



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PAPEL POTENCIAL DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN EL CARCINOMA DE PENE

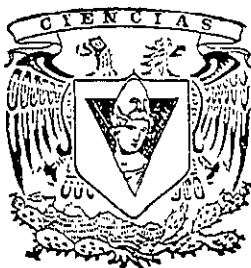
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA CANDELA IGLESIAS CHIESA



DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION BICOLAR



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.



MAT. MARGARITA FERRERA CHÁVEZ CANO
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis
 "El papel potencial del Virus de Papiloma Humano en el Carcinoma de Pene"

realizado por IGLESIAS CHIESA María Candela

con número de cuenta 9677078-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario Dra. Rosario Rodríguez Arnais

Suplente Dra. Isabel Alvarado Cabrero

Suplente M. en C. Miguel Angel Palomino Garibay

FACULTAD DE CIENCIAS
 U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suárez Díaz



Dra. Edna María Suárez Díaz DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**EL PAPEL POTENCIAL DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
EL CARCINOMA DE PENE**

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Introducción	6
Antecedentes	7
a) Las Lesiones Premalignas y el Carcinoma de Pene	
b) El Virus de Papiloma Humano	
c) Estudios de detección de VPH en pene.	
• Estudios con métodos clínicos e histológicos	
• Estudios con técnicas moleculares	
Planteamiento del problema	19
Objetivos e hipótesis	20
a) Objetivo general	
b) Objetivos particulares	
c) Hipótesis	
Material y Métodos	21
a) Muestras	
b) Extracción de DNA	
c) PCR	
d) Secuenciación	
e) Tipificación	
f) Análisis estadístico	
Resultados	24
a) Datos moleculares: PCR y secuenciación	
b) Datos clínicos e histopatológicos	
c) Correlación de datos moleculares con variables clínico-histopatológicas	
d) Datos geográficos	
Discusión	36
Conclusiones	42
Bibliografía	43

Con todo mi amor:

para Mamá, Papá, Carolina y Jimenita

para Julio

Gracias a:

- Aquiles y César
- Fatima
- Xoxo, Normis, Chat, Perchis y Ale
- Tan, Paos, Ro, Jonathan, Manuel y Beto
- Mis compañeros de laboratorio (¡y Montse!)
- Mis profesores: Memo Salgado, Víctor Valdés, Toño Lazcano, Rocío Salceda y Miguel A. Palomino
- Mauricio Salcedo

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, bajo la tutoría del Dr. Mauricio Salcedo Vargas, Investigador Asociado D, Jefe del Laboratorio de Genética Molecular.

Agradecimientos especiales

- A la Dra. Isabel Alvarado del Depto. de Patología del Hospital de Oncología, CMN S.XXI, IMSS por su colaboración en la obtención de muestras y en el análisis histopatológico.
- Al Dr. Héctor Santiago Payán, Jefe del Depto. de Patología del Hospital de Oncología, CMN S.XXI, IMSS por su apoyo para la realización de este trabajo.
- A la Dra. Dulce Ma. Hernández, Jefe de la sección de Epidemiología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN. S.XXI, IMSS por su asesoría en el análisis estadístico de los datos.

Resumen

El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) se ha visto fuertemente asociado a la infección con Virus de Papiloma Humano (VPH), un factor sexualmente transmisible. Las zonas en el mundo con alta incidencia de CaCu suelen presentar altos índices de Carcinoma de Pene (CaPe), sugiriendo que el CaPe también podría estar asociado a la infección viral. Los reportes a nivel mundial muestran una positividad a VPH en CaPe del 47% en promedio. En México, a pesar de ser un país con alta incidencia de CaCu, no se han realizado estudios en la contraparte masculina. En este trabajo se evaluó el posible papel del VPH en el CaPe en pacientes mexicanos. Se estudiaron 57 casos de CaPe y 10 casos de Neoplasia Intraepitelial de Pene (NIP) fijados e incluidos en parafina. Se obtuvieron datos clínicos sobre la edad, circuncisión, otras infecciones venéreas y número de parejas sexuales. Se realizó un diagnóstico histopatológico evaluando el subtipo histológico, el tipo de crecimiento, el grado de diferenciación y la morfología característica de la infección con VPH. La detección molecular del virus se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11 y HPV16-E6f/HPV16-E6r. La tipificación se realizó por secuenciación directa, los resultados se compararon contra las secuencias de VPH reportadas en GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), utilizando el programa BLAST. Se detectaron secuencias de VPH 16 en 36 de las 57 muestras de CaPe (63.2%) y en 7 de los 10 NIP (70%) estudiados. No se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la detección molecular de VPH y las variables clínicas e histopatológicas. Se plantea que existe una subdetección viral debido a la degradación del DNA de las muestras. Sin embargo, la alta positividad a VPH 16 en los pacientes con CaPe apoya fuertemente la idea de un papel etiológico del virus en el desarrollo de esta neoplasia.

Abstract

Cervical cancer has been shown to be strongly associated with Human Papillomavirus (HPV) infection. HPV is a sexually transmitted factor. Regions in the world with a high rate of cervical cancer, normally correspond with regions of high penile cancer incidence. This suggests that the latter may also be associated with the viral infection. International reports show a mean positivity to HPV in penile cancer of 47%. México is a country with high cervical cancer incidence, however, studies regarding HPV presence in the male counterpart have not been made. In this study we evaluated the prevalence of HPV in penile cancer in Mexican patients. Fifty-seven penile cancer and 10 penile intraepithelial neoplasia (PIN) formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were studied. Clinical data regarding age, circumcision, other sexually transmitted diseases and number of sexual partners was collected. We made an histopathological diagnosis evaluating histological subtype, growth pattern, degree of differentiation and HPV-related morphological features. Presence of HPV DNA was detected by the polymerase chain reaction (PCR) technique, using primers MY09/MY11 and HPV16-E6f/HPV16-E6r. Viral typing was accomplished using automated sequencing and the results were compared with Genebank sequences, using the BLAST program (<http://ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>). We detected an overall prevalence of HPV 16 DNA in 36 of 57 penile cancer specimens (63.2%) and in 7 of 10 PIN specimens (70%). No statistically significant correlations were found between HPV 16 prevalence and clinical and histopathological variables. There was a viral subdetection due to DNA degradation in the specimens. However, the high HPV 16 prevalence in this penile cancer patients supports an etiological role of this virus in penile cancer pathogenesis.

Introducción

Uno de los mayores problemas de salud de la mujer en el ámbito mundial es el cáncer cérvico-uterino (CaCu) o cáncer del cuello de la matriz. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que la frecuencia anual de mortalidad por CaCu, es de 237,000 casos ¹. En México, de acuerdo a la Secretaría de Salud, el CaCu es la neoplasia maligna con mayor incidencia (32.5%) entre la población femenina ².

Existe un virus conocido como el Virus del Papiloma Humano (VPH), que se ha visto comúnmente asociado a esta neoplasia. Los estudios más recientes, utilizando metodologías muy sensibles de detección, han confirmado una positividad a VPH en el 99.7% de los casos de CaCu ³. El VPH tiene diversos tipos, algunos de los cuales se encuentran más comúnmente asociados con el CaCu. Estos se conocen como "oncogénicos o de alto riesgo" y son, principalmente los tipos 16 y 18. Hoy en día se reconoce que la infección con tipos oncogénicos, más frecuentemente VPH 16, es el factor de riesgo más significativo en la etiología del CaCu ⁴.

El VPH se transmite por vía sexual, por lo que también es posible encontrarlo en el epitelio del pene. Existen relativamente pocos estudios en el ámbito mundial sobre el VPH en pene y su posible relación con el cáncer de este órgano.

El carcinoma de pene (CaPe) es un tumor poco frecuente en los países industrializados y representa menos del 1% de los cánceres en hombres en EUA ⁵. Sin embargo, su incidencia presenta grandes variaciones en diferentes regiones geográficas, y ciertas áreas de Brasil, India y China exhiben una alta incidencia de este mal, ocurriendo en comunidades con altos índices de CaCu ⁶. Se ha observado que las esposas de hombres con CaPe tienen más riesgo de desarrollar una neoplasia cervical y viceversa ⁷. Asimismo, un estudio realizado en España y Colombia mostró una prevalencia mayor de VPH en pene en esposos de mujeres con CaCu que en esposos de mujeres sanas ⁸.

La frecuencia de detección de VPH en CaPe varía dependiendo de la metodología utilizada y la región geográfica en estudio ⁹. Por esto resulta importante realizar estudios regionales, que permitan conocer la frecuencia de este virus en el CaPe, sobre todo en zonas de alta incidencia de cáncer cérvico-uterino.

A pesar de ser nuestro país uno de los que encabezan la lista en frecuencia de CaCu, no existen en México estudios de detección del Virus de Papiloma Humano en carcinoma de pene. Si bien la frecuencia de esta neoplasia en el país es baja, de 1.1% en nuestra población masculina ², este tipo de estudio es un paso importante para conocer más sobre el potencial de infección del VPH y las diferencias en su capacidad oncogénica en epitelios semejantes. Cuanta más información tengamos sobre estos aspectos, estaremos mejor preparados para prevenir no sólo el carcinoma de pene, sino también el cáncer cérvico-uterino que afecta tan gravemente a nuestra población femenina.

Antecedentes

a) Las Lesiones Premalignas y el Carcinoma de Pene

Lesiones Premalignas

Hoy en día se sugiere utilizar el término de Neoplasia Intraepitelial de Pene (NIP) para agrupar las lesiones pre-cancerosas. Por comparación con las Neoplasias Intraepiteliales de Cérnix (NIC), se ha propuesto que los NIP también sean divididos en grados I, II y III. Las neoplasias intraepiteliales son lesiones proliferativas que muestran maduración anormal, agrandamiento del núcleo y atipia. Las de grado I presentan una proliferación anormal de las células parabasales confinada al tercio inferior del epitelio. También se clasifican como de grado I aquellas que presenten células coilocíticas (células características de la infección con VPH), aunque no haya proliferación. Cuando la proliferación anormal abarca entre 1/3 y 2/3 del grosor del epitelio, se considera grado II, y cuando es más de 2/3, de grado III. En estas también se pueden observar coilocitos, pero menos comúnmente que en las de grado I. En el sistema Bethesda, los NIP o NIC I se llaman lesiones intraepiteliales de bajo grado y los II y III se agrupan como de alto grado, requiriendo un tratamiento diferente. El grado III también suele llamarse carcinoma *in situ* ¹⁰.

Dentro de las lesiones premalignas existe una confusión en la terminología, ya que los nombres de Eritroplasia de Queyrat y Enfermedad de Bowen se han usado anteriormente para describir lesiones que son histológicamente similares pero tienen diferentes presentaciones clínicas y conductas biológicas. La primera se presenta principalmente en el glande o prepucio en hombres de más de 50 años con forma de una placa eritematosa (rojiza). La enfermedad de Bowen suele presentarse en el cuerpo del pene, en hombres de 40 a 50 años, con forma de una placa escamosa. Estas dos lesiones en un 5 a 10% de los casos progresan a un Carcinoma de Células Escamosas (CCE) ¹¹. En la nueva terminología, estas dos lesiones son equiparables al carcinoma *in situ*.

El Carcinoma de Pene.

La gran mayoría de las neoplasias malignas de pene son carcinomas de células escamosas (CCE) abarcando aproximadamente el 95% de los casos. El 5% restante son en su mayor parte, sarcomas ¹¹.

El CCE tiene el aspecto de una lesión gris, costrosa, papular y se observa con mayor frecuencia sobre el glande o el prepucio (Fig 1). Es una lesión indolora, infiltrativa local ¹². Es de crecimiento lento, generalmente ha estado presente por más de un año antes de que el paciente solicite atención médica ¹³. En el momento del diagnóstico, casi el 25% de los pacientes presentan metástasis a ganglios linfáticos inguinales. Las metástasis distantes son hasta cierto punto poco comunes. La tasa total de supervivencia a 5 años es de 70% en promedio, cuando no hay metástasis a ganglios, en cuyo caso la tasa disminuye a un 27% ¹².

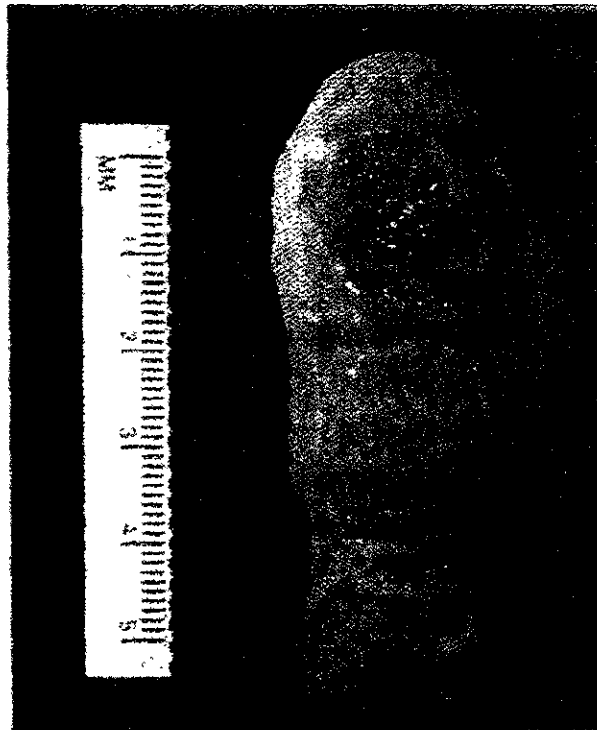


Figura 1. Carcinoma de pene. El glande está deformado por una masa dura, infiltrativa y ulcerada ¹²

A pesar de que la edad de los pacientes al momento del diagnóstico varía de los 20 a los 90 años, es raro que se presente en hombres de menos de 40 años. Sin embargo, esto pudiera estar cambiando. En un estudio en Estados Unidos en 1992, el 22% de los pacientes eran menores de 40 años ¹¹.

Por lo que se ha visto, una de las características diagnósticas más importantes de este tumor es su grado de diferenciación. De acuerdo al sistema modificado de Broders, los CCE de pene se pueden dividir en bien, moderadamente y poco diferenciados. Las lesiones bien diferenciadas muestran puentes intercelulares prominentes y masas celulares concéntricas rodeadas de queratina llamadas perlas de queratina. Las células presentan escasa atipia consistente en agrandamiento nuclear y pleomorfismo. Se pueden encontrar células en división (figuras mitóticas), pero son raras. En las lesiones moderadamente diferenciadas se observan ocasionalmente puentes intercelulares, hay pocas perlas de queratina, una atipia nuclear moderada y un incremento en la actividad mitótica. Por su parte las lesiones poco diferenciadas tienen un pleomorfismo nuclear marcado y numerosas figuras mitóticas. Se observa necrosis y no aparecen perlas de queratina. Estos tumores son en general profundamente invasivos. Los pacientes con tumores bien diferenciados tienen un pronóstico favorable y más del 80% son supervivientes a largo plazo. Aquellos pacientes con tumores poco diferenciados suelen tener un mal pronóstico ¹¹.

