región se encuentra el gen hTERT el cual es el componente de RNA de la telomerasa, y se le ha atribuido el papel de marcador de progresión en lesiones cervicales debido a su relevancia biológica apuntándose que la ganancia de este gen es consistente con el daño a la función de p53 y pRb mediado por las proteínas virales E6 y E7 (Heselmeyer-Haddad, 2005, 2006) . En este contexto muestras de CaPe resultarían ser un buen modelo, ya que de

igual forma existe una asociación del virus con el desarrollo de la neoplasia, y además se cuenta con aquellas muestras que resultan negativas a la búsqueda de secuencias virales por lo que se podría pensar que en este tipo de lesiones la amplificación del gen no existiría. Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo nos muestran que el porcentaje de muestras con amplificación de hTERT resulta ser muy bajo no importando si se tratan de muestras positivas o negativas al virus demostrando que la amplificación de hTERT no es un evento común en CaPe. Por otra parte, se obtuvieron resultados con valores m por debajo de 0.5, por lo que esto podría indicar que se trata de la pérdida de esa región cromosómica, sin embargo esto también podría ser atribuible a circunstancias experimentales. Por lo anterior, aunque la ganancia de 3q de igual forma a CaCu es un evento que ocurre en CaPe no lo es así la amplificación de hTERT, por lo que este no se asocia con CaPe, por lo tanto se deben de considerar otros genes que se encuentren en esa misma región como posibles marcadores.

Recientemente, se realizó un estudio para determinar la asociación entre el estado de integración del virus y la amplificación de este gen en CaCu, en el estudio se señala que estos dos eventos se encuentran fuertemente asociados en la progresión de una lesión premaligna hacia lesiones invasoras. Sin embargo, se señala que no todas las muestras analizadas presentan esta ganancia, por lo que esos datos apoyaban datos previos en donde se sugería que en el desarrollo neoplasias escamosas existían dos vías diferentes, una de las cuales no estaba asociada a la totalidad de las anomalías cromosómicas (Hopman 2006, Gram, 1998). En el presente trabajo se obtuvieron un porcentaje muy alto de muestras positivas para VPH, colocándolo incluso como uno de los que presenta porcentajes más altos de presencia viral, junto con otros dos trabajos (Senba, 2006; Poblet, 2006). Sin embargo, aún existen diferencias con CaCu, en donde prácticamente todos los casos presentan secuencias virales, y aunado esto a la baja frecuencia de la enfermedad, se ha apuntado que tal

vez en CaPe realmente existan dos vías para el desarrollo de la misma: una asociada a VPH y la otra independiente de la infección.

Esto resulta muy interesante ya que podría coincidir con lo anteriormente señalado de que existan dos vías para el desarrollo de las neoplasias en una de la cuales no están implicadas estas anomalías genéticas que pudieran estar asociadas a integración viral, lo cual también coincide con el hecho de que aunque se ha apuntado la ganancia de hTERT como un evento que marcaría la progresión de una lesión hacia un cáncer esto no es cierto al 100% por lo que hay algunas otras lesiones que de igual forma progresan sin mostrar estos eventos. Este tipo de lesiones podrían compartir la misma ruta de desarrollo de CaPe y por esto podría ser la baja incidencia de la enfermedad.

Conclusiones

De el total de las muestras analizadas el 75% resultaron positivas para VPH siendo el VPH 16 el más común, encontrándose en el 82% de las muestras positivas para el virus. Así mismo, se detectaron otros tipos virales cuya frecuencia es parecida a lo que se observa en CaCu.

Respecto a las variantes virales de VPH16, el 90% correspondieron a variantes de tipo europeo y el resto a variantes Asiático-americanas, lo cual es similar a lo reportado en otros trabajos realizados en CaCu en nuestro país.

Por último, la amplificación del gen hTERC se ha señalado como posible marcador de progresión tumoral, debido a que se encuentra en una región frecuentemente amplificada en tumores de cérvix, y a su relación con VPH. Sin embargo, en este trabajo solo se encontró en un mínimo porcentaje de muestras analizadas, por lo que se sugiere que podrían analizarse otras regiones dentro de 3q en donde podrían encontrarse otros genes candidatos a marcadores de progresión.

