UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA

DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO Y EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES P16 Y P53 EN CARCINOMAS DE REGIÓN GENITAL EXTERNA

Tesis presentada por Jose Manuel Godínez Martínez
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Murcia

Murcia, Julio de 2008

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de la presente Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

- **Pascual M, Pariente M, Godínez JM, Sánchez-Prieto R, Atiénzar M, Segura M, Poblet E** (2007) High prevalence of Human Papillomavirus 16 in penile carcinoma. Histol Histopathol; 22: 177-183

- **Poblet E, Pascual A, Godínez JM, Pariente M, Escario E, García-Olmo DC** (2008) Human Papillomavirus-Associated Penile Sarcomatoid Carcinoma. J Cutan Pathol; 35: 559-565

Comunicaciones a congresos:

- **Godínez JM, Pascual A, Pariente M, Segura M, Atiénzar M, Sánchez-Prieto R, Poblet E.**
  Comparative análisis of three different sets of primers for detection of Human Papillomavirus in penile carcinomas.
  23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Praga (República Checa). Septiembre 2006

- **Godínez JM, Pariente M, Castaño MJ, Pascual A, Poblet E.**
  Detection of Human Papillomavirus and immunohistochemical expression of P16 and P53 in penile and vulvar carcinomas.
  24rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Beijing (China). Noviembre 2007.

A mis padres, que cada uno a su manera ha

hecho que esto sea posible

“El que resiste, vence”
Camilo José Cela

“Me lo contaron y lo olvidé. Lo vi y lo entendí. Lo hice y lo aprendí”
Confucio

AGRADECIMIENTOS

A los directores de esta tesis, D. Enrique Poblet y D. Juan Francisco Madrid, por darme ambos la oportunidad de hacer de un trabajo una pasión, y casi una manera de vivir. Espero que algún día podáis estar orgullosos de que esto empezara con vosotros.

A los compañeros de laboratorio con los que empecé en esta cosa de la Ciencia en el Departamento en Murcia, Emma, Fara, Guillermo, Julián, María, Mariajo, porque teniendo que hacer disoluciones de tampón PBS en cubos de 10 litros o se aprende a disfrutar del laboratorio o se hace uno notario. Un agradecimiento especial es para MariCarmen, que siempre nos trató, y espero que siempre lo haga, como si fuéramos tan suyos como sus hijos.

A los profesores e investigadores del Departamento de Biología Celular e Histología, Adelina, Concha, Jose Ángel, Luis Migue,l Manolo y MªTeresa, por tener siempre un momento para enseñarme algo y apoyarnos a todos los que hemos empezado a su lado. A Don Francisco Hernández, por su paciencia con los que llegamos de nuevas y queriendo saberlo todo de golpe.

A la Doctora García Olmo, Lola para la familia, porque creo que ambos estamos seguros de que sin algunas conversaciones con ella esto no habría podido terminarse, o por lo menos no así.

A toda la gente con la que he tenido la suerte de trabajar y convivir durante este tiempo en Albacete, el Servicio de Anatomía Patológica al completo (si no fuerais tantos os nombraba uno a uno pero todo tiene un límite); la gente de la Facultad de Medicina y del CRIB, en especial al grupo de Oncología Molecular, donde dí mis primeros pasos en el mundo del HPV; y por supuesto a los compañeros de la Unidad de Investigación, tanto a los que estaban antes que yo y me recibieron con cariño, como a las últimas adquisiciones, porque si ya es difícil aguantarme a ratos ellos, lo han hecho durante varios años. Un recuerdo especial para los que han tenido que cambiar de sitio, pero siempre sabrán dónde tienen uno al que volver.

A Alejandro y Macarena, porque las decepciones en el laboratorio se llevan mejor cuando somos varios.

A mis amigos de siempre, Ángel, Antonio, Elena, Isra, Luis, Mariajo,Nuria, Pepe, Roge, Sergio, Susana, porque siempre tuvieron confianza en que mi aspecto de científico loco me ayudaría algún día a serlo de verdad, y aún así siguen siendo amigos míos.

A mi familia, a toda, porque lo suyo es verdadera fe, siempre me han apoyado y animado, aunque la mayoría sigue sin saber lo que hago todo el día con una bata blanca. En especial a los más pequeños, espero que algún día lean esto y entiendan que los vea tan poco aunque los quiera tanto.

A Jimmy Page, Neil Gaiman, Lou Reed, Paul Auster, Alex Ross y al lado oscuro de la luna, por tantos momentos en su compañía, haciendo más llevadero lo que a veces ha sido demasiado duro.

Mis más sinceras disculpas a la gente que por olvido o descuido no esté en estas palabras, pero sois muchos y es muy tarde, así que las quejas con una caña, que son más divertidas.

La siguiente hoja queda en blanco a propósito, porque hay gente especial a la que se lo agradeceré personalmente y de mi puño y letra y es que hay cosas que de verdad importan, que no tienen sitio en una Tesis Doctoral.