Según Amin *et al*¹⁴, los CCE de pene se clasifican de acuerdo a su sitio de origen, su patrón de crecimiento y su apariencia histológica:

a) Por su sitio de origen: la mayoría se originan en el epitelio escamoso de la mucosa que cubre el glande, el prepucio o el surco coronal. Los tumores de un compartimento usualmente se expanden a invadir otros.

b) Por su patrón de crecimiento:

- *De expansión superficial*. Es el más frecuente (42%) y tiene un patrón de crecimiento radial extendiéndose a varios de los compartimentos epiteliales del pene, como la mucosa del glande, el prepucio, el surco coronal y la uretra; es infiltrativo y generalmente es de poco a moderadamente diferenciado.
- *De crecimiento vertical*: De este tipo son aproximadamente el 20% de los casos. Son lesiones fungantes y ulceradas. El tumor invade profundamente el cuerpo esponjoso o el cuerpo cavernoso e incluso la uretra puede estar reemplazada o rodeada del carcinoma. Son tumores moderadamente o poco diferenciados.
- *Verruciforme*: Abarcan aproximadamente el 25% de los casos. Son tumores exofíticos con el glande como sitio de origen más común. Rara vez hay invasión profunda o metástasis y generalmente están bien diferenciados. Hay tres subtipos histológicos microscópicos distintivos: verrugoso, condilomatoso y papilar.
- *Mixto*: Del 10 al 15% de los casos tienen patrones de crecimiento múltiples o mixtos, con componentes de crecimiento vertical, expansión superficial o verruciformes.
- *Multicéntrico*: Representa hasta el 5% de los casos. Hay dos o más focos de carcinoma separados por tejido benigno, afectando más de un compartimento epitelial. Son generalmente de expansión superficial.

c) Por el subtipo histológico:

- *Carcinoma Típico*: Representa el 70% de todos los CCE de pene. La mayoría están bien o moderadamente diferenciados. Generalmente se encuentra carcinoma *in situ* o displasia en epitelio adyacente. Hay nidos de células irregulares con citoplasma eosinófilo infiltrando la lamina propia. Puede haber un componente celular con abundante citoplasma claro y glicogenado.
- *Carcinoma Basaloide*: Comprende el 10% de todos los casos, se le relaciona con VPH. Generalmente es de invasión profunda, con nidos de pequeñas células basaloideas poco diferenciadas. Normalmente tienen un patrón de crecimiento vertical. Tiene una alta frecuencia de recurrencia y metástasis a ganglios linfáticos, y un mal pronóstico.
- *Carcinoma Condilomatoso*: Son lesiones de crecimiento lento, que representan el 6% de los casos de CCE de pene, y generalmente se encuentran en el glande. Forma largas papilas y presenta células coilocíticas características de la infección con VPH.

- *Carcinoma Verrugoso*: Son carcinomas muy bien diferenciados, exofíticos y papilares que representan menos del 3% de los casos de cáncer de pene. Se presentan en el glande, y a veces en el prepucio o el surco coronal, y son de crecimiento lento. No presentan metástasis regionales o distantes.
- *Carcinoma Papilar*: Representa aproximadamente el 10% de los casos. Son carcinomas exofíticos con papilas revestidas por células atípicas sin cambios coilocíticos. Presentan márgenes infiltrantes irregulares. Las células están bien o moderadamente diferenciadas y se presentan zonas irregulares amplias de queratinización entre las papilas.
- *Carcinoma Sarcomatoide*: Son carcinomas muy poco comunes, agresivos y compuestos predominantemente por células fusiformes y a veces células gigantes. Generalmente afectan el glande y presentan recurrencias.

En cuanto a la supervivencia del paciente, aquellos que tienen tumores con sitio de origen en el prepucio tienen el mejor pronóstico, seguido por los tumores en el glande y finalmente en el surco coronal. De acuerdo a su patrón de crecimiento, los que presentan crecimiento vertical tienen el peor pronóstico, los de expansión superficial un pronóstico intermedio y los verruciformes el mejor pronóstico. En cuanto al subtipo histológico, el mejor pronóstico lo presenta el carcinoma verrugoso, seguido de cerca por los tipos condilomatoso y papilar, después viene el carcinoma típico, y por último, con el peor pronóstico, el carcinoma basaloide ¹⁴.

Existe una variedad de factores que se han visto asociados al CCE de pene, entre ellos la falta de higiene, la fimosis y la falta de circuncisión ¹¹. La fimosis es una condición en la cual el prepucio no se retrae con facilidad sobre el glande, produciendo inflamación ¹². Casi el 50% de los pacientes con carcinoma de pene presentan fimosis. La fimosis puede exacerbar la retención de esmegma (una mezcla de células epiteliales descamadas, sudor y desperdicios), el cual se piensa que puede tener un efecto irritante en el epitelio del pene, jugando así un papel importante en su carcinogénesis ¹¹.

El CCE es extremadamente raro en individuos que tradicionalmente son circuncidados en la temprana infancia, por ejemplo, los judíos. A pesar de que los datos sugieren que la circuncisión en el nacimiento provee una excelente protección contra el CaPe, aparentemente se puede obtener la misma baja incidencia en hombres no-circuncidados que practican una buena higiene ¹¹.

También se ha sugerido una etiología viral para el carcinoma de pene. El VPH se ha visto comúnmente relacionado con esta neoplasia, en particular los tipos 16 y 18 ^{11, 13}. A nivel histológico, se observan muchas veces células con una morfología típica, llamadas coilocitos, las cuales representan la expresión morfológica de la infección con VPH en las células del epitelio escamoso. Estas células presentan núcleos hipercromáticos irregulares rodeados por un halo perinuclear claro característico ¹².

En la Fig. 2 se aprecia un corte histológico de un epitelio de pene normal, una NIP y un CCE. En la NIP se pueden observar claramente los coilocitos.

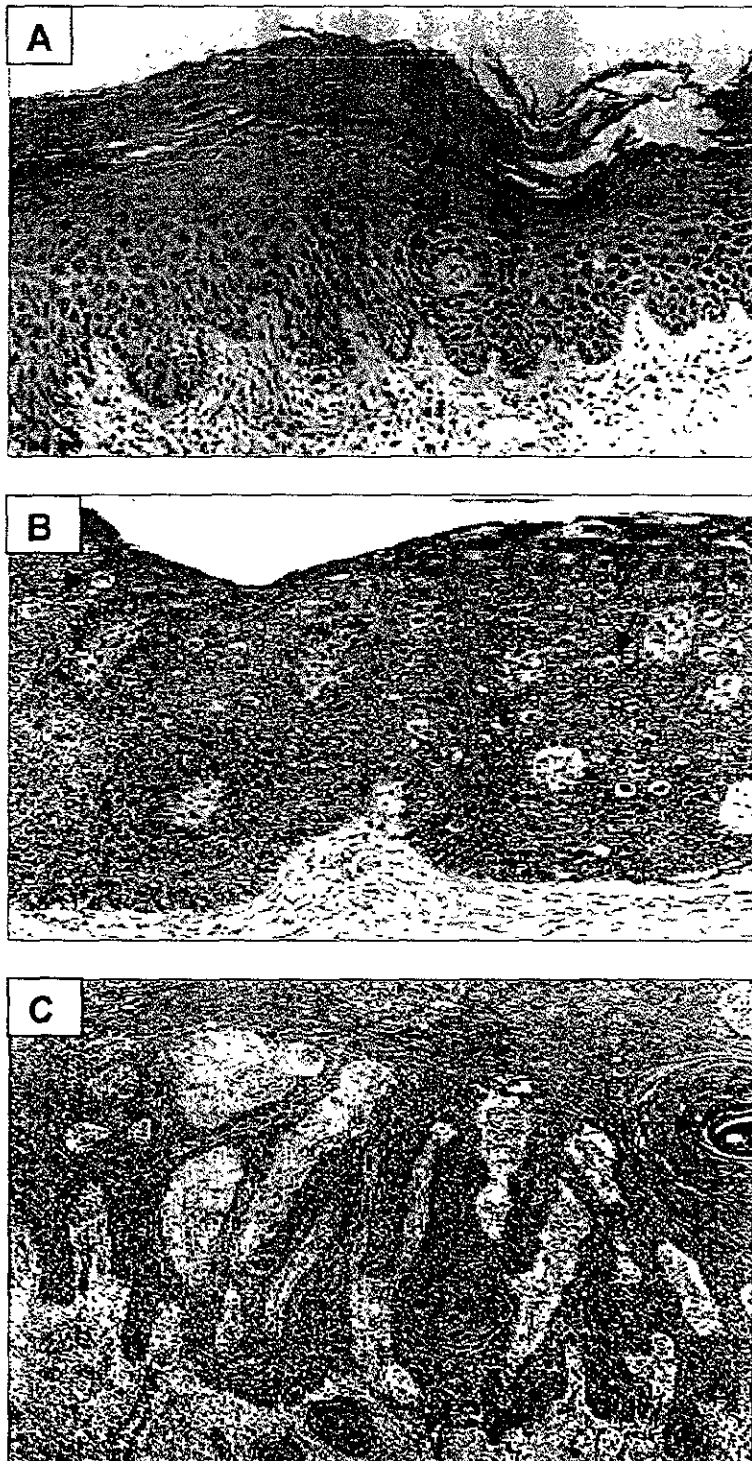
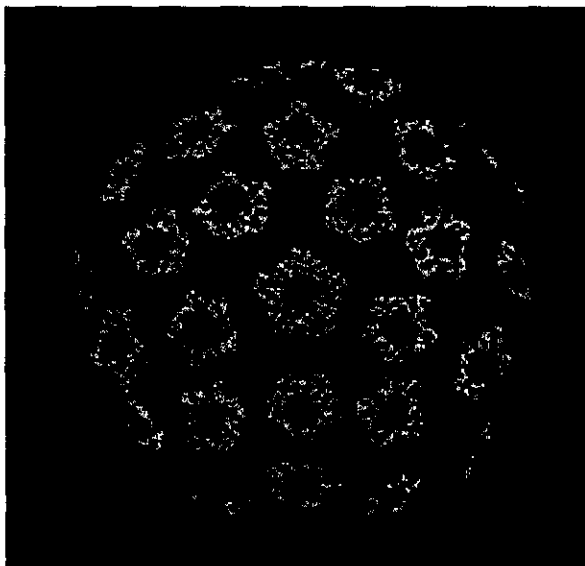


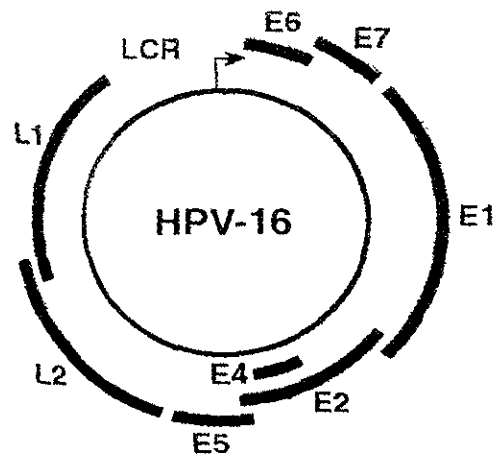
Figura 2. Cortes histológicos de A) Pene sin neoplasia. La epidermis muestra maduración normal ¹⁵. B) Neoplasia Intraepitelial de Pene III (carcinoma in situ). La membrana basal está intacta pero se observan coilocitos (flechas)¹². C) Carcinoma de pene bien diferenciado. Se ven proyecciones de células neoplásicas infiltrando la dermis y una perla de queratina a la derecha (flecha) ¹².

b) El Virus de Papiloma Humano

Los Virus del Papiloma Humano pertenecen a la subfamilia Papillomavirus, de la familia Papovaviridae¹⁶. Son epiteliotrópicos, con una doble cadena de DNA circular envuelta en una cubierta proteica llamada cápside (Fig 3 A). Su genoma se compone de dos grupos funcionales de marcos de lectura abierta, llamados tempranos (E, del inglés "Early") y tardíos (L, del inglés "Late"), que están separados por una Región Larga Control (LCR, del inglés "Long Control Region"). La región control es necesaria para la replicación viral normal y el control de la replicación de genes. Los genes E1 y E2 están implicados en la replicación viral y el control transcripcional¹⁷. La función de E4 no se conoce aun, pero se ha visto que la proteína induce un colapso de la red de citoqueratinas en el citoplasma. La proteína del gen de E5 podría estar implicada en los pasos tempranos de la infección viral. Las proteínas de E6 y E7 inhiben la actividad de reguladores negativos del ciclo celular y son importantes en la progresión a la malignidad¹⁸. Los genes de L1 y L2 codifican para proteínas estructurales¹⁷ (Fig 3 B).



A



B

Figura 3. El Virus de Papiloma Humano. A) La cápside¹⁹ B) Esquema de la distribución de los marcos de lectura abierta en el genoma de VPH 16 (E = tempranos, L = tardíos, LCR = Región Larga Control)²⁰.

Actualmente, el grupo de los Virus de Papiloma Humano comprende más de 100 tipos distintos¹⁶. El sistema de tipificación está basado en diferencias en las regiones de E6, E7 y L1. Un nuevo tipo de VPH es, por definición, homólogo en menos del 90% en estas regiones, a los tipos previamente identificados¹⁷. Los tipos de VPH asociados a lesiones anogenitales se han clasificado, de acuerdo a su presencia relativa en carcinomas invasores, como de "alto riesgo" (tipos 16, 18, 31 y 45), de "riesgo intermedio" (tipos 33,

35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68) y de "bajo riesgo" (tipos 6, 11 y otros). A los dos primeros grupos se les suele llamar tipos oncogénicos ¹⁶.

La infección viral debe ocurrir a través de una barrera epitelial dañada, puesto que sólo las células de la capa basal, los queratinocitos, pueden ser infectados por el virus. Si bien únicamente estas células indiferenciadas y en división pueden ser infectadas, la replicación viral ocurre sólo en células comprometidas a diferenciarse, es decir en células que arrestan su ciclo celular y dejan de dividirse ²⁰.

Sin embargo, el genoma de estos virus no codifica para ninguna enzima necesaria para la replicación del DNA, por lo tanto, el virus debe usar la maquinaria de replicación de la célula. Como las células en las cuales se replica el virus ya se están diferenciando, esta maquinaria deja de funcionar. De tal suerte que el VPH ha evolucionado ciertas proteínas tempranas capaces de mantener activa la maquinaria de replicación del DNA. Estas son las proteínas de E6 y E7. La principal función biológica de E6 hasta la fecha parece ser la inactivación de la proteína supresora de tumor p53. Esta proteína es mediadora en el arresto celular en respuesta a daños en el DNA y asimismo regula la muerte celular programada o apoptosis en células que han sufrido daños irreparables en su genoma ²⁰. Las proteínas E6 de VPH 16 y 18 son capaces de marcar a p53 para su degradación ¹⁷. De tal suerte que E6 es la proteína viral responsable de la inestabilidad cromosómica y la alta tasa de mutaciones que se observa en infecciones con VPH de alto riesgo durante la progresión a la malignidad ²⁰. Por su parte, E7 es capaz de formar complejos con varias proteínas celulares, incluyendo a la proteína supresora de tumor retinoblastoma (Rb). Rb en condiciones normales, inhibe el funcionamiento de algunos factores de transcripción como E2F, que están involucrados en la progresión a través del límite G1/S del ciclo celular. Cuando E7 forma un complejo con Rb, E2F deja de estar inhibido y puede mediar la activación transcripcional y la progresión a través del límite G1/S ¹⁷.

c) Estudios de detección de VPH en Carcinoma de Pene

Tradicionalmente han existido dos formas de detección del VPH: por métodos histológicos y por métodos moleculares. Los primeros eran usualmente utilizados antes del advenimiento de las técnicas de biología molecular. Sin embargo, en muchos estudios actuales se siguen realizando, ya sea como una primera aproximación o como una forma de comparar resultados obtenidos por distintos medios. Consisten en la observación de células coilocíticas, en un corte histológico o en una muestra citológica urinaria, para afirmar una infección lítica con VPH.