Referencias

- Abeloff M.D. J.O. Armitage, Lictor.S.A. Niederhuber J. 2000. Clinical Oncology 2ª Ed. USA. 1885-1896.
- Amin, M Cubilla, A. Young, Rh. Tumors of the prostate, seminal ,vescicles, male urethra and penis. Atlas of Tumor Pathology. AFJP Fascicles.
- Aynaud O. Ionesco, M. Barrasco, R.. Penile Intraepithelial Neoplasia. Cancer 1994. 74 (6):1762-1767.
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. J Natl Cancer Inst. 2001. 93(17):1325-30.
- Bezerra A, Lopes A, Lndman G, Aloncar G. Torloni H, Villa L.. Clinicopathologic Features and Human Papillomavirus DNA Prevalence of Warty and Squamous Cell Carcinoma Of the Penis. Am J Surg Pathol 2001. 25(5): 673-678.
- Bezerra A, Lopes A, Santiago H., Ribeiro K.,Latorre M., Villa L. Human Papilloma Virus as a Prognostic Factor in Carcinoma of the Penis. Cancer 2001. 91(12):2315-2321.
- Bleeker M, Hogewoning JA, van den Brule A, Voorhost F, van Adel RE, Risse EKL, Starink TM, Meijer C. Penile lesions and Human Papillomavirus in Male Sexual Partners of Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. J Am Acad Dermatol. 2002. 47(3): 351-357.
- 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. 88(15):1060-7.
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas Martinez A, Gonzales-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L,

- Brenard HU, Barrera-Saldana HA. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*. 2004. 319(2):315-23.
- 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. 176(2):353-61.
 - Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002. 66(3):407-25.
 - Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Riveros M..Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. A prospective study of 66 cases. *Am J Surg Pathol*. 1993. 17(8):753-63.
 - Cubilla AI, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster W, Fair W. Basaloid Squamous Cell Carcinoma: A Distinctive Human Papilloma Virus-related Penile Neoplasm. *American J Surgical Pathol* 1998. 22(6): 775-761.
 - 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. 48(4):551-5.
 - Dianzani C. Bucci., M, Pierangeli A, Calveri S, Degener A.M. Assosiation of human papillomavirus type 11 with carcinoma of the penis. *Urology*. 1998. 51:1046-1048.
 - Fleiss, P.M. The detecction of Human papillomavirus deoxyribonucleic acid intraepitelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis (letter to editor). *J Urol* 1996. 155: 2034-5.
 - Giannoudis A, Herrington C.S. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*. 2001. 193, 295-302.

- Guilleret I, Yan P, Guillou L, Braunschweig R, Coindre JM, Benhattar J. The human telomerase RNA gene (hTERC) is regulated during carcinogenesis but is not dependent on DNA methylation. *Carcinogenesis*. 2002. 23(12):2025-30.
- Heinzl PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H. 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.
- Heselmeyer K, Schihock E, Du-Manior S, Blegon H, Shah K, Steinbeck R, Aver G, Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of Uterine Cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996. 93:479-787.
- Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, Kamps MA, Herrington CS, Morrison LE, Speel EJ, Smedts F, Ramaekers FC. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *J Pathol*. 2006. 210(4):412-9.
- <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/gorf/gorf.html>
- <http://plazasol.uson.mx/hge/revista/3/dos.htm>.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
- <https://orf.invitrogen.com/lux/?cid=fl-DLUXDESIGNER>
- Iglesias C. El papel Potencial del Virus del Papiloma Humano en muestras de Cáncer de Pene. Tesis de Licenciatura. 2001. Universidad Nacional Autónoma de México.P.p 45.
- Iversen T, Tretli S, Johansen A, Holte T. 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.

- Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of Human Papilloma virus Deoxyribonucleic Acid in Penile Carcinoma by Polimerasa Chain Reaction and in Situ Hibridization. J Urol 1993.149:59-63.
- 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 J Urol 1998. 140: 300-305.
- Kiseljov, F.L. 1999. Virus-Associated Human Tumours: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses. Biochemistry (Mosc). 2000. 65(1):68-77.
- Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology, and histology. Obstet Gynecol. 1987. 70(3 Pt 1):299-304.
- Kumar M.D. Ramzi, S. Cotran M.D. Robbins, S. L. 1999. Patología Humana.6^a Ed. McGraw Hill Interamericana. México. 1112-1115.
- 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. 28(5):277-80.
- Levi, J.E. Rahal, P. Sarkis, A.S. Villa, L. Human Papillomavirus DNA and p53 Status in Penile Carcinomas.Int. J Cancer. 1998. 76: 779-783.
- 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. 64(1):16-20
- Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6.Virology. 2006. 20;350(1):216-27.
- Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. Cell Res. 2006. (10):809-17.