ÍNDICE

Página

Índice de materia i
Abreviaturas v
Justificación del estudio vii

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Papilomavirus humano 2
1.1.1. Evolución de los conocimientos sobre Papilomavirus Humano (HPV) 2
1.1.2. Clasificación y estructura de HPV 3
1.1.3. Enfermedades relacionadas con los distintos tipos de HPV 7
1.1.4. Organización genómica de HPV 9
1.1.5. Genes y proteínas de HPV 11
1.1.5.1. E1 11
1.1.5.2. E2 12
1.1.5.3. E4 12
1.1.5.4. E5 13
1.1.5.5. E6 13
1.1.5.6. E7 14
1.1.5.7. L1 15
1.1.5.8. L2 16
1.1.6. Ciclo celular y replicación vírica 16
1.1.7. Genes supresores tumorales relacionados con HPV 20
1.1.7.1. Proteína p53 20
1.1.7.2. Proteína p16 21
1.1.8. Integración de HPV en el genoma celular 22

1.2. Métodos de estudio de las infecciones por HPV 24
1.2.1. Citología 24
1.2.2. Inmunohistoquímica 26
1.2.3. Microscopía electrónica 27
1.2.4. Hibridación 27
1.2.4.1. *Southern blot* 28
1.2.4.2. *Reverse blot hybridization* 29
1.2.4.3. *Dot blot* 29
1.2.4.3.1. Comparación PCR / *Dot blot* 29
1.2.4.4. Hibridación *in situ* estándar 30
1.2.4.5. Hibridación *in situ* por fluorescencia 31
1.2.4.6. Hibridación *in situ* con filtro 31
1.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 32
1.2.5.1. Fundamentos del método 32
1.2.5.2. Detección de amplificados 38
1.2.5.3. PCR y Papilomavirus 38
1.2.6. Otras pruebas 39

1.3. Neoplasias de pene 40
1.3.1. Epidemiología del cáncer de pene 40
1.3.2. Lesiones preneoplásicas del cáncer de pene 42
1.3.2.1. Condiloma acuminado (lesiones benignas) 42
1.3.2.2. Carcinoma *in situ* o lesión intraepitelial 43
1.3.2.2.1. Enfermedad de Bowen 43
1.3.2.2.2. Eritroplasia de Queyrat 44
1.3.2.2.3. Papulosis bowenoide 44
1.3.3. Carcinoma epidermoide 44
1.3.3.1. Histología del cáncer de pene 45
1.3.3.1.1. Carcinoma epidermoide de tipo común 46
1.3.3.1.2. Carcinoma basaloide 46
1.3.3.1.3. Carcinoma verruciforme 47
1.3.3.1.4. Carcinoma sarcomatoide 49
1.3.3.1.5. Carcinoma adenoescamoso 49
1.3.4. HPV y cáncer de pene 50

1.4. Neoplasias de vulva 50
1.4.1. Epidemiología del cáncer de vulva 50
1.4.2. Lesiones preneoplásicas del cáncer de vulva 51
1.4.2.1. Condiloma acuminado 51
1.4.2.2. Lesiones escamosas intraepiteliales y carcinoma *in situ* 51
1.4.3. Histología del cáncer de vulva 52
1.4.3.1. Carcinoma epidermoide de tipo común 52
1.4.3.2. Carcinoma basaloide 52
1.4.3.3. Carcinoma verrucoso 53
1.4.3.4. Carcinoma sarcomatoide 53
1.4.3.5. Carcinoma condilomatoso 53
1.4.4. HPV y cáncer de vulva 54

2. OBJETIVOS 55

3. MATERIAL Y MÉTODOS 57

3.1. Selección de los casos de estudio 58
3.1.1. Pacientes 58
3.1.2. Muestras 58
3.2. Clasificación histológica de las lesiones 58
3.3. Técnicas histoquímicas 59
3.4. Técnicas moleculares 61
3.4.1. Técnica de PCR 61
3.4.1.1. Extracción de ADN 61
3.4.1.2. Amplificación mediante PCR 62
3.4.1.2.1. *Primers* 62
3.4.1.2.2. Descripción de la técnica 63
3.4.1.3. Visualización de los resultados 65
3.4.1.4. Controles 66
3.4.2. Identificación de genotipos 67
3.5 Técnicas inmunohistoquímicas 68
3.5.1. Detección inmunohistoquímica de proteína p53 69
3.5.2. Detección inmunohistoquímica de proteína p16 70
3.6. Tratamiento estadístico de los datos 71

4. RESULTADOS 72

4.1. Muestras 73
4.1.1. Estudio histológico 74
4.1.1.1. Tipos histológicos de carcinomas de pene 74
4.1.1.2. Tipos histológicos de carcinomas de vulva 82
4.1.2. Resultados de los estudios de PCR 87
4.1.2.1. Detección de HPV en casos de carcinoma de pene 87
4.1.2.2. Detección de HPV en casos de carcinoma de vulva 87
4.1.2.3. Análisis de la sensibilidad de la técnica 88
4.1.2.4. Genotipado de las muestras 88
4.1.3. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos 90
4.1.3.1. Análisis inmunohistoquímico de p53 en carcinomas de región genital externa 90
4.1.3.2. Análisis inmunohistoquímico de p16 en carcinomas de región genital externa 92
4.1.3.3. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de pene 94
4.1.3.4. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de vulva 95
4.2. Pacientes 96
4.2.1. Número de pacientes seleccionados 96
4.2.2. Edad de los pacientes 96
4.2.3. Estudio histológico 97
4.2.3.1. Tipos histológicos de carcinomas de pene por pacientes 97
4.2.3.2. Tipos histológicos de carcinomas de vulva por pacientes 98
4.2.4. Resultados de los estudios de PCR 99
4.2.4.1. Detección de HPV en casos de carcinoma de pene 99
4.2.4.2. Detección de HPV en casos de carcinoma de vulva 100
4.2.4.3. Genotipos encontrados 100
4.2.5. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos 102
4.2.5.1. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de pene 102
4.2.5.2. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcnomas de vulva 103