Los métodos moleculares son varios y han ido mejorando en sensibilidad a lo largo de los años. Comienzan a usarse en estudios de detección de VPH en pene alrededor de 1985. Típicamente distinguimos tres tipos de métodos: la detección de proteínas virales mediante el uso de anticuerpos específicos (Inmunohistoquímica); la detección del DNA viral mediante hibridaciones (Hibridación in Situ, Southern Blot) y la detección de DNA viral mediante la amplificación de secuencias virales con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última tiene la mayor sensibilidad ya que es capaz de detectar hasta una copia del genoma viral en 100 000 células ²¹.

- Estudios con métodos clínicos e histológicos.

El VPH comenzó a estudiarse, en pene, en las parejas sexuales de mujeres que mostraban señales de tener infección con VPH, por presentar condiloma acuminado (una lesión benigna comúnmente asociada a los VPH tipos 6 y 11)¹², neoplasias intraepiteliales de cérvix (NIC) y/o cáncer cérvico-uterino.

En 1984, Levine *et al*, realizaron colposcopia, biopsias y citología urinaria en 34 hombres cuyas parejas sexuales presentaban condiloma o NIC. Encontraron lesiones externas en 18 (53%) de los examinados por colposcopia, y recalcaron la importancia de un examen clínico profundo para la detección de pequeñas lesiones posiblemente asociadas a VPH en el pene²².

Sedlacek *et al*, en 1986 realizaron colposcopias y biopsias en pene, así como citologías urinarias en 51 pacientes cuyas parejas sexuales presentaban condiloma. De ellos, 45 (88.2%) presentaron evidencias histológicas de condiloma de pene, después de la revisión completa, si bien a simple vista sólo 8 parecían presentar lesiones²³.

También en ese año, Sand *et al*, utilizaron la misma técnica para estudiar a 90 hombres cuyas parejas presentaban condiloma, encontrando inicialmente un 59% de condilomas en ellos. Sin embargo, al hacer una reevaluación, con ayuda de biopsias, el porcentaje aumentó a 69%²⁴.

Estos estudios comenzaron a mostrar la importancia de un examen completo y minucioso, utilizando colposcopia y analizando biopsias histológicamente para la detección de lesiones en pene. Asimismo, evidenciaron la necesidad de buscar metodologías más sensibles y confiables para afirmar una infección con VPH.

Por su parte, Krebs y Schneider en 1987, estudiaron mediante colposcopia, citología e histología, a 127 hombres cuyas parejas presentaban NIC de diferentes grados; encontrando que 83 de ellos (65%) presentaban lesiones asociadas a VPH. Sin embargo, las lesiones en cada uno de los sujetos y en su pareja respectiva, diferían clínica e histológicamente en muchos de los casos. Estas diferencias podrían ser explicadas en términos de infecciones con diferentes tipos de VPH así como múltiple infección viral²⁵.

Ya más recientemente, a pesar de existir métodos moleculares, Maymon *et al*, en 1995, examinaron por colposcopia y biopsia (cuando fue necesario), a 63 hombres que eran la pareja sexual regular de mujeres infectadas con VPH. Todos pertenecían a una población judía, y por lo tanto tenían circuncisión neonatal. Quince (24%) presentaron evidencias histológicas de condiloma, mas ninguno presentó lesiones premalignas o malignas. Como explicación, sugieren un efecto protector de la circuncisión, la posible existencia de otros tipos virales en la población judía o ciertos factores socioeconómicos que podrían limitar la diseminación de enfermedades de transmisión sexual²⁶.

- Estudios con técnicas moleculares.

Como se mencionó anteriormente, la frecuencia de detección de VPH varía dependiendo de la zona geográfica en estudio. En 1986, McCance *et al*, estudiaron 53 carcinomas de pene en Brasil, en una comunidad con alta incidencia de este mal; detectando el VPH 16 en el 49% (26/53) de los casos y VPH 18 en el 9% (5/53), utilizando la metodología de hibridación de tipo Southern Blot. Ellos sugieren una posible subdetección debido a la pequeña cantidad de tejido examinado, y proponen que VPH tiene un papel importante en la etiología del CaPe ²⁷.

En otro reporte de Brasil, Levi *et al*, estudiaron 84 muestras fijadas en parafina y 50 muestras en fresco (40 de las cuales correspondían a algunas de las fijadas en parafina) de carcinoma de pene para determinar la presencia y tipo de VPH. En este estudio, se utilizaron oligonucleótidos (primers) para la región E6 de VPH 6, 11, 16 y 18. El 76.1% (64/84) de los tumores incluidos en parafina y todas las muestras en fresco fueron amplificables por PCR. El 28% (18/64) de los tumores en parafina y el 56% (47/84) de los tumores en fresco fueron positivos para VPH. El tipo 16 fue el más frecuente con un 14% (9/64) de positividad para muestras en parafina y un 28% (16/50) para muestras en fresco. Concluyen que existen dos diferentes etiologías para los CaPe, una resultante de las lesiones causadas por VPH de alto riesgo y otra debida a mecanismos independientes a la infección con este virus ⁹.

Uganda es otra de las regiones en el mundo con una alta incidencia de CaPe y CaCu. En 1992, Tornesello *et al*, estudiaron 13 biopsias en fresco de carcinoma de pene. Buscaron DNA de VPH mediante análisis de tipo dot/Southern blot así como por PCR de secuencias altamente conservadas de DNA en muchos tipos de VPH (región L1 común a todos los tipos y región E6 de VPH 6, 11, 16 y 18). Ellos encontraron secuencias virales en todas las muestras. Por dot-blot encontraron VPH 16 en 31% (4/13) y por PCR este mismo tipo viral en 62% (8/13). Los datos sugieren un posible papel del VPH en CaPe en esta región con alta prevalencia de la neoplasia ²⁸.

Iwasawa *et al*, en 1992, analizaron 123 muestras en parafina de carcinomas de pene, obtenidas desde 1967 hasta 1990 de hospitales japoneses. Utilizando PCR detectaron el VPH 16 en 68 de las 111 muestras no tratadas por radiación o quimioterapia (61%), y el VPH 18 en dos (1.8%) de éstas. Hicieron hibridación *in situ* (HIS) para los casos que resultaron positivos a VPH por PCR y encontraron sólo un 6.8% (6/70) de positividad. Sus resultados revelan una mayor sensibilidad de la PCR sobre la HIS. Dentro de las muestras que resultaron positivas, el VPH 16 prevaleció en el 97.2% de los casos, por lo que proponen que este tipo viral bien puede estar involucrado en la etiología del CaPe ²¹.

Uno de los pocos estudios comparados que existen es el realizado por Castellsague *et al*, en Colombia y España. El primero es un país con zonas de alta incidencia de CaCu, en tanto que el segundo presenta baja incidencia de esta neoplasia. Analizaron la prevalencia de DNA de VPH en pene en esposos de mujeres con y sin neoplasias cervicales, utilizando un kit comercial (Virapap) y PCR con primers generales para L1 (MY09/11). El

estudio mostró que hay 8 veces más incidencia de cáncer cervicouterino 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 sí en España. Además encontraron que la promiscuidad sexual (número de parejas sexuales y relaciones sexuales con prostitutas) es el factor de riesgo más importante para las infecciones peniles con VPH⁸.

Existe otro estudio amplio de detección de VPH en pene en el cual también se busca la correlación con la pareja sexual femenina. Aynaud *et al* en 1994, en Francia, estudiaron biopsias de 92 pacientes que presentaban lesiones que sugerían NIP de diferentes grados y obtuvieron información de sus parejas sexuales. Los resultados histológicos confirmaron NIP en el 93% de los casos. Los resultados para la detección de secuencias de VPH, obtenidos por Southern Blot, mostraron VPH de alto riesgo en 59 de las 67 lesiones analizadas (88%). En el 60% de los casos positivos (35/59) se trataba de un VPH de alto riesgo (16, 18, 33). El VPH 16 se encontró en 43% (29/67) del total de casos analizados. Pudieron relacionar el grado de NIP en los sujetos contra el grado de NIC en sus parejas. Sus datos apoyan la idea de la transmisión sexual y del potencial neoplásico de los VPH oncogénicos. Su estudio también hizo énfasis en otra característica importante del CaPe, la circuncisión. Encontraron que aunque no existe una diferencia significativa entre la frecuencia de lesiones asociadas a VPH y en hombres circuncidados y no circuncidados; sí había una frecuencia significativamente mayor de NIP en hombres no circuncidados²⁹.

Uno de los problemas que presenta el estudio de VPH en pene es la dificultad de obtener muestras de pacientes aparentemente sanos, que contengan la cantidad de tejido necesaria para realizar las metodologías de detección apropiadamente. Una fuente, si bien escasa, de estas muestras, son las circuncisiones de hombres adultos debidas a causas ajenas a lesiones neoplásicas. Varma *et al*, en 1990, en Estados Unidos, 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 aparente condiloma, displasia o carcinoma. Realizaron PCR con primers para E6 de VPH 16 (fragmento de 110 pb) y 6/11 (478 pb). Además usaron HIS con sondas para VPH 16, 18, 6/11 y 31/33/35. Detectaron VPH 16 en 65% (15/23), VPH 31/33/35 en 13% (3/23) y VPH 6/11 en 9% (2/23) de los casos de CCE, siendo todos los controles negativos para VPH. Esto les sugiere que el CaPe, como el CaCu, está relacionado con el VPH de transmisión sexual³⁰.

Por su parte, Cupp *et al* en 1995, en EUA, obtienen muestras en parafina de CaPe, carcinoma *in situ*, NIP y prepucios de circuncisiones en adultos. Realizan PCR con primers específicos para E6 de VPH 16 (243 pb) y VPH 18, así como con primers generales para L1 (MY09/11). Encuentran VPH en 55% (23/42) de los casos de CaPe, en 92% (12/13) de los carcinoma *in situ*, en 92% (11/12) de las NIP y en 9% (3/32) de las circuncisiones en adultos. Siendo VPH 16 el más frecuente con un 40% (17/42) en CaPe, un 84% (11/13) en carcinoma *in situ*, un 75% (9/12) en NIP. Concluyen que debido a la diferencia significativa de infección con VPH entre los tejidos sanos y los neoplásicos, se sostiene un papel etiológico para el VPH en la patogénesis del CaPe³¹.

Como se mencionó anteriormente, los tumores de pene presentan una clasificación de acuerdo a su subtipo histológico. Se han hecho estudios en muestras de diferentes subtipos histológicos, buscando una posible correlación con diversos tipos virales. Sarkar *et al*, en 1992 utilizaron PCR con primers para E6-E7 e hibridación dot-blot para detectar VPH 6/11 (fragmento de 157 pb), 16 (98 pb) y 18 (80 pb) en muestras en parafina de un hospital en Estados Unidos. Quince eran carcinomas *in situ* (7 bowenoides y 8 no-bowenoides), 11 carcinomas escamosos invasivos, 1 carcinoma verrugoso, y cuatro de otro tipo de lesiones de pene. Encontraron VPH 16 en los 7 carcinomas bowenoides y en 9/11 carcinomas escamosos. Sus resultados confirman que las formas bowenoides de NIP y la mayoría de los CCE de pene contienen VPH 16 ³².

El carcinoma verrugoso de pene es un subtipo raro, en 1994 Fukunaga *et al*, estudiaron un caso de esta neoplasia, buscando DNA de VPH mediante hibridación *in situ* con sondas para 6/11, 16/18 y 31/33/51, siendo todas negativas. Además mediante inmunohistoquímicas intentaron detectar antígenos de la cápside, siendo también negativos los resultados. Sugieren la realización de más estudios para confirmar la ausencia de VPH en carcinomas verrugosos ³³.

Otro subtipo poco común es el carcinoma de células escamosas basaloides. Cubilla *et al*, en 1998, analizaron 20 casos de CaPe con esta histología. Utilizaron PCR para buscar DNA de VPH en 11 de los casos (9 provenientes de Nueva York y 2 de Paraguay) y encontraron VPH 16 en 9 de ellos (8 de Nueva York y uno de Paraguay). Los autores plantean que este tipo de neoplasia, que suele tener un mal pronóstico, se encuentra más frecuentemente asociada con VPH ³⁴.

La integración de las secuencias virales en el genoma del hospedero es un fenómeno ampliamente reconocido de VPH 16 y 18, comúnmente asociado con el carcinoma de cérvix. La integración de estos tipos virales representa un paso importante en el proceso de la carcinogénesis cervical ³⁵. En este contexto, Scinicariello *et al*, 1992 mediante las técnicas de Southern Blot y geles de electroforesis en doble dimensión estudiaron DNA proveniente de un carcinoma de pene y sus metástasis a ganglios linfáticos. Encontraron que el DNA del tumor primario y sus metástasis contenía VPH 16 integrado en el genoma del hospedero, muy probablemente siendo el gen L2 del virus el que sufrió la ruptura. Estos hallazgos proveen evidencia de un papel causal de VPH en el carcinoma de pene ³⁶.

Por último, se ha sugerido también que otras infecciones virales podrían estar asociadas con la infección con VPH y la carcinogénesis en el pene. Poblet *et al*, en 1999, estudiaron dos casos de CCE de pene de pacientes infectados con VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana). Utilizando PCR, uno resultó positivo para VPH 16 y el otro amplificó una región común a los tipos 6 y 11. Sus resultados sugieren una interacción sinérgica de ambos virus en el proceso carcinogénico de algunos CaPe ³⁷.

Todos estos estudios indican que el VPH con mayor presencia en el CaPe es el tipo 16. Debido a su alta incidencia en esta neoplasia, podría tener un papel potencial en la génesis del CaPe. Sin embargo, también vemos que la tasa de incidencia del virus varía de acuerdo a las zonas geográficas, a los métodos utilizados para su detección y a los subtipos histológicos de los que se trate. Además, en varios estudios, se comprueba una

asociación entre las infecciones con VPH en las mujeres y en sus parejas sexuales, señalando la importancia de detectar VPH en pene en zonas con altos índices de CaCu. Por último, ciertos factores clínicos como la falta de circuncisión, el número de parejas sexuales y la presencia de otras infecciones de transmisión sexual se asocian con la presencia del virus en las lesiones del pene.

Planteamiento del Problema

A pesar de la gran incidencia de CaCu en nuestro país, no existen actualmente estudios de detección de VPH en carcinoma de pene en pacientes mexicanos. Es prioritario realizar un estudio de este tipo por dos razones: La alta tasa de CaCu en México indica que hay gran cantidad de mujeres infectadas con VPH, que pueden contagiar a sus parejas sexuales. Si el VPH también tiene un papel en la carcinogénesis del pene, estos hombres son una población con alto riesgo de desarrollar la neoplasia. Por otra parte, si en las lesiones premalignas y el carcinoma de pene de pacientes mexicanos, se encuentra el virus, ellos podrían estar jugando un papel de portadores y diseminadores de VPH, poniendo en riesgo a las mujeres con las que mantienen relaciones sexuales.

Por lo anterior, se llevó a cabo un estudio en pacientes mexicanos para la detección de VPH, en particular el tipo 16, en el CaPe. Asimismo se buscó una correlación entre la presencia del virus y ciertas variables. Se utilizaron cuatro variables clínicas: la edad, la circuncisión, otras enfermedades de transmisión sexual y el número de parejas sexuales; y cuatro variables histopatológicas: el subtipo histológico, el tipo de crecimiento, el grado de diferenciación y la morfología típica de infección con VPH. Pretendiendo conocer si alguna se asociaba con la infección de VPH en nuestros pacientes.