- Maymon R. A. Bekerman, Werchow M., Maymon, B.B., Segal, R. Faktor, J.H. Clinical and subclinical condyloma rates among males sexual partners of women with genital Human Papillomavirus infection J. Reprod Med 1995. 51:587-592.
- McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, Doll R Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. Int J Cancer. 1986. 37(1):55-9.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003. 348 (6):518-27.
- Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. Am J Pathol. 1998. 153(3):857-64.
- Picconi, M.A. A.M. Eijan, Distéfano A.L. Pueyo S. Alonio L.V. Gorostodi, S. Teyssié A.R. Casabé A. Human Papillomavirus (HPV) DNA in Penile Carcinomas in Argentina: Análisis of Primary Tumors and Lymph Nodes. Journal Medical Virology 2000. 61:65-69.
- Pina-Sanchez P, Hernandez-Hernandez DM, Lopez-Romero R, Vazquez-Ortiz G, Perez-Plasencia C, Lizano-Soberon M, Gonzalez-Sanchez JL, Cruz-Talonia F, Salcedo M. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. Int J Gynecol Cancer. 2006. (3):1041-7.
- Poblet E, Alfaro L, Fernader-Segoviano, P. Jiménez-Reyes, Salido J E.C. Human papillomavirus-associated penile squamous cell carcinoma in HIV-positive patients. Am J Surg pathol. 1999. 23: 1119-1123.

- Pukkala E, Weiderpass E. Socio-economic Differences in Incidence Rates of Cancers of the Male Genital Organs in Finland, 1971–95 *Int J Cancer* 2002.102, 643–648.
- Rao PH, Arias-Pulido H, Lu XY, Harris CP, Vargas H, Zhang FF, Narayan G, Schneider A, Terry MB, Murty VV. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma. *BMC Cancer*. 2004. 4:5.
- Reesink-Peters N, Helder M.N, Wisman G.B, Knol A.J, Koopmans S, Boezen H.M, Schuurin E, Hollema H, de Vries EG, de Jong S, van der Zee AG. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol*. 2003. 56(1):31-5.
- Reid T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Scrock E, Auer G. Genomic changes defining the genesis, progression and malignancy potential in solid tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes, Chromosomes Cancer* 1997. 19:233-240.
- Rubin M, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla A, Quint W.G. Pirog E. Detection and typing of human papillomavirus DNA in Penile Carcinoma. *Am J Pathol* 2001. 59(4): 1211-1218.
- 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.
- Sarkar, F.H. Miles, B.J. Plieth, D.H. crissman, J.D. Detection of Human Papillomavirus in Squamos Neoplasm of the Penis. *J Urology* 1992. 147:389-392.
- Schellhammer, PF, Jordan, GH and Scholssberg, SM. Tumores del pene. *Campbell Urología*, 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.

- Schultz R. E., Miller J. W. MacDonald GR, Auman J,R, Peterson N.R., Ward, B. E., Crum C.P. Clinical and molecular evaluation of acetowhite genital lesions in men. J Urol 1990. 143:920-923.
- Scinicariello, F. Rady, P. Saltzstein D. Orihuela E. Stephen K. T. Human Papillomavirus Exhibits a Similar Integration Pattern in Primary squamous cell Carcinoma of the Penis and in Its Metastasis. Cancer 1992. 70(8): 2143-2148. Senba M, Kumatori A, Fujita S, Jutavijittum P, Yousukh A, Moriuchi T, Nakamura T, Toriyama K. The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand. J Med Virol. 2006. 78(10):1341-6.
- Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bost G, Cordon Cardo C, Shah JP, Rao PH. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. Am J Pathol. 2002.161(2):365-71.
- 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. The Use of General Primers in the Polymerase Chain Reaction Permits the Detection of a Broad spectrum of Human Papillomavirus Genotypes. J Gen Virol 1990. 71: 173-181.
- Stoler, MH The virology of cervical neoplasia: an HPV-associated malignancy Cancer J. 2003. 9(5):360-7. Terris MK, Peehl DM. Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized. Urology. 1997. 50(1):150-6.
- Thompson, I.M. and Fair, W.R. *Penile Carcinoma*. A.U.A. Update Series, vol. 9, lesson 1, 1990.

- Tornesello M, Bounaguro F. Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma and in Two cell Lines from High-Incidence Areas for Genital Cancers in Africa. *Int J Cancer* 1992. 51, 587-592.
- Vaccarella S, Lazcano-Ponce E, Castro-Garduno JA, Cruz-Valdez A, Diaz V, Schiavon R, Hernandez P, Kornegay JR, Hernandez-Avila M, Franceschi S. Prevalence and determinants of human papillomavirus infection in men attending vasectomy clinics in Mexico. *Int J Cancer*. 2006. 119(8): 1934-9.
- Varma, V.A. Sánchez-Lanier, M. Unger, E.Clark, C. Tickman, R. Hewan-lowe, K. Chenggis, M.L. Swan, D.C. Association of human Papillomavirus with Penile Carcinoma. *Human Pathology* 1991. 22(9):908-913.
- Villa, L, Lopes, A. Human Papillomavirus DNA Sequences in Penile Carcinomas in Brazil. *Int J Cancer*. 1986. 37, 853-855.
- Walter, J.B. 1994. *Patología Humana. El Manual Moderno*. México. 734.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997. 71(3):2463-72.
- zur Hausen H: Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J ONatl Cancer Inst* 2000, 92:690-698.0