5. DISCUSIÓN **105**

5.1. Análisis de la tasa global de incidencia de HPV en carcinomas de región genital externa **106**
5.1.1. Tasa de incidencia de HPV en carcinomas de pene **106**
5.1.2. Análisis de causas para la alta incidencia detectada en nuestro trabajo. **107**
5.1.3. Tasa de incidencia de HPV en carcinomas de vulva **109**
5.1.4. Análisis comparativo de la presencia de HPV en carcinomas de región genital externa masculina y femenina **111**
5.2. Análisis de la sensibilidad de los dos sets de *primers* utilizados **113**
5.2.1. Teoría para explicar la mayor sensibilidad de los *primers* My09/11 **113**
5.2.2. Demostración de la conveniencia de asociar diferentes *sets* de primers. **114**
5.3. Tipos histológicos encontrados y su correlación con la presencia de HPV **116**
5.4. Genotipos encontrados en los casos HPV+ **119**
5.5. Evaluación de la correlación entre la detección de HPV y la expresión de los genes supresores tumorales p16 y p53 **120**

6. CONCLUSIONES **125**

7. BIBLIOGRAFÍA **128**

8. ÍNDICE DE FIGURAS **144**

9. ÍNDICE DE TABLAS **149**

10. ANEXOS **152**

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BPV	Papilomavirus bovino
CDK	kinasas dependientes de ciclinas
CE	Carcinoma escamoso
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CFS	*Common Fragile Site*
CRPV	*Cottontail Rabbit Papillomavirus*/Papilomavirus del conejo cola de algodón
Da	Dalton
DAB	Diaminobencidina
dATP	Didesoxiadenina trifosfato
dCTP	Didesoxicitosina trifostato
dGTP	Didesoxiguanina trifostato
dNTP	Didesoxinucleótido trifostato
dTTP	Didesoxitimidina trifostato
E1	Proteína E1 del Papilomavirus humano
E2	Proteína E2 del Papilomavirus humano
E4	Proteína E4 del Papilomavirus humano
E5	Proteína E5 del Papilomavirus humano
E6	Proteína E6 del Papilomavirus humano
E7	Proteína E7 del Papilomavirus humano
E. coli	*Eschechiria coli*
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico

HDCA	Histona Deacetilasa
HPV	Papilomavirus humano
HE	Tinción Hematoxilina-Eosina
hTERT	subunidad catalítica de la telomerasa
Kb	kilobase
KDa	KiloDalton
L1	Proteína mayor de la cápside del Papilomavirus humano
L2	Proteína menor de la cápside del Papilomavirus humano
LCR	*Long Control Region*
NMSC	Cáncer de piel no melanocítico
ORF	*Open Read Frame*/Fragmento de Lectura Abierta
pb	pares de bases
P.C.R.	*Polymerase Chain Reaction*/Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIN	*Penile intraepithelial neoplasia*
pRB	proteína del Retinoblastoma
***Taq* polimerasa**	Polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus*
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VIN	*Vulvar Intraaepithelial neoplasia*

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Desde el descubrimiento de la implicación del Virus del Papiloma Humano (HPV) en los cánceres cervicales se ha iniciado una búsqueda de marcadores clínicos que faciliten el diagnóstico de la infección de manera rutinaria en la clínica diaria. Además de estos marcadores, las investigaciones en este campo se han ampliado al estudio de otras neoplasias de epitelios escamosos, intentando relacionar el HPV como agente etiopatogénico de los mismos.

El presente trabajo trata de estudiar la presencia y relación del HPV con las neoplasias genitales menos estudiadas hasta el momento, como son las de hombre (en pene) y las de mujeres pero en localizaciones distintas del cérvix, vulva en este caso. Así mismo, también se pretende ponderar el posible uso en estos carcinomas de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados en los carcinomas de cérvix.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

Los Papilomavirus pertenecen a la familia Papillomaviridae, familia de virus con ADN de simetría icosaédrica, genoma circular y que carecen de envoltura (Büchen-Osmond, 2006).

Hasta 2005 los papilomavirus eran incluidos en la Familia Papovaviridae, junto a poliovirus y el virus vacuolante de simios SV40 (incluido finalmente en los poliovirus), pero el descubrimiento continuo en los últimos años de nuevos géneros de papilomavirus, y las diferencias entre los géneros que componían esta Familia Papovaviridae, llevó al establecimiento de los papilomavirus como una familia independiente.

1.1.1. Evolución de los conocimientos sobre papilomavirus

La primera referencia de los papilomavirus como agentes patógenos en humanos, fue el postulado en 1907 por parte de Ciuffo, de que las verrugas tenían un origen vírico. En 1924 se estableció la etiología vírica del condiloma acuminado.

En 1933 se aisló por primera vez un papilomavirus. El aislamiento lo llevó a cabo Richard Shope en un conejo (Rous et al, 1935). Sin embargo, no fue hasta la década de 1940 cuando se pudieron realizar las primeras observaciones directas de partículas víricas en tejido, gracias a la microscopía electrónica. Mediante estas observaciones se demostró la teoría del origen vírico de las verrugas. Strauss, en la Universidad de Yale, en 1949 identificó el virus del papiloma cutáneo. En 1968, Dunn y Ogilvie demostraron partículas víricas en condilomas genitales.