En este trabajo se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La alta sensibilidad de esta metodología permite obtener datos muy confiables. Además, por ser rápida y eficiente se logra analizar un mayor número de muestras en menor tiempo.

Objetivos e hipótesis

a) Objetivo general

Estudiar el posible papel del VPH como factor etiológico en el carcinoma de pene en pacientes mexicanos.

b) Objetivos particulares

- Detectar, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, la presencia de DNA del Virus del Papiloma Humano en tejido incluido en parafina, de muestras de carcinoma de pene en derechohabientes del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.
- Correlacionar cuatro variables clínicas: edad, circuncisión, otras infecciones venéreas y número de parejas sexuales; y cuatro histopatológicas: subtipo histológico, tipo de crecimiento, grado de diferenciación y morfología típica de la infección, con la presencia de DNA de Virus del Papiloma Humano en Carcinoma de Pene.
- Comparar la incidencia de VPH tipo 16 en Carcinoma de Pene en México con la reportada para otros países del mundo.

c) Hipótesis

Con base en lo reportado en la literatura, se espera que la frecuencia de VPH en el Carcinoma de Pene sea mayor al 50%.

Materiales y Métodos

a) Obtención de muestras

Se obtuvieron 57 muestras de carcinoma de pene fijadas e incluidas en parafina, de los años 1989 a 2000. Para diez de estos casos, se contó además con una muestra de NIP de alto grado. Todas las muestras provinieron del archivo del Departamento de Patología del Hospital de Oncología, CMN, SXXI-IMSS. Las laminillas correspondientes a cada bloque fueron seleccionadas por la patóloga Dra. Isabel Alvarado para valorar que las muestras fueran representativas del tumor o de la lesión premaligna. Asimismo, ella llevó a cabo la observación para determinar las variables histopatológicas de las lesiones: tipo histológico, tipo de crecimiento y grado de diferenciación (para CaPe solamente), así como la morfología característica de infección con VPH (para CaPe y NIP). También fue posible contar con la información concerniente a las siguientes variables clínicas: edad, circuncisión, otras infecciones venéreas y número de parejas sexuales.

b) Extracción del DNA.

Siguiendo las técnicas descritas por Ausubel ³⁸, para cada muestra, dos cortes de tejido de 15 µm cada uno se desparafinaron en dos baños de xilol y se rehidrataron a través de un tren de alcoholes al 100, 90, 70 y 30%, y finalmente en agua bidestilada. Se recolectó el tejido y se depositó en un tubo eppendorf que contenía 500 µl de amortiguador de digestión (100mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS y 0.1 mg/ml de proteinasa K) a 50 °C por 48 horas, para permitir la liberación del DNA. Posteriormente se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), que arrastra las proteínas y otros componentes celulares, se agitó vigorosamente y se centrifugó por 5 minutos. Con una micropipeta se removió la fase superior acuosa que contiene el DNA y se transfirió a otro tubo, en el que se repitió el lavado con la mezcla fenólica. La precipitación del DNA se obtuvo agregando 1/10 de volumen de acetato de amonio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándolo a -20 °C durante 12 horas para lograr una mejor precipitación. Se centrifugó a alta velocidad por 15 minutos para empastillar el DNA y se removió el sobrenadante con una pipeta. Se agregó 1 ml de etanol al 70%, se invirtió el tubo varias veces y se centrifugó a alta velocidad durante 15 minutos. Se removió el sobrenadante con una pipeta, permitiéndose la evaporación total del etanol antes de resuspender la muestra en 100 µl de agua bidestilada estéril. El DNA se conservó a 4°C.

c) Amplificación de la región del VPH por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la detección de secuencias virales mediante PCR, se utilizó un kit de *Taq DNA polimerase* (Promega) y, en reacciones separadas, dos juegos de oligonucleótidos: Los MY11/MY09 que amplifican la región conservada L1 de 450 pares

de bases de 20 tipos de VPH involucrados en epitelio anogenital (nucleótidos 6722-7170 de VPH 6 y regiones correspondientes de los otros tipos genitales)³⁹ y los E6-VPH16f/E6-VPH16r, que amplifican una región de 126 pb del gen E6 específica para VPH 16⁴⁰ (nucleótidos 110 a 235). La secuencia de los primers utilizados se puede ver en la Tabla 1A. Cada reacción se llevó a cabo con 400 nanogramos de DNA en 50 μ l de solución conteniendo amortiguador 1x (10x: 500mM KCl, 100mM Tris- HCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 unidades de Taq Polimerasa y 50 pmol de cada oligonucleótido³⁸. La PCR se llevó a cabo en un termociclador MJ Research Minicycler, con las siguientes especificaciones: desnaturalización a 94°C por 3 minutos, abrir cadenas a 94°C por 30 segundos, alineamiento de iniciadores (oligonucleótidos) a 55°C por 1.5 minutos, elongación a 72°C por 1.5 minutos, repetir por 40 ciclos, terminar elongación a 72°C por 7 minutos y llevar a 4°C^{38, 40}. Posteriormente se realizó una electroforesis con 5 μ l del producto de cada reacción, en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio⁴¹. El gel se analizó con el equipo EagleEye 2 Stratagene.

Controles:

Se utilizó como control positivo DNA de las líneas celulares cervicales CasKi y Hela. La primera presenta VPH tipo 16 y la segunda VPH 18. Como control negativo, se usó DNA de la línea celular cervical C33 que no contiene VPH, así como DNA de leucocitos. Como controles internos, para demostrar que el DNA era amplificable, se utilizaron dos juegos de primers, uno para amplificar un fragmento de 255 pb del gen de β -actina y otro para amplificar un fragmento de 160 pb del gen *ret* (Tabla 1 B).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados

A. Para la detección de VPH

Nombre	Secuencia	Amplificado
MY11 (+)	5' -GCMCAGGGWCATAAYAATGG- 3'	450 pb
MY09 (-)	5' -CGTCCMARRGGAWACTGATC- 3'	
E6VPH16f	5' -CAGGACCCACAGGAGCGACCC- 3'	126pb
E6VPH16r	5' -GTCATATACCTCACGTCGCAG- 3'	

Clave: M = A/C, R = A/G, W = A/T, Y = C/T

B. Para los controles internos

Nombre	Secuencia	Amplificado
b-actina 1	5' -TGAAGTCTGACGTGGACATC- 3'	255 pb
b-actina 2	5' -ACTCGTCATACTCCTGCTTG -3'	
ret11 f	5' -CATGAGGCCGAGCATACTCAGCC- 3'	160 pb
ret11 r	5' -CAGACAGCAGCGCCGAGACGATG- 3'	

d) Secuenciación

Se purificó el producto de la PCR mediante el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Molecular Biochemicals), el cual se lleva no sólo las impurezas como sales, nucleótidos y proteínas, sino también cualquier fragmento de DNA de menos de 100 pb, es decir, elimina los residuos de primers, dejando sólo el DNA amplificado. Se realizó una PCR especial de marcaje, para preparar el amplificado para el secuenciador. Se utilizó el *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems) y el primer forward (MY11 ó E6-VPH16f) únicamente. Se usaron las condiciones de reacción indicadas en el kit: 8 µl de Terminator Ready Reaction Mix, 1-3 ng del producto de 126 pb ó 3-10 ng del producto de 450 pb de PCR, 3.2 pmol del primer y agua deionizada para alcanzar los 20 µl. La PCR se llevó a cabo en un termociclador DNA Thermal Cycler 480, con las siguientes especificaciones: desnaturalización a 95°C por 3 minutos, abrir cadenas a 95°C por 30 segundos, alineamiento de primer a 55°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 45 segundos, repetir por 25 ciclos, terminar elongación a 72°C por 7 minutos y llevar a 4°C. Posteriormente las muestras fueron purificadas usando las columnas Centri-Sep (Princeton Separations), liofilizadas y llevadas a procesar al secuenciador automático Applied Biosystems 373.

e) Tipificación

Las secuencias fueron comparadas contra las reportadas para los distintos tipos de VPH en GeneBank a través del programa BLAST, en la dirección electrónica:

<http://ncbi.nlm.nih.Gov/PubMed/gov/gorf/gorf.html>

f) Análisis estadístico

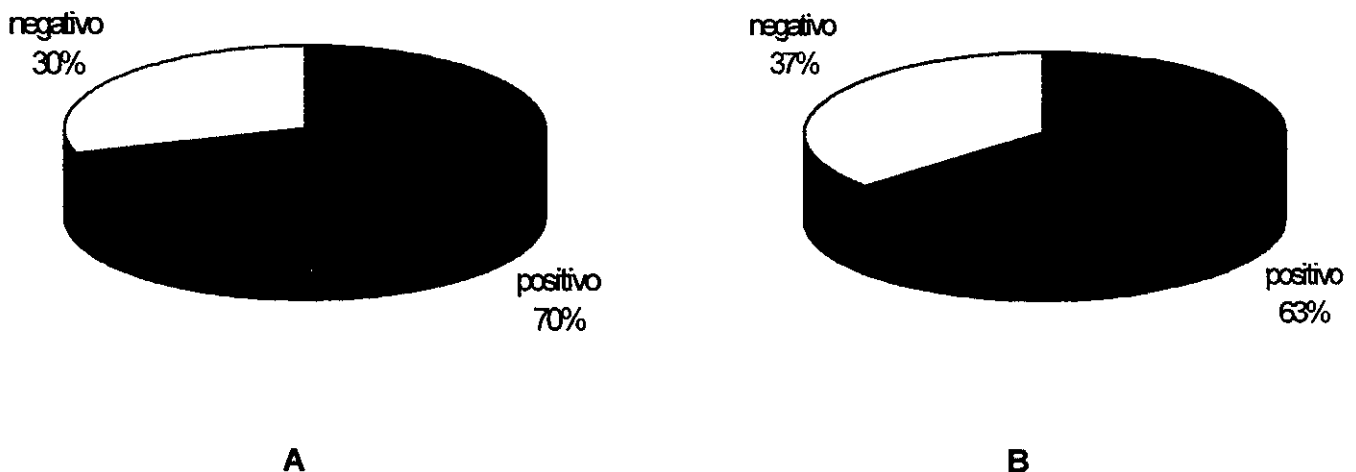
Con el apoyo de la Dra. Dulce Ma. Hernández se llevó a cabo el análisis estadístico, realizándose una prueba de X^2 para buscar una posible correlación entre la presencia/ausencia de DNA de VPH tipo 16 y las variables clínico-histopatológicas.

Resultados

Los 57 casos de CaPe y los 10 casos de NIP fueron analizados por la técnica de PCR así como histopatológicamente, en un estudio de doble ciego. Paralelamente se recabaron los datos clínicos de los pacientes. Posteriormente se realizaron los análisis estadísticos de correlación.

a) Datos moleculares: PCR y Secuenciación

Las muestras de CaPe y NIP fueron sometidas a amplificación con primers para β -actina (255 pb). Sólo el 15% (10/67) resultaron amplificables, perteneciendo todas a casos de CaPe. Estas 10 muestras fueron sometidas a PCR para detectar VPH con los primers MY09/11 (450 pb) y sólo 3 (30%) resultaron positivas. Al observar la calidad del DNA, se decidió probar con otros oligonucleótidos que amplificaran fragmentos más pequeños. Las 67 muestras fueron sometidas a amplificación para un fragmento del gen celular *ret* (160 pb). Todas las muestras resultaron positivas. Posteriormente todas se sometieron a PCR con los primers E6VPH16f/r (126 pb), para detectar VPH 16. Con estos primers se obtuvo la amplificación del DNA viral en 36 de las 57 muestras de CaPe, es decir un 63.2% (IC 95% 49.30 –75.24) y en el 70% (7/10) de las lesiones premalignas (Fig. 4). Las tres muestras positivas con los oligonucleótidos MY09/11, también resultaron positivas con los E6-VPH16f/r. Las figuras 5 y 6 muestran los geles con las amplificaciones obtenidas para los primers de B-actina y MY09/11, y para los de *ret* y E6VPH16f/r, respectivamente. En la figura 7 se presenta una comparación de la amplificación con los diferentes primers, mostrando también la calidad del DNA.



**Figura 4. Detección molecular de VPH 16 en las muestras.
A. NIP (n=10) y B. CaPe (n=57)**

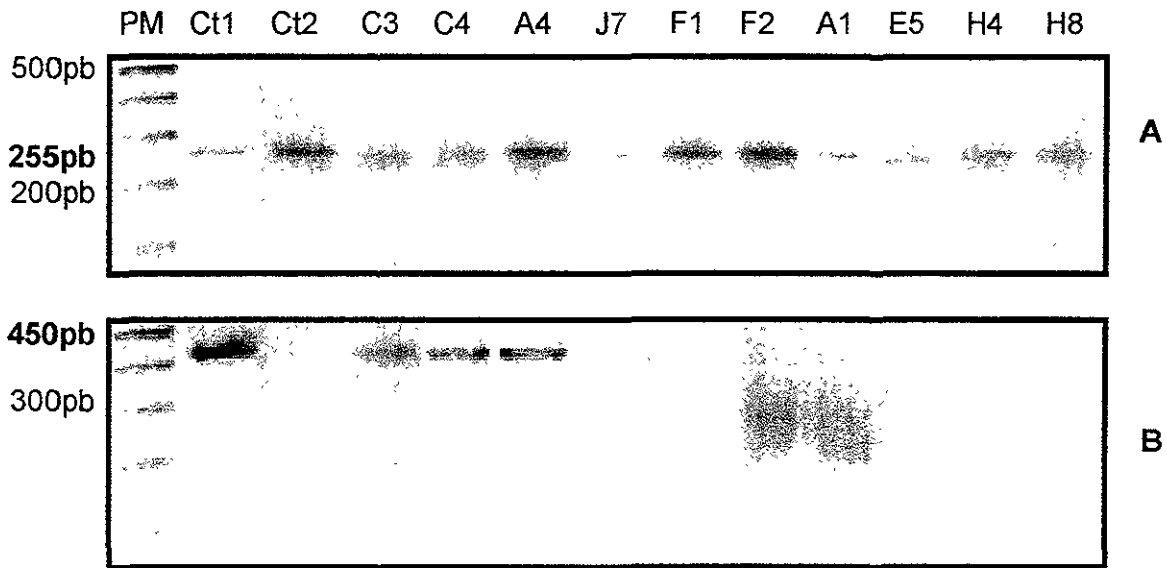


Figura 5. A. Amplificación del control interno de β -actina de 255 pb . B. Detección de secuencias virales por PCR para los primers MY09/11 (región de 450 pb del gen L1 común a varios tipos de VPH). Ct1: Control positivo, DNA de HeLa (VPH 18); Ct2: Control negativo, DNA de leucocitos.