Hasta finales de la década de los 60 se creía que las verrugas vulgares, las verrugas planas juveniles y las verrugas genitales eran producidas por el mismo virus del papiloma, y que las diferencias morfológicas se debían a la distinta localización. En 1969, se descubrió la heterogeneidad de los tipos de HPV al encontrarse diferente reactividad en suero de pacientes con lesiones verrucosas genitales y cutáneas.

Los primeros estudios con hibridación, realizados en 1974 sugirieron que los condilomas acuminados estaban producidos por más de un tipo de HPV. En 1976 se estableció la diferencia genética de los papilomas, identificándose cuatro tipos distintos de HPV.

En 1979, se acordó designar como un nuevo tipo de papilomavirus cuando tuviera menos del 50% de homología en su secuencia con los demás tipos.

En 1983 Dürst identificó ADN de HPV en cánceres cervicales (Krebs, 1989).

En la actualidad se han descrito más de 200 genotipos de papilomavirus en el mundo animal, de los cuales más de 100 (Bernard, 2005) se aíslan en el ser humano y al menos 30 tienen relación con el área genital (Munger et al, 2004).

1.1.2. Clasificación y estructura del Papilomavirus humano (HPV)

Los miembros pertenecientes a esta familia presentan cápsides no envueltas con simetría icosaédrica y de un tamaño de entre 40 y 55 nanómetros. La densidad de los viriones en CsCl es de 1,34 g/cm^3.

Respecto al genoma, éste constituye aproximadamente el 10-13% del peso de la partícula viral y consta de una molécula no segmentada y circular de ADN de doble cadena. El genoma completo tiene un tamaño de 5300-8000 nucleótidos y un contenido en G+C del 40-50%.

La actual clasificación de la Familia *Papillomaviridae* es:

- Familia *Papillomaviridae*:

- Género *Alphapapillomavirus*. Los miembros que pertenecen a este género infectan preferencialmente la mucosa oral o anogenital en humanos y primates. Especie tipo: HPV 32.

- Género *Betapapillomavirus.* Infectan principalmente la piel en humanos. Especie tipo: HPV 5.

- Género *Gammapapillomavirus.* Los miembros de este género causan lesiones cutáneas en el hospedador, que se distinguen histológicamente por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos especie-específicos. Especie tipo: HPV 4.

- Género *Deltapapillomavirus.* Inducen fibropapilomas en sus hospedadores. Especie tipo: Papilomavirus del alce europeo.

- Género *Epsilonpapillomavirus.* Las infecciones causan papilomas cutáneos en el ganado vacuno. Especie tipo: Papilomavirus bovino 5 (BPV 5).

- Género *Zetapapillomavirus.* Las infecciones causan lesiones cutáneas en caballos. Especie tipo: Papilomavirus equino 1.

- Género *Gammapapillomavirus.* Causan lesiones cutáneas en aves. Especie tipo: Papilomavirus del pinzón.

- Género *Etapapillomavirus.* Causan lesiones cutáneas en aves. Especie tipo: Papilomavirus del pinzón.

- Género *Thetapapillomavirus.* Causan lesiones cutáneas en aves. Especie tipo: Papilomavirus del loro gris de cola roja.

- Género *Iotapapillomavirus.* Causan lesiones cutáneas en roedores. Especie tipo: Papilomavirus de la rata africana.

- Género *Kappapapillomavirus.* Causan lesiones en piel y mucosas de roedores. Especie tipo: Papilomavirus del conejo de cola de algodón (CRPV).

- Género *Lambdapapillomavirus.* Causan lesiones en piel y mucosas en perros y gatos. Especie tipo: Papilomavirus canino oral.

- Género *Mupapillomavirus.* Causan lesiones cutáneas distinguibles histológicamente por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos especie-específicos. Especie tipo: HPV 1.

- Género *Nupapillomavirus.* Causan lesiones cutáneas benignas y malignas en el hospedador. Especie tipo: HPV 41.

- Género *Xipapillomavirus.* Provocan la aparición de papilomas en superficies cutáneas o mucosas del ganado. Especie tipo: Papilomavirus bovino 3 (BPV 3).

- Género *Omikronpapillomavirus.* Aislados de verrugas genitales de cetáceos. Especie tipo: Papilomavirus de la marsopa negra.

- Género *Pipapillomavirus.* Causan lesiones en mucosas de hámsters. Especie tipo: Papilomavirus oral del hámster.

Se clasifican según el hospedador que infectan (en general cada especie es parasitada por tipos diferentes de virus) y en función de las diferencias del ADN. La dificultad de cultivar *in vitro* el virus humano ha hecho necesario recurrir a estudios del grado de homología del ADN por técnicas de hibridación. Para la tipificación se usa la homología de secuencias en las regiones *L1, E6 y E7*, si la homología es superior al 10% se considera que son tipos distintos, si es de entre 2–10% se consideran subtipos y por debajo de un 2% de homología se consideran variantes (de Villiers et al, 2004).

Recientemente, gracias a los avances en secuenciación del genoma se han redefinido los criterios de clasificación. Se compara la secuencia de los genes *L1, E6 y E7* de HPV con las de los tipos previamente reconocidos, y si la homología es menor del 90% se considera un nuevo tipo. Cuando la homología es superior al 90%, pero no idéntica, se considera como un nuevo subtipo (Isom et al, 1996).

Los HPV de transmisión genital se clasifican dentro de un supergrupo conocido como Alfa-papilomavirus o supergrupo A (de Villiers et al, 2004). A este grupo pertenecen virus como los HPV 6 y 11 que afectan a alrededor del 1% de la población sexual activa, estando generalmente asociados con papilomas benignos. Por contraste, los virus de alto riesgo del supergrupo A, como los HPV 16 y 18, causan lesiones en la mucosa genital que pueden progresar a lesiones neoplásicas de alto grado y cáncer. Este supergrupo de papilomavirus también incluye virus cuyo tropismo primario es a nivel cutáneo como los HPV 2 y 10 y son la principal causa de las verrugas comunes.

El segundo grupo importante de papilomavirus está incluido dentro del supergrupo B. Los virus del subgrupo B1, como el HPV 5 (también conocidos como Beta-papilomavirus), causan lesiones inaparentes o latentes en la población general, aunque pueden llegar a ser un problema en individuos inmunodeprimidos y en individuos con defectos hereditarios, ya que son los más susceptibles a la infección por este subgrupo. Algunos pacientes pueden desarrollar a nivel del sitio de infección por el HPV y a través de los virus de este subgrupo un cáncer de piel epitelial no melanocítico (NMSC). Por contraste, los virus del subgrupo B2, como el HPV 4 (también conocidos como Gamma-papilomavirus) causan verrugas cutáneas en la población general, que pueden parecerse superficialmente a las causadas por papilomavirus del supergrupo A como el HPV 2.

El grupo restante de papilomavirus está contenido dentro del supergrupo E (también conocidos como Mu y Nu-papilomavirus). Sólo se conocen tres miembros a nivel humano, causan papilomas cutáneos en la población general. El HPV 1 es el más estudiado de este grupo y como el HPV 2, causa verrugas comunes y palmares (Fig. 1).

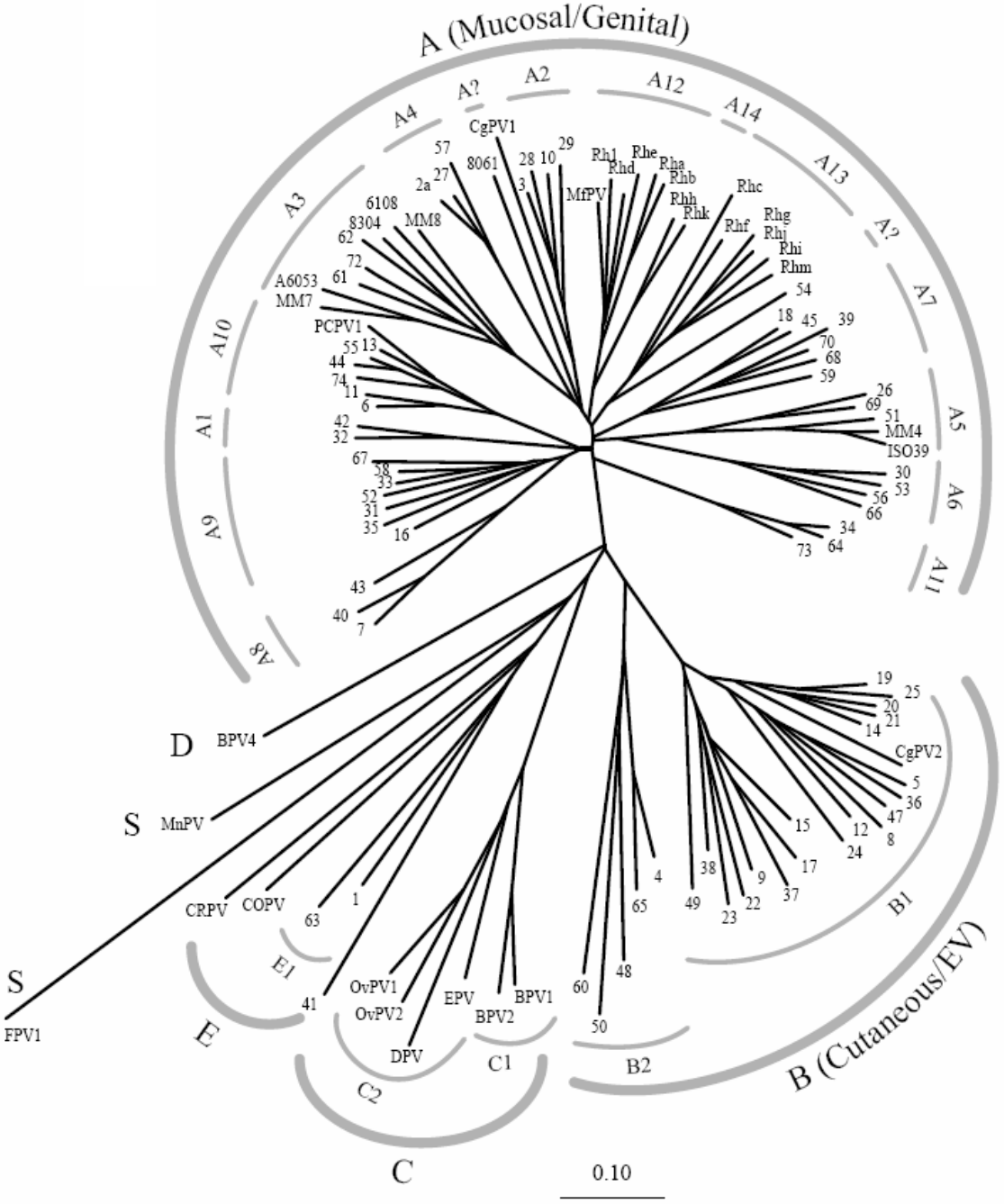

Fig. 1: Árbol filogenético que representa los tipos conocidos de papilomavirus y su relación (Myers et al, 1997)

1.1.3. Enfermedades relacionadas con los distintos tipos de HPV

Además de existir una correlación entre los distintos genotipos de papilomavirus y la especie animal a la que infectan, existe también una correlación entre los distintos genotipos de HPV y las lesiones que producen. Estas lesiones en humanos y los genotipos relacionados han sido descritos por Smotkin (1989).