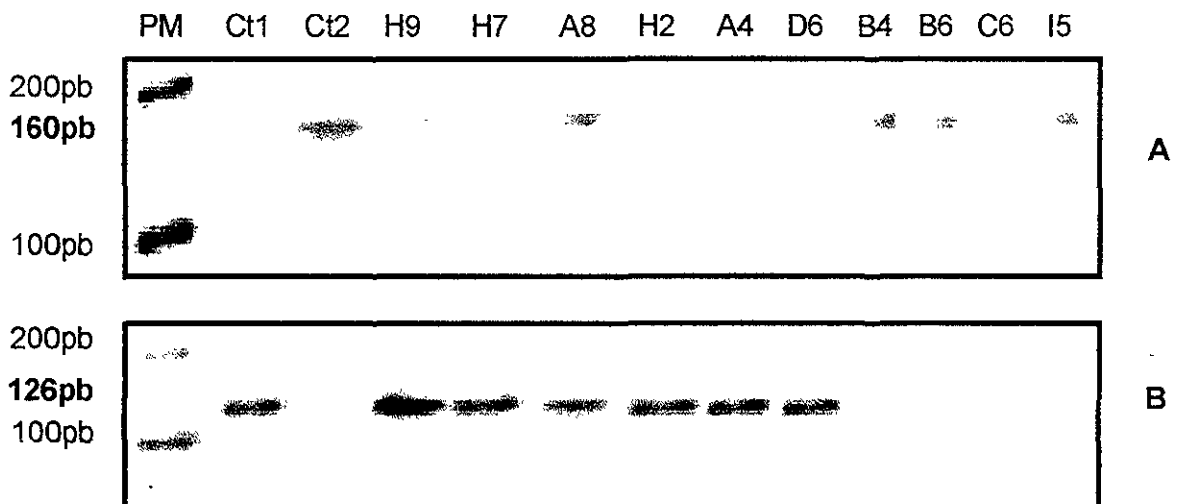


Figura 6. A. Amplificación del control interno del gen *ref* de 160 pb. B. Detección de secuencias virales por PCR para los primers E6VPH16f/r (región de 126 pb del gen E6 de VPH 16). Ct1: Control positivo, DNA de CasKi (VPH 16); Ct2: Control negativo, DNA de leucocitos.

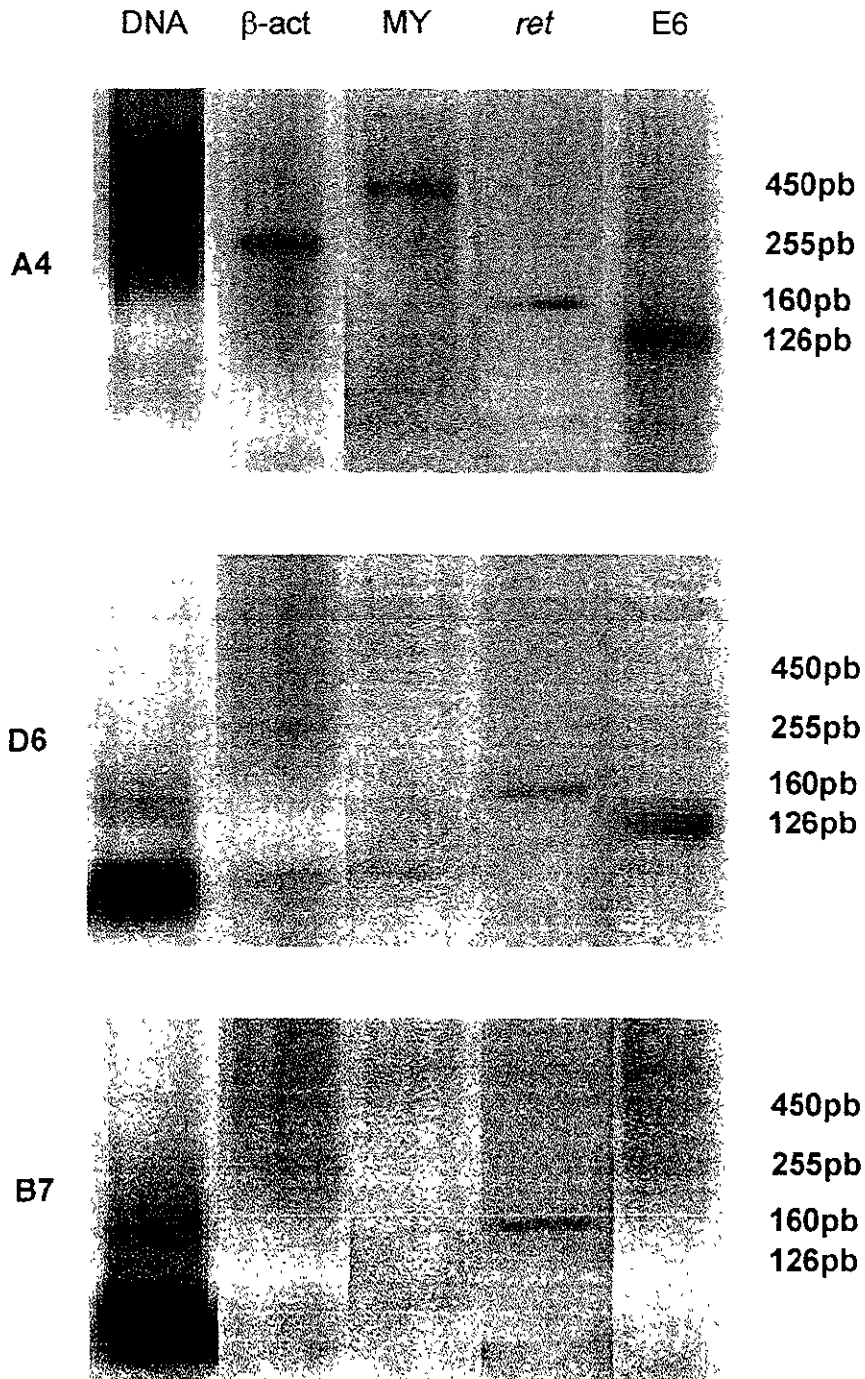


Figura 7. Comparación de la calidad del DNA. Las amplificaciones logradas en tres muestras de CaPe: A4 positiva para MY09/11 y E6VPH16f/r, donde ambos controles internos amplifican; D6 positiva para *ref* y E6VPH16f/r, pero negativa para β -actina y MY09/11; y B7 negativa para VPH con ambos primers, pero donde se logra la amplificación del control de *ref*.

Al llevar a secuenciar las tres muestras positivas para los primers MY, se confirmó comparando en GeneBank la secuencia obtenida, que se trataba del VPH tipo 16. Asimismo, otras cinco muestras aleatoriamente elegidas que resultaron positivas para los oligonucleótidos E6-VPH16 se llevaron a secuenciar y se comparó la secuencia en Genebank, observando que se trataba de VPH tipo 16 en los cinco casos y asegurándonos así de la especificidad de este juego de primers (Fig. 8).

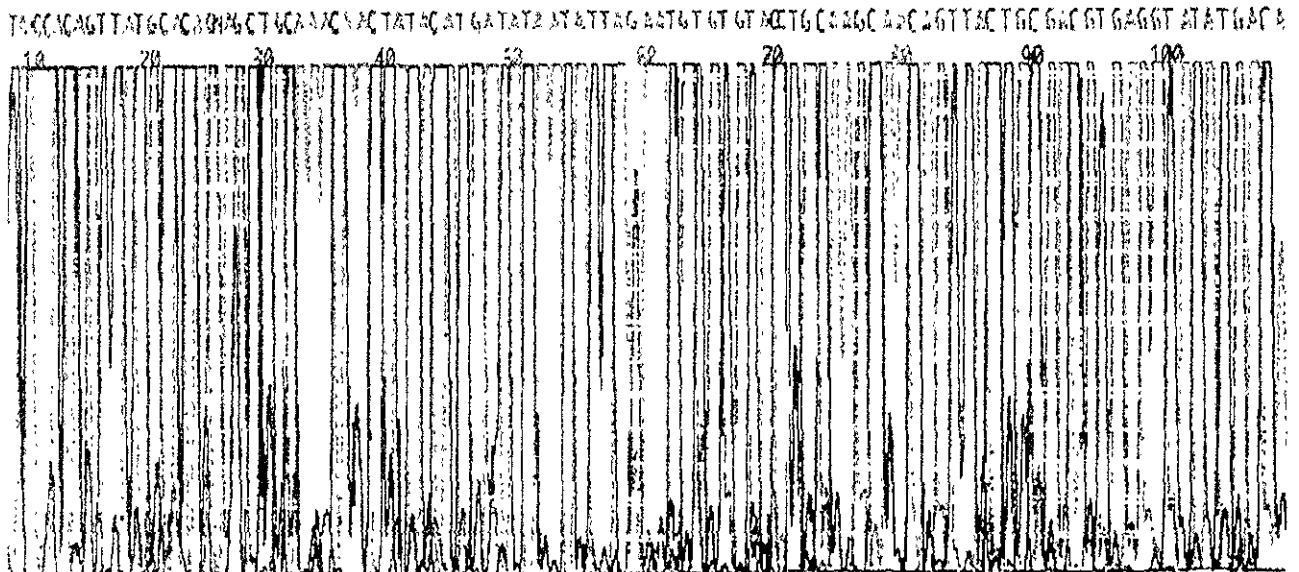


Figura 8. Secuencia de la región amplificada de E6 de VPH 16 (correspondiente a los nucleótidos 110-235), utilizando los oligonucleótidos específicos.

b) Datos clínicos e histopatológicos

Debido a la falta de datos en el expediente o la imposibilidad de hallar dicho expediente, la información clínica para muchos de los pacientes no se encontró completa.

Con los datos recabados se observó que la edad de los pacientes fluctuó entre los 24 y los 94 años de edad, siendo la media 63.5 años. El 7% (4/57) eran menores de 40 años al momento del diagnóstico, en tanto que el 38.6% (22/57) se encontraban entre 41 y 65 años de edad y el 43.8% (25/57) eran mayores de 65 años. En el 10.5% (6/57) de los pacientes no fue posible obtener esta información (Fig. 9). El mayor número de casos de CaPe se encontró en la década de los 60 y en la de los 80, con 11 casos cada una.

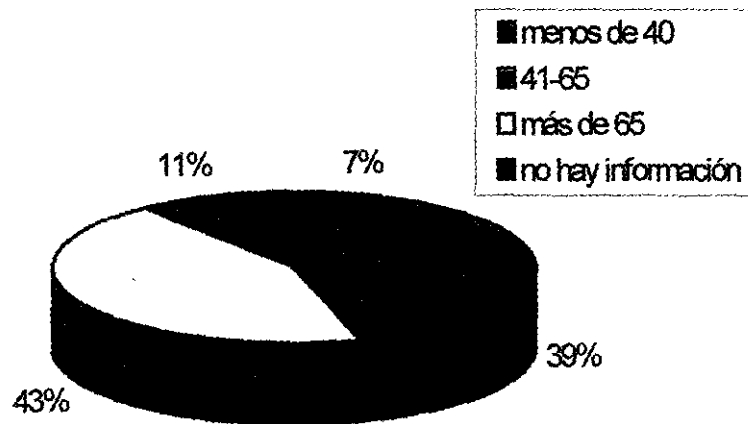


Figura 9. Edades en los pacientes con CaPe (n=57)

Para el caso de la circuncisión en los pacientes, el 63.1% (36/57) no la presentaron. Los tres pacientes que sí la presentaron (5.2%) expresaron que les había sido efectuada tardíamente, ya en su vida adulta. Para el resto de los casos no se contó con esta información (Fig. 10).

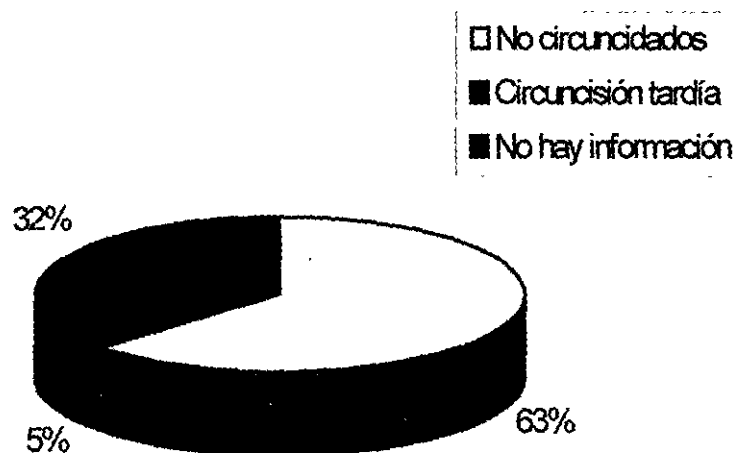


Figura 10. Circuncisión en los pacientes con CaPe (n=57)

En cuanto a otras infecciones en el pene, el 59.6% (34/57) no las presentó, un 7% (4/57) presentó gonorrea, un paciente reportó sífilis (1.7%), otro una infección previa con VPH (1.7%) y para el resto (29.8%, 17/57) no se pudo obtener la información (Fig.11).

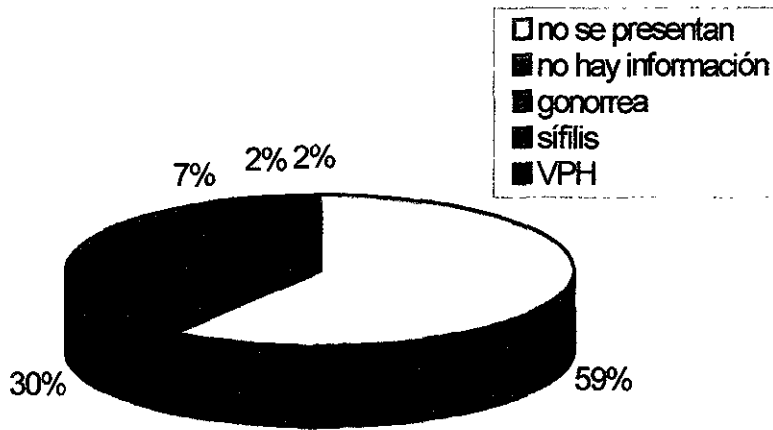


Figura 11. Presencia de otras infecciones en los pacientes con CaPe (n=57)

La variable para la cual menos información se obtuvo fue la del número de parejas sexuales. Un paciente reportó una sola pareja sexual (1.7%), siete reportaron haber tenido 2 (12.3%), quince reportaron de 3 a 6 parejas sexuales (26.3%) y dos pacientes dijeron haber tenido más de 6 (3.5%). Para el 56.1% (32/57) de los casos no existieron datos (Fig. 12).

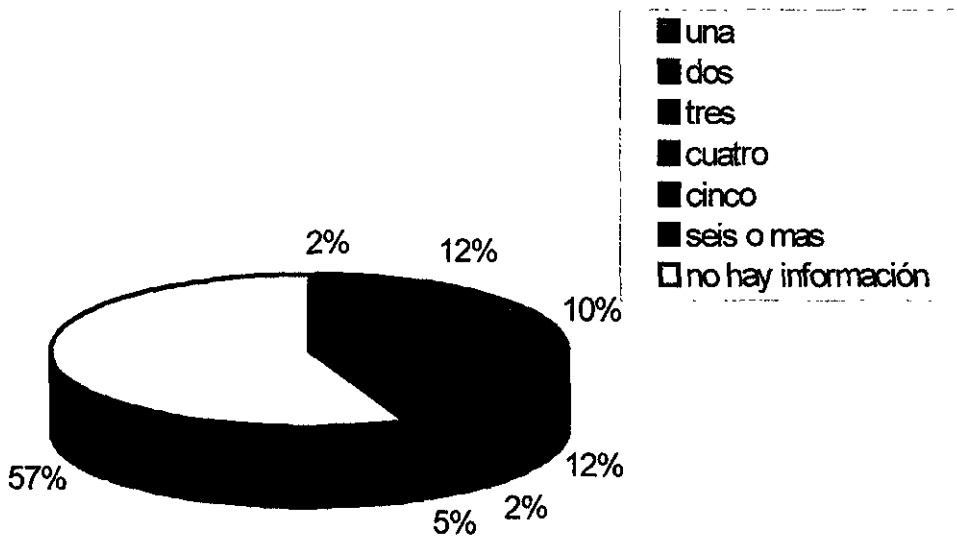


Figura 12. Número de parejas sexuales de los pacientes con CaPe (n=57)

Las variables histopatológicas fueron evaluadas por la patóloga, obteniéndose la información completa para todas las muestras.

Para el subtipo histológico, el 68.4% (39/57) de los CaPe fueron típicos, el 17.5% (10/57) fueron mixtos, hubo 3 condilomatosos (5.3%), 2 papilares y 2 verrugosos (3.5% cada uno) y uno del raro tipo sarcomatoide (1.8%) (Fig. 13).

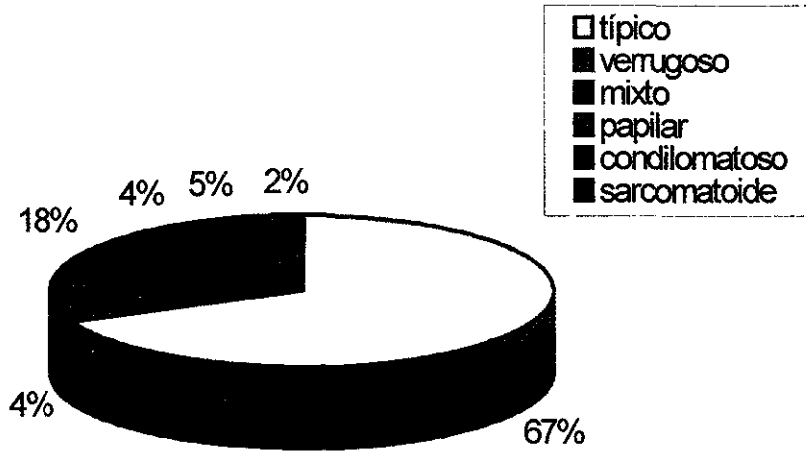


Figura 13. Subtipo histológico de CaPe en los pacientes estudiados (n=57)

El tipo de crecimiento mayormente representado fue el vertical, con un 87.7% (50/57), hubo tres casos con crecimiento verruciforme y tres de diseminación superficial (5.3% cada uno), así como uno mixto (1.8%) (Fig. 14).

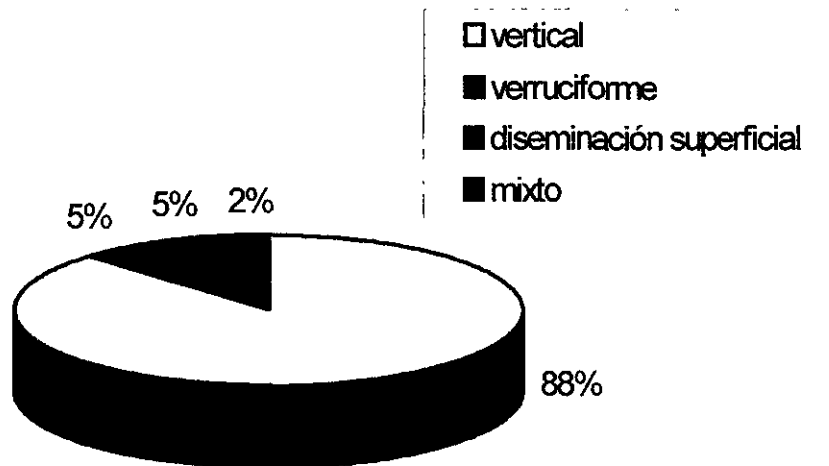


Figura 14. Tipos de crecimiento de CaPe en los pacientes estudiados (n=57)

En cuanto al grado de diferenciación, para los CaPe, el 59.4% (34/57) fue moderadamente diferenciado, el 22.8% (13/57) fue bien diferenciado y el 17.5% (10/57) fue poco diferenciado (Fig 15).

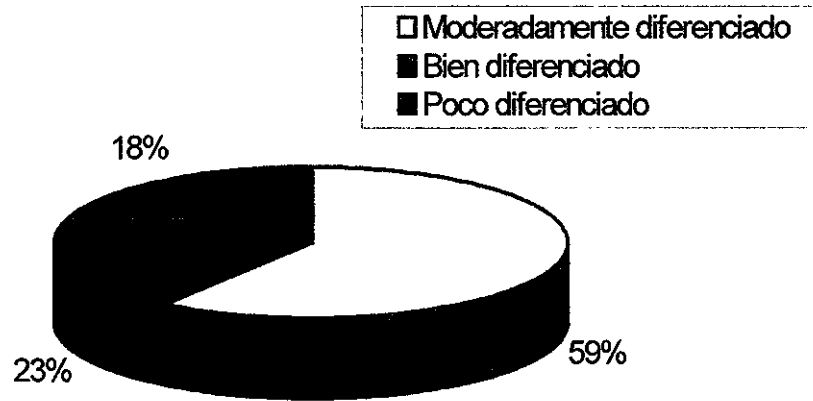


Figura 15. Grado de diferenciación de CaPe en los pacientes estudiados (n=57)

Por último, un 63.2% (36/57) de las muestras de tumor presentaban lesiones morfológicas características de la infección por VPH, en tanto que un 10.5% mostraban una morfología que sugería la infección y un 26.3% no presentaban este tipo de lesiones. Para los NIP, la positividad morfológica fue de un 90% (Fig. 16).

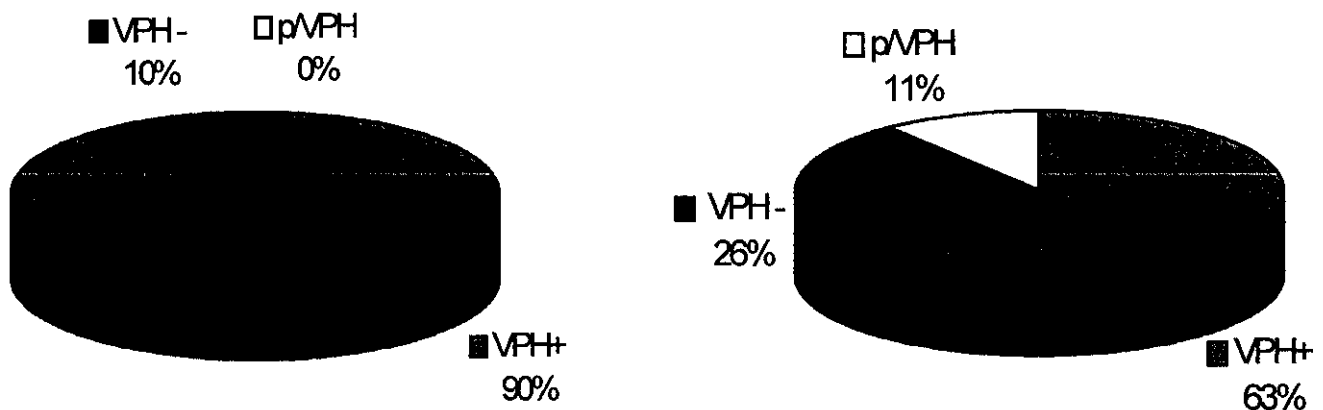


Figura 16. Detección morfológica de VPH en las muestras de A. NIP (n=10) y B. CaPe (n=57) en los pacientes estudiados (p/VPH = probable infección con VPH)

c) Correlación de datos moleculares con variables clínico histopatológicas

La prueba de X^2 , aplicada para correlacionar la presencia de DNA de VPH 16 con cada una de las variables clínicas e histopatológicas, mostró que ninguna de estas correlaciones era estadísticamente significativa. Sin embargo, se puede ver una tendencia hacia la positividad a VPH 16 al aumentar la edad de los pacientes (Fig. 17). Para las otras variables clínicas no se encontró ninguna tendencia.

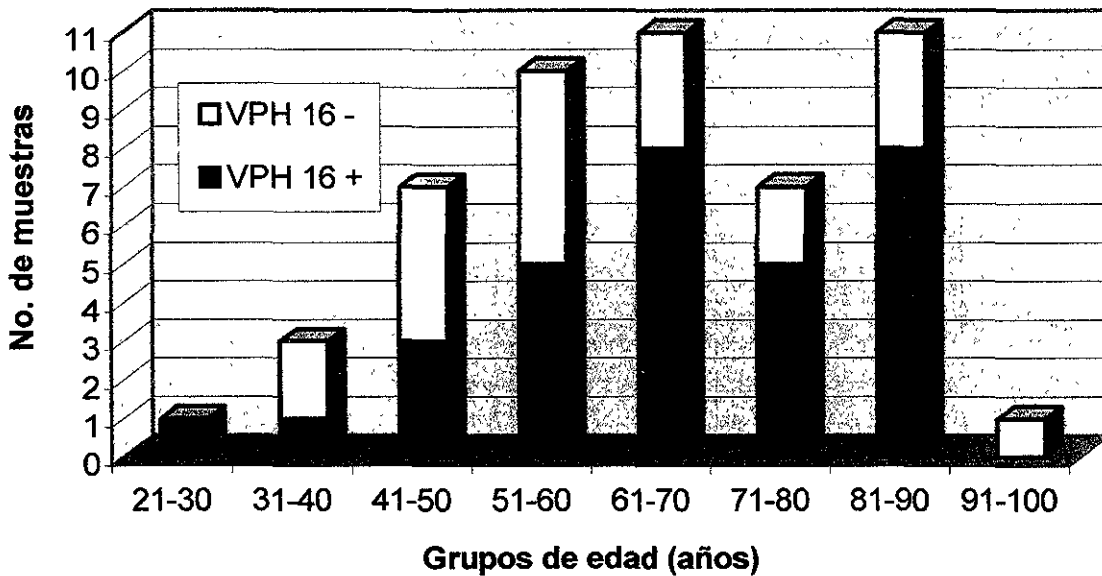


Figura 17. Detección molecular de VPH 16 en los diferentes grupos de edad de los pacientes con CaPe

En las variables histopatológicas, no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa para el subtipo histológico, tipo de crecimiento y grado de diferenciación con la presencia de VPH 16. Sin embargo, el porcentaje de positividad a VPH 16 en las muestras determinadas morfológicamente negativas contra las morfológicamente positivas para el virus, sí mostró una diferencia estadísticamente significativa ($x^2 = 4.7$, $p=0.03$). Las tablas 2 a 5 nos muestran datos interesantes. El subtipo histológico típico fue predominante y dentro de éste, la positividad a VPH 16 fue muy similar a aquella que observamos sin hacer distinción de subtipos (Tabla 2). Lo mismo sucedió para el tipo de crecimiento vertical (Tabla 3). Sin embargo, para el grado de diferenciación, fue el carcinoma poco diferenciado aquel que presentó la más alta positividad a VPH 16, seguido por el bien diferenciado (Tabla 4). En cuanto a la morfología citológica se refiere, aquella que se determinó positiva a VPH, presentó en el estudio molecular, 1.8 veces más prevalencia de VPH 16 que los que fueron determinados morfológicamente negativos (Tabla 5).

Tabla 2. Tipos histológicos de CaPe y su correspondiente positividad a VPH 16 determinada por PCR

Tipo histológico	No. casos	VPH 16 + (%)
Ca. Típico	39	25 (64,1)
Ca. Mixto	10	7 (70,0)
Ca. Condilomatoso	3	2 (66,6)
Ca. Papilar	2	0 (0,0)
Ca. Verrugoso	2	1 (50,0)
Ca. Sarcomatoide	1	1 (100,0)

Tabla 3. Tipos de crecimiento de CaPe y su correspondiente positividad a VPH 16 determinada por PCR

Tipo de Crecimiento	No. casos	VPH 16 + (%)
vertical	50	32 (64,0)
verruciforme	3	2 (66,6)
dis. superficial	3	2 (66,6)
mixto	1	0 (0,0)

Tabla 4. Grados de diferenciación en CaPe y su correspondiente positividad a VPH 16 determinada por PCR

Grado de Diferenciación	No. Casos	VPH 16 + (%)
moderadamente diferenciado	34	19 (55,8)
bien diferenciado	13	9 (69,2)
poco diferenciado	10	8 (80,0)

Tabla 5. Detección morfológica de infección con VPH y su correspondiente positividad a VPH 16 determinada por PCR

Morfología	No. casos	VPH 16 + (%)
VPH positivo	36	26 (72,2)
VPH negativo	15	6 (40,0)
sugerente	6	4 (66,6)

a) Datos geográficos

La tabla 6 muestra la incidencia de VPH 16 reportada para diferentes países en el mundo. El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas entre el porcentaje de VPH 16 encontrado en México y aquel reportado para Francia ($\chi^2=4.88$, $p=0.02$), Brasil (Levi, 1998) ($\chi^2=13.23$, $p=0.0002$) y Paraguay ($\chi^2=5.86$, $p=0.015$). En la figura 18 se hace una recopilación de la información por países, agrupándolos por continentes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de VPH 16 en Latinoamérica y los otros continentes.

Tabla 6. Positividad a VPH 16 en muestras de CaPe y/o NIP analizadas por técnicas moleculares en diversos países

Clave: * Solamente NIP, ** CaPe y NIP, *** VPH 16 y/o 18

Continente	País	No muestras	VPH 16 +	Referencia
Africa	Uganda	13	8(62%)	Tornesello, 1992 ²⁹
Asia	Japón	123	68 (61%)	Iwasawa, 1992 ²¹
Oceanía	Australia	52*	27 (52%)***	Katellaris, 1988 ⁵²
Europa	Francia	67*	29 (43%)	Aynaud, 1994 ²⁹
Europa	España	2	1(50%)	Poblet, 1999 ³⁷
Norteamérica	EUA	23	15 (65%)	Varma, 1990 ³⁰
Norteamérica	EUA	26**	16 (62%)	Sarkar, 1992 ³²
Latinoamérica	Brasil	53	26 (49%)	McCance, 1986 ²⁷
Latinoamérica	Brasil	50	16 (28%)	Levi, 1998 ⁹
Latinoamérica	Paraguay	26	9 (35%)	Cubilla, 1993 ⁴⁷
Latinoamérica	México	57	36 (63%)	presente estudio

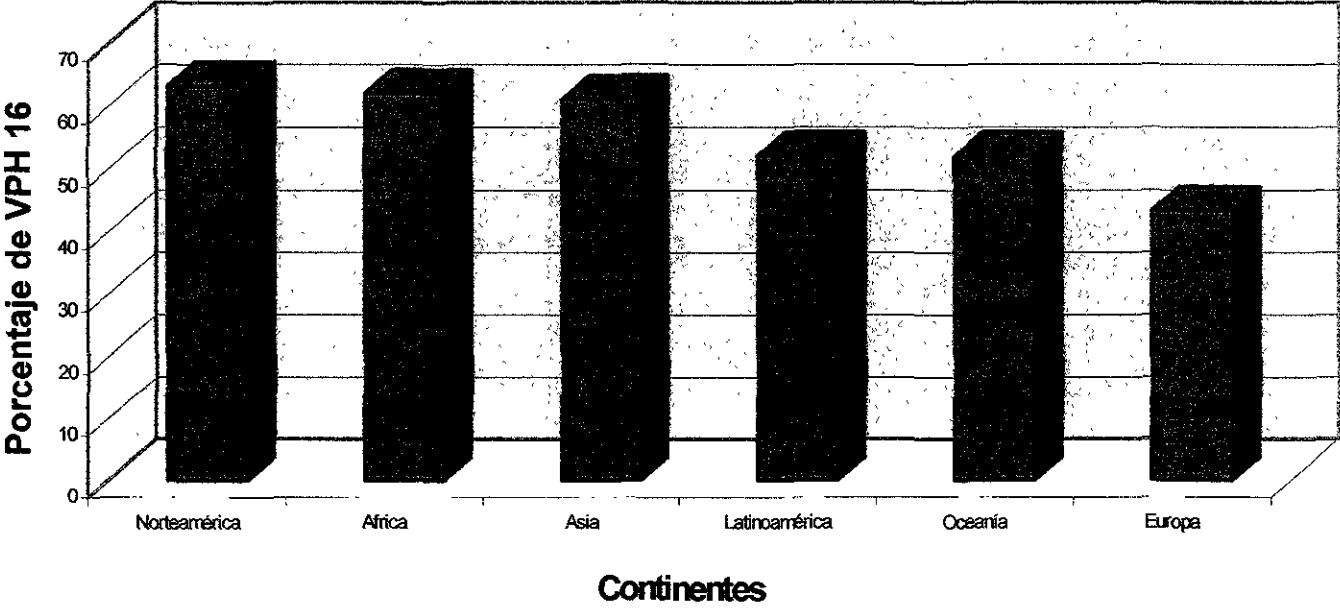


Figura 18. Presencia de VPH en CaPe y/o NIP en los cinco continentes

Discusión

El alto porcentaje de infección con VPH tipo 16 en las muestras de Carcinoma de Pene y de Neoplasias Intraepiteliales es sin duda lo más importante que se deriva de estos resultados. Una positividad de más del 50% para VPH es lo que esperábamos con base en lo observado en la literatura. Sin embargo encontramos, tan sólo para VPH 16 un 63.2% de positividad, es decir, que para la incidencia total de VPH en CaPe en nuestros pacientes, aún falta considerar todos los otros tipos virales genitales.