Tabla 1: Genotipos de HPV y lesiones producidas en humanos

Genotipo de HPV	***Lesión producida***
1,4	*Verrugas plantares y palmares profundas (Fig. 2)*
2,7,29,60	*Verrugas vulgares (Fig. 3)*
3,10,28	*Verrugas planas juveniles*
5	*Lesiones maculares en la epidermodisplasia verruciforme*
6,11	*Condiloma acuminado y displasia de bajo grado*
8,9,12,14,1517,19-25,36	*Epidermodisplasia verruciforme*
13,32	*Hiperplasia epitelial oral focal (Enfermedad de Heck)*
16,18,31,33,39,45,52,58	*Displasia de alto grado y carcinoma genital invasivo (Fig. 4)*
26	*Verrugas cutáneas en inmunodeprimidos*
27	*Verrugas cutáneas en trasplantados renales*
30, 40	*Carcinoma laríngeo*
34	*Enfermedad de Bowen extragenital*
35	*Adenocarcinoma cervical*
37	*Queratoacantoma*
38	*Melanoma maligno (1 caso)*
41	*Condiloma y verrugas planas cutáneas*
42	*Papiloma vulvar*
51	*Condiloma cervical*
53,56,59	*CIN*
54	*Condiloma acuminado*
55	*Papulosis bowenoide*
57	*CIN, verrugas cutáneas, papilomas nasales*

Fig.2: Lesiones típicas de verrugas plantares producidas por HPV 1

Fig.3: Lesiones de verrugas virales de tipo común producidas por HPV 2

Fig.4: Carcinoma de cérvix en el que el HPV 16 juega un papel fundamental

1.1.4. Organización genómica de los papilomavirus

La organización genómica de los diferentes tipos de HPV tiene una estructura bastante similar. Las secuencias que codifican proteínas (marcos de lectura abierta u ORF) ocupan posiciones parecidas en la doble cadena de ADN y tienen longitudes semejantes.

En el genoma de HPV se distingue una región temprana (ORF E) o "*Early"*. Esta región contiene los genes *E1* a *E7*, que codifican las proteínas implicadas en los procesos de replicación y transcripción del ADN viral; y una región tardía (ORF L) o "*Late"*, que contiene los genes *L1* y *L2* implicados en la producción de la cápside viral (Fig. 5).

Esta diferenciación se basa en la suposición de que los fenómenos iniciales de la infección incluyen la transformación celular y la replicación del ADN, a través de proteínas codificadas por los genes E; por otro lado, las regiones tardías o L codifican las proteínas de la cápside, expresados por lo tanto en las etapas finales de la infección.

Mientras que los genes de expresión temprana difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de HPV, los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta peculiaridad convierte a estos genes, y especialmente a *L1*, en la diana principal de la detección de ADN viral por métodos "consenso", al contrario de la detección "tipo-específica" que utilizará genes con alta variabilidad intertipo como *E6* y *E7* (Chan et al, 1995).

Existe una región en todos los HPV de entre 600 y 900 pares de bases, llamada región de control larga no codificante URR o *long control region* (LCR), que separa los ORF tempranos y tardíos, y que contiene las secuencias de control de la transcripción e inicio de la replicación (Turek, 1994).

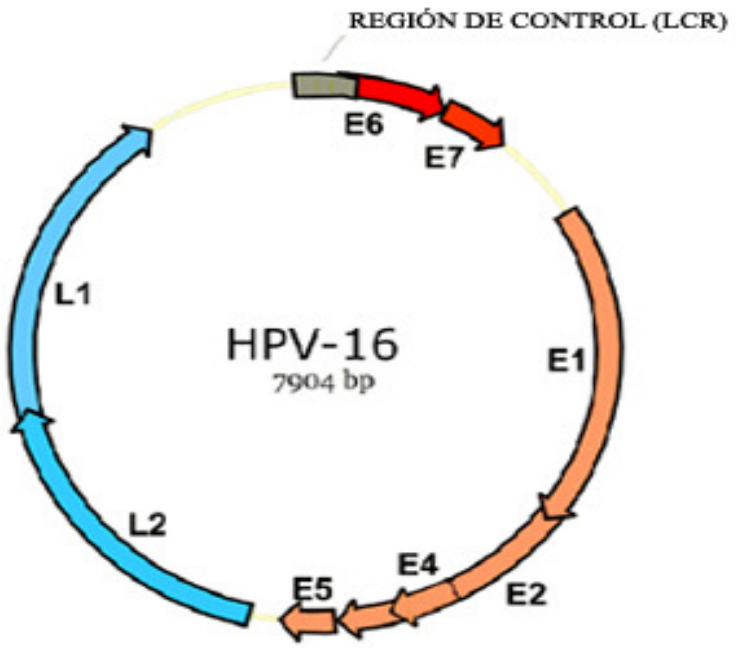

Fig. 5: Esquema del genoma circular de HPV 16 (Modificado de figura de libre acceso en web: www.answers.com/topic/hpv-16-genome-organization-png-1)

La mayoría de los estudios sobre los diferentes genes de los papilomavirus se han realizado en BPV 1 (papilomavirus bovino 1), que puede replicarse y transformarse *in vitro*. En BPV 1, las funciones de transformación (capacidad de modificar las propiedades de crecimiento de las células en cultivo) se localizan en las regiones *E6* y *E5*, la maduración de la partícula vírica se asocia a *E4*, el mantenimiento de gran número de copias de ADN vírico a *E6* y *E7*, mientras que *E2* codifica las proteínas reguladoras que se unen a la región LCR, modulando el grado de transcripción vírica, estimulándola (transactivación) o suprimiéndola (represión) (You et al, 2004).