Los oligonucleótidos generales MY09/11 no se pudieron utilizar en la mayoría de los casos, debido a la calidad del DNA al provenir de muestras incluidas en parafina. Aparentemente, no es la inclusión en parafina lo que degrada al DNA, sino la fijación previa que sufre el tejido, la cual muchas veces es realizada con formol. Al estar tan degradado el DNA, no es posible que se logre la amplificación de un fragmento de 450 pb, y apenas en algunos casos se logra la amplificación de un fragmento de 255 pb de un gen celular como la β -actina. Esto se debe a que ya no hay suficiente material genético de esta longitud. En las muestras que si fueron amplificables por β -actina, es probable que haya habido una subdetección de VPH con los primers MY09/11, ya que si bien en estas muestras se logró amplificar un fragmento de 255 pb, probablemente no todas tenían DNA de suficiente calidad para amplificar un fragmento de 450 pb. Esta subdetección viral se hace evidente al utilizar los oligonucleótidos para E6VPH16f/r, ya que de las 10 muestras positivas para β -actina, 6 lo fueron para E6VPH16, y si no existiera ningún otro tipo viral más que el 16, de todas formas con los MY09/11 se debió haber obtenido amplificación en estos 6 casos. Esto demuestra que al menos parte de los resultados obtenidos con los primers MY09/11 son "falsos negativos", y se deben a problemas metodológicos más que a una verdadera negatividad a VPH.

Por otra parte, algunos autores plantean que la integración del DNA del VPH al genoma de la célula puede conllevar la ruptura o pérdida del gen L1 en algunas muestras³. Si esto sucediera, sería otra causa que impediría la amplificación con los primers MY09/11.

En contraste, los genes E6 y E7 son casi invariablemente retenidos, ya que su expresión puede ser necesaria para conversión y mantenimiento de la malignidad³. De tal suerte que al usar primers para la región E6 de VPH 16, estamos asegurándonos de no tener una subdetección debido a la integración viral. Además, al usar primers que amplifiquen un fragmento pequeño, evitamos el problema de la subdetección por degradación del DNA. Esto se comprueba con la amplificación lograda para el fragmento del 160 pb del gen celular *ref*. Sin embargo, al no obtener buenos resultados con los oligonucleótidos generales MY09/11, no estamos detectando ningún otro tipo viral distinto a VPH 16. Por otro lado, nuevos tipos virales continúan siendo descubiertos y secuenciados³⁰. Tomando en cuenta todas éstas probables fuentes de subdetección, es posible que la incidencia de VPH en CaPe sea más alta de lo encontrado en este estudio.

Sin embargo, con base en los resultados obtenidos, se puede afirmar que el tipo viral más común en CaPe en pacientes mexicanos es el VPH 16, puesto que fue detectado en más del 50% de las muestras.

En cuanto a la edad, la media encontrada en nuestro país para pacientes con CaPe no difiere mayormente de la de otros países^{9, 14, 31}. Sin embargo, encontramos una tendencia a aumentar la positividad a VPH 16 en los grupos de mayor edad. Esto podría deberse a la presencia de otros tipos virales en los pacientes más jóvenes. En cérvix, se considera que los carcinomas que presentan VPH 18 tienen peor pronóstico y propiedades más agresivas⁴². Si esto sucediera también en pene, es coherente pensar que en estos hombres más jóvenes que ya presentan el carcinoma invasor, pudiera haber infección con VPH 18.

La detección molecular de VPH y la circuncisión no tuvieron una correlación estadísticamente significativa. Aynaud *et al* encontraron igualmente que no hay diferencia significativa entre las lesiones asociadas a VPH y la circuncisión, sin embargo sus resultados mostraron que la tasa de NIP era mucho más baja en hombres circuncidados que no circuncidados²⁹. Apoyando esto, en nuestro estudio, prácticamente todas las muestras de CaPe provenían de pacientes no circuncidados. Los únicos tres casos en los que los pacientes presentaban circuncisión, ésta les había sido realizada ya en la vida adulta, y Scinicariello *et al* sugieren que la circuncisión tardía no presenta efectos profilácticos contra el CaPe³⁶. Por otro lado, Fleiss, P. opina que la circuncisión es en realidad un indicador de la clase social y no un factor asociativo por sí mismo en la etiología del CaPe o de enfermedades sexualmente transmisibles. Dice que la falta de circuncisión es común en hombres de bajo nivel socioeconómico y escasa educación, con una historia de múltiples parejas sexuales, infecciones venéreas y difícil acceso a asistencia médica, entre otras cosas. Estos hombres por tanto, tienen mayores posibilidades de contraer VPH y desarrollar cáncer de pene. Como contraparte, cita a Dinamarca, una nación con fuerte tradición de no-circuncisión, pero con un buen nivel socioeconómico promedio, que tiene una de las tasas más bajas de cáncer de pene con 0.82/100,000⁴³. Sin embargo, Maymon *et al* en su estudio en una población judía reportan una tasa muy baja (24%) de lesiones asociadas a VPH en hombres circuncidados, cuyas parejas sexuales tenían NIC²⁶. Es probable que la falta de circuncisión se encuentre asociada en muchos casos a una mala higiene, a múltiples contactos sexuales, y a falta de asistencia médica, sobre todo en los países en vías de desarrollo como el nuestro y en ciertas poblaciones marginadas de los países desarrollados. En estos casos, es coherente pensar en una correlación entre la falta de circuncisión y la presencia de una lesión asociada a VPH, una NIP o un carcinoma de pene. Ya que las condiciones locales en el prepucio, debido a la mala higiene, podrían favorecer una infección productiva con VPH potencialmente oncogénicos²⁹.

Referente a otras infecciones venéreas, la tasa de incidencia de éstas fue baja en el presente estudio. Sin embargo, este dato se obtuvo de la información facilitada por el paciente. Es decir, no se realizó ninguna prueba de laboratorio para corroborar si el paciente tenía o no alguna otra infección de transmisión sexual. Ninguno de nuestros pacientes reportó ser VIH seropositivo. Uno reportó sífilis y otro una infección previa con VPH. Cuatro de ellos declararon tener o haber tenido gonorrea. *Neisseria gonorrhoea*, la bacteria gramnegativa causante de la enfermedad, se propaga únicamente por contacto sexual¹². Se ha visto que la tasa de infección puede reducirse al evitar múltiples contactos sexuales, y que el uso del condón provee protección parcial⁴⁴. De tal suerte que la

presencia de gonorrea en los pacientes con CaPe puede ser un indicador de múltiples contactos sexuales. Castellsague *et al* demostraron una fuerte asociación de los contactos sexuales múltiples con el CaPe y/o infección con VPH⁸. Un estudio de casos-controles hecho en mujeres Indio-Americanas en EUA mostró que las mujeres con NIC II/III tenían mayor probabilidad de tener una historia de gonorrea o chlamydia que los controles⁴⁵. Este estudio muestra que el tener una historia de enfermedades de transmisión sexual se asocia con lesiones premalignas en el cérvix. Esto también podría ocurrir en pene. Maymon *et al* mencionan que la poca higiene, la falta de circuncisión y ciertas enfermedades de transmisión sexual se correlacionan con la prevalencia de CaPe²⁶. Por lo tanto, la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual en pacientes masculinos que acuden a consulta, pudiera tomarse como una señal de alerta para VPH.

Castellsague *et al* encuentran una fuerte asociación entre la presencia de DNA de VPH en pene y el aumento del número de parejas sexuales de cualquier tipo (prostitutas y no prostitutas)⁸. Desgraciadamente, para la variable del número de parejas sexuales en este estudio, se contó con muy poca información en los expedientes. No sabemos si los médicos no realizaron la historia clínica completa de los pacientes, o si éstos se negaron a contestar dicha pregunta por diversos motivos. Para el 43% de los casos en los que si se obtuvo la información, el mayor número de pacientes reportaron 2, 3 o 4 parejas sexuales. Debido a que no conocemos de que forma fue recopilada esta información en el expediente, no estamos seguros de que se trate de parejas sexuales estables únicamente, o si se están incluyendo las relaciones ocasionales y con prostitutas. Cabe recordar que los estudios de detección en mujeres sin NIC muestran una prevalencia de VPH que varía desde el 10% en mujeres de clase social alta hasta el 82% en prostitutas⁴⁶. Por lo que la falta de éstos datos específicos representa un importante sesgo en la información. No existió ninguna asociación entre el número de parejas sexuales y la infección con VPH, pero nuevamente este análisis no es confiable debido al sesgo en la información clínica.

El subtipo histológico preponderante en este estudio fue el típico. El 67% de incidencia encontrado no difiere significativamente del 70% reportado en la literatura¹⁴. Los otros subtipos presentaron mayores diferencias, pero tampoco fueron estadísticamente significativas. En la literatura el tipo basaloide es el segundo tipo más común, con un 10% de incidencia¹⁴, en nuestro estudio no se halló ningún caso. Amin *et al* reportan que el carcinoma papilar representa el casi el 10% de todos los casos de CaPe, el condilomatoso el 6% y el verrugoso el 3%¹⁴. En comparación, nosotros hallamos un 4% de papilar, 5% de condilomatoso y 4% de verrugoso, así como un 18% clasificado como mixto por la patóloga. Referente a la positividad a VPH para cada grupo, no se encontraron mayores diferencias comparando con la positividad general sin distinción de subtipos, exceptuando el carcinoma papilar, en donde ningún caso resultó positivo. Amin *et al* comentan que este subtipo particular no presenta células con características relacionadas a VPH¹⁴, concordando así con nuestros resultados. Por otro lado, se considera que el carcinoma verrugoso tampoco se asocia a VPH^{14,31}. Cupp *et al* mencionan que de los 19 casos de carcinoma verrugoso reportados en la literatura, solo 2 (11%) fueron positivos para VPH. Nosotros detectamos DNA de VPH 16 en uno de los dos carcinomas verrugosos. Este subtipo en particular es bastante raro, por que la falta de suficientes estudios podría ser la causa de la aparente no-detección de VPH. Por último tuvimos un caso del aún más raro subtipo sarcomatoide, del cual se sabe muy poco. En la literatura revisada no se encontró

ningún dato sobre la presencia o ausencia de DNA de VPH en él. Nuestros resultados indican que fue positivo para VPH 16, pudiendo ser el primer reporte que se tiene para este subtipo.

El tipo de crecimiento preponderante fue el vertical (88%), seguido por el de expansión superficial (5%) y el verruciforme (5%). En contraposición, Cubilla *et al*⁴⁷ encuentran el de expansión superficial como más común (42%), con un 32% para el vertical y un 18% para el verruciforme. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (crecimiento vertical $\chi^2=39.17$, $p=0.0001$; expansión superficial $\chi^2=22.41$, $p=0.0001$; verruciforme $\chi^2=4.77$, $p=0.02$). Esto podría deberse a diferentes etiologías en las zonas geográficas en estudio. Mientras que nuestro estudio es en pacientes mexicanos, el de Cubilla *et al* se realizó en Paraguay. No se ha encontrado que haya una asociación entre tipos particulares de VPH y ciertos tipos de crecimiento, pero existen pocos estudios al respecto. Si así fuera, la presencia de infecciones con distintos tipos de VPH en las zonas podría estar influenciando este resultado. Por otro lado, sí se menciona 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 VPH⁴⁷. En este estudio, sin embargo, no hubo una diferencia significativa en la positividad a VPH de los diferentes tipos de crecimiento.

En cuanto al grado de diferenciación, se observaron mayores variaciones en el porcentaje de positividad al virus en cada grupo, sin que las diferencias resultaran estadísticamente significativas. El más alto porcentaje lo presentó el poco diferenciado (80%), seguido por el bien (69%) y el moderadamente diferenciado (56%). Kiyabu *et al* encuentran esta misma distribución de positividad (VPH 16 y 18) en CCE, pero con valores ligeramente menores: poco (71%), bien (57%) y moderadamente diferenciado (48%), asimismo, no encuentran una correlación estadísticamente significativa⁴⁸. Es probable que al aumentar el número de casos estudiados para los diferentes grados de diferenciación, se pueda encontrar una correlación estadísticamente significativa. Es posible que en cada grado de diferenciación se encuentren mayormente asociados ciertos tipos virales que otros, o que existan coinfecciones con dos o más tipos, aunque al menos en nuestro estudio, para todos los grados el VPH 16 resultó preponderante.