En cuanto a la región tardía, la proteína L1 es el componente principal de la cápside (representa el 80% del peso del virión). Tiene un peso molecular de 56.000 daltons (Da), es el antígeno específico de grupo y se expresa en las lesiones de coilocitosis. La proteína secundaria de la cápside, L2, tiene un peso molecular de alrededor de 76.000 Da y es más variable entre los distintos tipos de HPV (Arends et al, 1990).

La transcripción de las regiones tardías parece influida por reguladores celulares, que aparecen sólo en las células de las capas superiores e intermedias del epitelio escamoso (Crum y Nuovo, 1991).

1.1.5. Genes y proteínas del HPV

1.1.5.1. E1

La región más conservada de todos los HPV es la que codifica la proteína E1. Esta proteína tiene un peso molecular de 68 KDa y es expresada en bajos niveles en células HPV- positivas.

E1 participa en la replicación del plásmido viral y, junto con E2, suele perderse en los carcinomas genitales, donde HPV aparece integrado en el genoma celular. Esta pérdida de parte del genoma viral parece ser un factor importante en la progresión tumoral (Schwarz et al, 1985).

Al estudiar HPV con su genoma íntegro se comprueba que las mutaciones de los genes *E1* ó *E2* incrementan de forma importante la capacidad de inmortalización de HPV, con resultado similar a la ventaja de crecimiento que otorga su disrupción e integración de *E6* y *E7* en el ADN de la célula (Romanczuk y Howley, 1992). En BPV, E1 codifica factores necesarios para el mantenimiento del genoma vírico dentro de las células transformadas.

Las semejanzas entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por *E1* y el *large T antigen* de SV40, hicieron suponer que poseía funciones de 3'-5' ADN helicasa/ATPasa, y que participaba en la iniciación de la replicación del ADN vírico. Esto se ha confirmado tanto para BPV como para HPV. E1 forma dos dominios, siendo el N-terminal el responsable de la unión al ADN, y el C-terminal el responsable de la actividad enzimática (Hughes y Romanos, 1993; Thorner et al, 1993).

Existe una región en el extremo 5' del ORF *E1* (TAAAACGAAAGT) que corresponde al segmento más largo con homología completa entre todos los tipos de HPV, y que codifica siempre los mismos aminoácidos. Aunque su función no es conocida se piensa que podría codificar los aminoácidos necesarios para la unión con factores celulares que afectan a las funciones de replicación vírica (Amin et al, 2000).

La proteína E1 también se une a ADN polimerasa α y ayuda a reclutar complejos de la replicación celular para la replicación viral (Conger et al, 1999).

1.1.5.2. E2

La proteína E2 es requerida para la replicación viral y la regulación de la transcripción. Su peso molecular es de 50 KDa aproximadamente y funciona como dímero. El extremo C-terminal es el que se une a E1 (Cheng et al, 2000).

En BPV se conocen al menos tres polipéptidos que regulan de forma diferente la expresión génica vírica (Bouvard et al, 1994). Las proteínas E1 y E2 (en forma de dímeros) constituyen un complejo que se une al ADN en el sitio de inicio de la síntesis. En HPV, E2 es también importante para la replicación vírica, hasta el punto que se ha propuesto el empleo de medidas terapéuticas frente a esta proteína para frenar la replicación vírica en lesiones condilomatosas y verrugas (Cowsert et al, 1993). El desarrollo de neoplasias implica a menudo la pérdida de esta región, con la integración de *E6* y *E7* en el ADN celular, ya que la proteína codificada por el ORF *E2* actúa sobre el promotor de la transcripción de *E6/E7* de forma negativa (Tan et al, 1994).

En la mayoría de los casos una porción del ADN viral se fragmenta por la región *E2* perdiendo ésta su capacidad de actuar sobre la región reguladora (LCR) y de dar la orden de que ésta mantenga reprimida la expresión de *E6* y *E7*. De este modo, una pequeña cantidad del virus estará desregulada y producirá grandes cantidades de proteína E6 y E7 (Jeon et al, 1995), las cuales iniciarán el proceso de bloqueo de las proteínas celulares p53 y proteína de Retiniblastoma (pRb) de modo altamente efectivo.

1.1.5.3. E4

HPV codifica tres proteínas tardías, que se producen únicamente en los queratinocitos maduros con diferenciación completa, y localizados en las capas más superficiales de los epitelios escamosos. Dos de estas proteínas son estructurales (L1 y L2) y corresponden a componentes de la cápside del virus (Doorbar, 2005).