La morfología característica de la infección con VPH fue encontrada en 1.8 veces más casos positivos para VPH 16 que en los negativos. Además, dentro de las muestras morfológicamente positivas, que resultaron negativas para VPH 16 por PCR, podrían encontrarse otros tipos virales. Sin embargo el 40% de las muestras clasificadas morfológicamente negativas, presentaron VPH 16. Schultz *et al* encuentran 16% de positividad a VPH (6, 11, 16, 18 y 51) mediante hibridación Southern blot en muestras consideradas morfopatológicamente negativas a VPH⁴⁹. Esto habla de 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 coilocíticos característicos, pueden albergar al virus. Sin duda en varios de estos casos, se deba a que la zona particular analizada del tejido no presente cambios atribuibles a VPH, pero que éstos se encuentren en otra zona que sea sometida a detección molecular. Se observó que la detección morfológica de VPH fue mayor en NIP que en CaPe. Además en las lesiones premalignas

sólo tuvimos un caso morfológicamente negativo que presentó VPH 16 por PCR, lo cual puede sugerir que la detección morfológica en las NIP sea más confiable que en el CaPe.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran a México como el país con más alta incidencia de VPH 16 en Latinoamérica. La positividad encontrada para este virus es semejante a la reportada para Uganda, Japón y Estados Unidos. De éstos, sólo Uganda presenta una alta incidencia de cáncer de pene²⁸. Otros países con alta incidencia de CaPe como Brasil⁶ y Paraguay⁴⁷, presentan una incidencia significativamente más baja de VPH 16. Por continentes, aparentemente África y Asia tienen una positividad similar a VPH 16, de alrededor del 62%. Les sigue Norteamérica con 57%, Oceanía y Latinoamérica con 52% y finalmente Europa rondando el 43% (Fig 18). Es probable que en distintas regiones geográficas se presenten diferentes porcentajes de tipos de VPH. Esto puede estar relacionado con factores raciales (genéticos) o ambientales (exposición). Sin embargo la figura 18 nos hace pensar que a nivel mundial, cerca de la mitad de los CaPe están relacionados con VPH 16. Poblet *et al* sugieren que podría haber dos grupos de casos de CaPe: uno involucrado con VPH y otro en el que no están relacionados estos virus. Los dos grupos podrían estar asociados con factores geográficos o epidemiológicos³⁷. Sin embargo, consideramos que es posible que en el CaPe exista, como en el CaCu, una positividad a VPH cercana al 100%, pero debido a la falta de estudios amplios que detecten todos los VPH conocidos, como los que se han hecho en cérvix^{3, 50}, esto no se ha visto aún en la literatura. La mayor parte de los estudios hechos en CaPe están diseñados para detectar VPH 16 y 18, algunos 6/11; y otros más, algunos tipos más raros. En la literatura se encontraron sólo 3 estudios hechos para detectar otros tipos virales, distintos al 16 y 18, en NIP y CaPe. Dos se realizaron en Norteamérica^{30, 31} y uno en Europa²⁹. En la figura 19A se muestra una recopilación de los estudios existentes para VPH 16, 18 y otros tipos virales, sin embargo no existe ningún estudio que se haya realizado a nivel mundial. Por el contrario, en cérvix, recientemente se han hecho amplios estudios de detección de todos los tipos virales genitales, en distintas regiones del mundo. Éstos muestran una clara diferencia en los tipos virales encontrados en distintas regiones geográficas. Si bien el predominante mundialmente es el 16, los demás tipos presentan mayores variaciones (Fig. 19B). Por ejemplo, en África y Norteamérica se encuentran altos porcentajes de VPH 45; los tipos 31 y 33 son muy conspicuos en América Central y Sudamérica, y los tipos 39 y 59 son casi exclusivos de estas dos zonas⁵¹. De tal suerte que el relativamente bajo porcentaje de VPH 16 en CaPe en Latinoamérica, en comparación con otras zonas, podría estar relacionado con un fenómeno parecido de distribución de los tipos virales en pene. Esto recalca la importancia de buscar otros tipos virales en este epitelio.

Como continuación de este trabajo, se plantea la opción de utilizar primers específicos para las regiones E6 y/o E7 de los otros tipos virales genitales conocidos. Se debe procurar que amplifiquen un fragmento de alrededor de 100 pb, para no tener problemas debido a la degradación del DNA. De esta forma se podrá conocer la presencia general del VPH en CaPe, en esta serie de casos de pacientes mexicanos.

Asimismo, para estudios posteriores, se sugiere una relación estrecha con urólogos y patólogos, a fin de poder obtener información completa de los pacientes que incluya: edad, nivel educativo, edad de inicio de vida sexual, número de parejas sexuales

(incluyendo relaciones ocasionales y con prostitutas), otras infecciones venéreas (incluyendo VIH), circuncisión, frecuencia de uso de preservativo y condición de salud cervical de la pareja sexual. Sería de gran valor obtener muestras (biopsias o raspados) de pacientes que acudieran a consulta por razones distintas a un condiloma, NIP o CaPe, para contar con controles y poder conocer la positividad a VPH en este grupo.

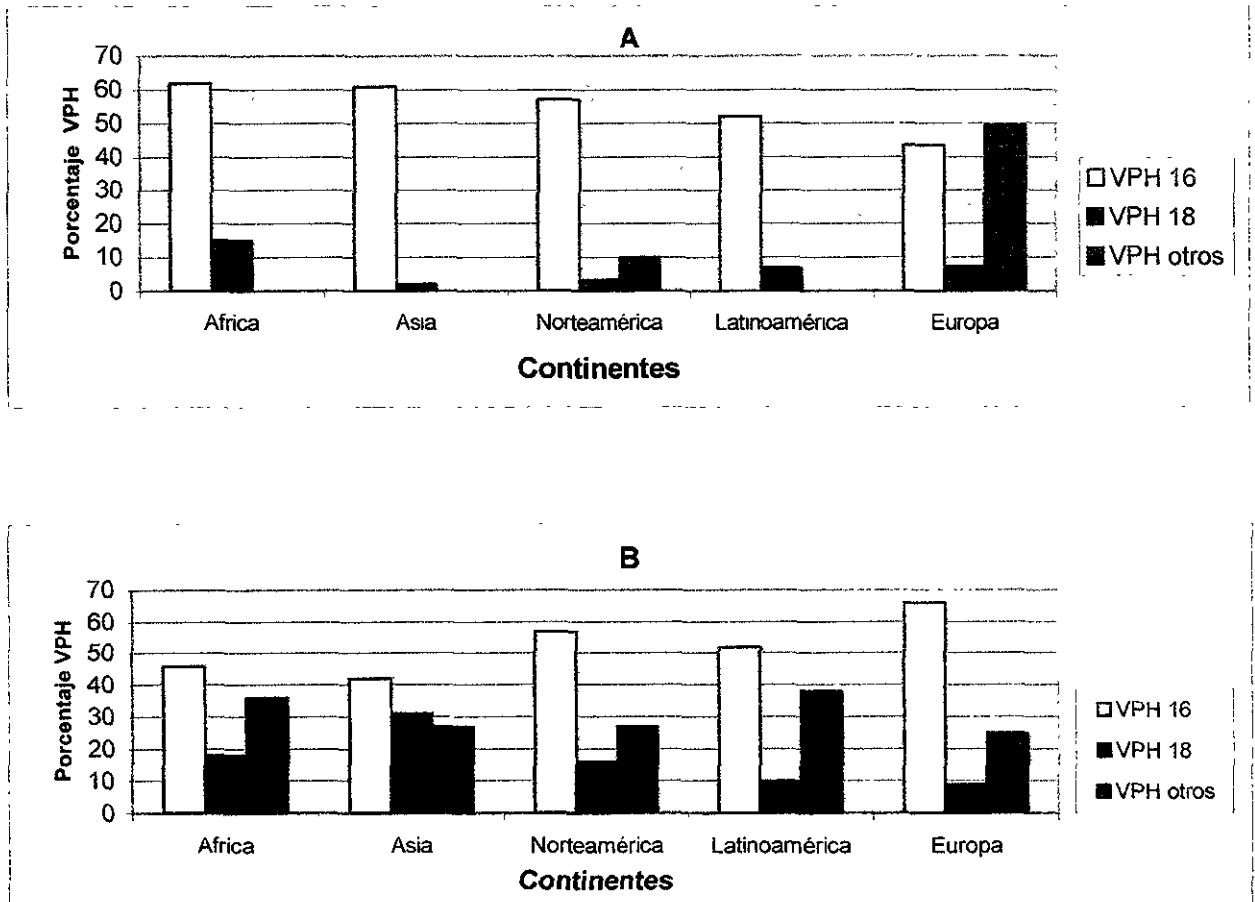


Figura 19. Prevalencia de tipos de VPH por continentes. A. CaPe y NIP^{29, 30, 31}. B. CaCu⁵¹.

Por último, al observar la baja incidencia de CaPe en comparación con CaCu, a pesar de una prevalencia semejante de VPH 16 en ambas neoplasias, se piensa en las diferencias de la infección viral en pene y cérvix. Se sugiere que otros factores además del VPH pueden jugar un papel en la génesis de éstas neoplasias³⁰. Varios autores proponen que la zona de transición cervical es particularmente vulnerable a la infección^{25, 30}, y al desarrollo de una lesión premaligna una vez infectado^{22, 29}. El encontrar un 63.2% de positividad a VPH 16 en CaPe y un 70% en lesiones premalignas, nos habla del potencial de infección que esto significa en las parejas sexuales de dichos hombres. No habiendo duda sobre la transmisión sexual de los VPH⁵², se debe reconocer la importancia del tratamiento de los hombres con lesiones intraepiteliales o CaPe, como mecanismo de control de la infección con VPH y sus repercusiones en la incidencia de CaCu en nuestro país.

Conclusiones

- 1) El VPH de mayor frecuencia en Carcinoma de Pene, es el tipo 16 con un 63.2% de incidencia.
- 2) Se plantea una posible subdetección viral debido a la imposibilidad de amplificar DNA de otros tipos virales.
- 3) Las variables clínicas: edad, circuncisión, otras infecciones venéreas y número de parejas sexuales no mostraron una correlación estadísticamente significativa con la presencia/ausencia de VPH 16.
- 4) La positividad a VPH 16 tendió a aumentar en los pacientes de mayor edad, posiblemente debido a la infección con otro tipo viral más agresivo en pacientes más jóvenes.
- 5) La falta de circuncisión, probablemente asociada a otros factores (falta de higiene y de asistencia médica, así como alto número de parejas sexuales), podría ser un elemento importante en la infección con VPH y/o en la génesis del CaPe.
- 6) Las variables histopatológicas: subtipo histológico, tipo de crecimiento, grado de diferenciación y morfología no mostraron una correlación estadísticamente significativa con la presencia/ausencia de VPH 16.
- 7) El grado de diferenciación que mostró la mayor positividad a VPH fue el poco diferenciado, con un 80% de incidencia.
- 8) Los carcinomas que presentaron una morfología característica de la infección con VPH, tuvieron una incidencia de VPH 16 casi dos veces mayor que aquellos que no la presentaron.
- 9) Estos resultados muestran a México como el país latinoamericano con mayor incidencia de VPH 16 en CaPe, comparable a la encontrada en ciertas poblaciones de Japón, Uganda y EUA.
- 10) Debido a su alta incidencia, se plantea al VPH 16 como factor etiológico en al menos un subgrupo de los CaPe en pacientes mexicanos.
- 11) Se reconoce la alta incidencia de VPH en hombres con NIP y/o CaPe que pueden ser potenciales transmisores del virus a sus parejas sexuales.

Bibliografía

- 1) Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 1999. World Health Statistics. World Health Organization. www-nt.who.int/whosis
- 2) Rodríguez, S.A., Labastida, S., Tapia, R., Kuri, P. & Macías C.G. (eds.). 1999. *México-Salud 2000. Registro Histopatológico de Neoplasias en México 1993-1996. Población derechohabiente del IMSS*. Ciencia y Cultura Latinoamericana, México D.F
- 3) Walboomers, J.M., Jacobs, M., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, A., Shah, K., Snijders, P.J.F., Peto, J., Meijer, C. & Muñoz, N. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19
- 4) IARC *Monographs and the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses*. 1995. Vol 64. IARC, Lyon
- 5) Thompson, I.M. & Fair, W.R. 1990. *Penile Carcinoma*. A.U.A. Update Series, vol. 9, lesson 1
- 6) Parkin D.M., Muir, C.S., Whelan, S.L., Gao, Y.T., Serlay, J. & Powell, J. (eds). 1992. *Cancer incidence in five continents*. IARC Scientific Publications 120, vol. 4, IARC Cancer, Lyon
- 7) Graham. S., Priore, R. & Graham, M. Genital cancer in wives of penile cancer patients. *Cancer* 1979; 44: 1870-74
- 8) Castellsagué, X., Ghaffari, A., Daniel, R.W., Bosch, F.X., Muñoz, N. & Shah, K.V. Prevalence of penile Human Papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Inf Dis* 1997; 176: 353-61
- 9) Levi, J.E., Rahal, P., Sarkis, A.S. & Villa, L.L. Human Papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 76: 779-783
- 10) Kurman, R.J., Norris, H.J. & Wilkinson E.J. (eds). 1990. *Tumors of the Cervix, Vagina and Vulva*. Atlas of Tumor Pathology Third Series, Fascicle 4. Armed Forces Institute of Pathology Pub. U.S.A.
- 11) Bostwick, D.G. & Eble, J.N. 1997. *Urologic Surgical Pathology*. Mosby Year Book Inc. Canada
- 12) Kumar, V., Cotran R. S. & Robbins, S.L. 1999. *Patología Humana*. WcGraw-Hill Interamericana. 6ta ed. México
- 13) Cotran R. S., Kumar, V. & Robbins, S.L. 1994. *Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company. 5ta ed. U.S.A.
- 14) Amin, M., Cubilla, A., Young, R.H. *Tumors of the prostate, seminal vesicles, male urethra and penis*. Atlas of Tumor Pathology. AFJP Fascicles. In press.
- 15) Petersen, R. O. 1986. *Urologic pathology*. J.B. Lippincott Co. U.S.A.
- 16) Shah, K. 2000. What are Human papillomaviruses?. En Xavier Castellsagué, F.X. Bosch, S. De Sanjosé. V. Moreno, J. Ribes (eds). *Programs and Abstracts of the 18th International Papillomavirus Conference*. (p. 71) Institut Català d'Oncologia. Barcelona, España
- 17) Griffiths, T.R. & Mellon J.K. Human Papillomavirus and Urological Tumors: Basic Science and Role in Penile Cancer. *BJU Int* 1999; 84: 579-86
- 18) zur Hausen, H. Papillomavirus Infection, a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-F78.
- 19) BioMedNet. HMS Beagle Magazine. www.bmn.hms.HPV.htm
- 20) Alani, R.M & Münger, K. Human Papillomaviruses and Associated Malignancies. *J Clin Oncol* 1998; 16: 330-337
- 21) Iwasawa, A, Kumamoto, Y. & Fujinaga, K. Detection of Human Papillomavirus Deoxyribonucleic Acid in penile carcinoma by Poymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization. *J Urol* 1993; 149: 59-63
- 22) Levine, R.U., Crum, C.P., Herman, E., Silvers, D., Ferenczy, A. & Richart, R.M. Cervical Papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: A study of male sexual partners. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 16-20

- 43) Fleiss, P.M. Re: The detection of Human Papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis (letter to the editor). *J Urol* 1996; 155: 2034-5; discussion 2035-6
- 44) Brooks, G.F., Morse, S.A. & Butel, J.S. 1999. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 16a ed. El Manual Moderno, México.
- 45) Schiff, M., Becker, T.M., Masuk, M., van Asselt-King, L., Wheeler, C.M., Altobelli, K.K., North, C.Q. & Nahmias, A.J. Risk factors for Cervical Intraepithelial Neoplasia in southwestern American Indian women. *Am J Epidemiol* 2000; 152:716-26
- 46) Bauer, H.M., Ting, Y., Greer, C.E., Chambers, C.J., Tashiro, C.J., Chimera, J., Reingold, A. & Manos, M.M. Genital Human Papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *J.A.M.A.* 1991; 265: 472-5.
- 47) Cubilla, A.L., Barreto, J., Caballero, C., Ayala, G. & Riveros, M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 753-763
- 48) Kiyabu, M.T., Shibata, D., Arnheim, N., Martin, J. & Fitzgibbons, P.L. Detection of Human Papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the Polymerase Chain Reaction. *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 221-224
- 49) Shultz, R. E., Miller, J.W., MacDonald, G.R., 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
- 50) Bosch, F.X., Manos, M.M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R. & Shah, K.V. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802
- 51) Burk, R.D. Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. *Hosp Pract* 1999; 34: 103-112
- 52) Katelaris, P.M., Cossart, Y.E., Rose, B.R., Thompson, C.H., Sorich, E., Nightingale, B., Dallas, P.B. & Morris, B.J. Human Papillomavirus: The untreated male reservoir. *J Urol* 1988; 140: 300-305