La tercera, denominada E1-E4, deriva principalmente del ORF *E4*, que representa una región con elevada divergencia entre los diferentes tipos de HPV. Esta proteína tiene una secuencia corta, que abarca los nucleótidos 3399-3648 del genoma viral. E1-E4 no es un componente de la partícula vírica, ni parece necesaria para la transformación celular. Sin embargo, en ciertas lesiones se acumula en grandes cantidades en el citoplasma celular, alcanzado hasta el 30% del total de las proteínas de la célula, y

produce un colapso de la red de filamentos intermedios de queratina, que constituyen el citoesqueleto celular (Doorbar et al, 1991).

Aunque la función de la proteína E4 no es conocida, se ha comprobado que actúa como una proteína transportadora de zinc (Roberts et al, 1994).

1.1.5.4. E5

E5 no parece participar de forma importante en la carcinogénesis mediada por HPV. En estudios con líneas de cultivo, E5, tanto de HPV 6 como de HPV 16, resultan mitógenos para los queratinocitos, actuando de forma sinérgica con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los queratinocitos que expresan E5 muestran un incremento del número de receptores para EGF de dos a cinco veces mayor que en células normales (Straight et al, 1993).

La proteína viral E5 podría cooperar con E7 en el estímulo de la proliferación celular. Las células que poseen E5 muestran incremento de la expresión de los genes *c-fos* y *c-jun*. Complejos de *c-fos* y *c-jun* constituyen el factor de transcripción AP-1 que estimula la actividad del promotor de E6/E7 (Bouvard et al, 1994).

1.1.5.5. E6

La proteína E6 de HPV, tanto de los genotipos de alto riesgo como de los de bajo riesgo, tiene aproximadamente 150 aminoácidos de tamaño y contiene dos dominios de unión a zinc con el motivo Cys-X-X-Cys. Las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo se encuentran distribuidas tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, y se han descrito uniones con hasta 12 proteínas diferentes (zur Hausen, 2002), entre las que están p53, paxilina, p300/CBP, p73, la proteína de unión de calcio E6-BP y el factor de regulación del interferón IRF-3; aunque la relevancia fisiológica de la interacción con cada una de estas proteínas no está claramente identificada.

E6 de los HPV de alto riesgo (HR-HPV) se une a la proteína supresora tumoral p53 como parte de un complejo trimérico junto con la ligasa de ubiquitina celular E6AP. La formación de este complejo provoca la ubiquitinización de p53 y su degradación en proteasomas, llevando a una reducción de la vida media de p53 de varias horas a menos de 20 minutos en queratinocitos (Hubbert et al, 1992).

Simultáneamente, la unión de E6 a E6AP también supone la ubiquitinización de E6AP, lo que posibilita que E6 pueda regular los niveles de los sustratos celulares naturales de E6AP mediante su degradación. Algunas de estas proteínas afectadas serían las de la familia Src de tirosina kinasas, que interactúan con una amplia variedad de vías de señalización celular (Frame et al, 2002).

E6 puede también regular la actividad de p53 indirectamente a través de su asociación con p300/CBP, un coactivador de p53. Al aumentar la tasa de eliminación de p53, todas estas acciones conducen a que se produzcan duplicaciones cromosómicas y anormalidades centroméricas, debido a la capacidad de regulación de p53 de los puntos de control entre las fases celulares G1/S y G2/M (Kastan et al, 1993).

La transcripción de la proteína celular p21 depende de p53, por lo que también disminuirá la cantidad de ésta, cuya función es la de inhibición de las kinasas dependientes de ciclinas (cdks). Se inhibe por lo tanto el freno que normalmente ejerce p21 sobre el ciclo celular. Por otro lado, la degradación de p53 mediada por E6 impide la activación de genes que inducen la apoptosis, como *Bax*. Bax dejará libre a Bcl2 que llevará a cabo su función de bloquear la apoptosis o muerte celular programada (Tommasino et al, 2003).

Otra de las funciones principales de la proteína E6 de HR-HPV, que resulta importante para la inmortalización de la célula, es la activación de la subunidad catalítica de la telomerasa, hTERT (Klingelhutz et al, 1996). Esta activación parece estar mediada por la acción combinada de E6 con Myc y Sp-1, lo que conduce a un aumento de la actividad transcripcional del promotor *hTERT* (Oh et al, 2001).

A pesar de todo esto, el papel primordial de E6 en el ciclo viral productivo no parece ser el de inducir la transformación o la inmortalización, sino que parece más encaminado a la facilitación de algunos aspectos de la replicación viral (Münger et al, 2002).

1.1.5.6. E7

La proteína E7 de los HPV tiene aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y se encuentra mayoritariamente en el núcleo celular. La principal acción de esta proteína es su habilidad para asociarse a las proteínas de la familia de pRb (Dyson et al, 1989). Esta unión se realiza mediante una de las tres regiones conservadas que están

presentes en E7 de todos los HR-HPV: CR1 en el extremo N Terminal; CR2, que contiene un motivo L-X-C-X-E que es el que se une a pRb; y CR3, que contiene dos motivos *zinc finger-like*.

La proteína E7 del HPV 16 se une a la forma no fosforilada de pRB. Esta forma no fosforilada de pRb forma complejos con el factor de transcripción E2F/DP1, que se unen a los promotores de los genes involucrados en el paso a la fase S del ciclo celular o a apoptosis, reprimiendo su transcripción. En el paso de G1 a S, los complejos ciclina-kinasa fosforilan a pRb, provocando la liberación de pRb de los complejos de E2F y la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de ADN. La unión de E7 secuestra pRb de los complejos E2F/DP1, llevando a una activación constitutiva de estos genes (Cobrinik et al, 1992). Adicionalmente, la unión de E7 provoca la degradación de pRb mediante la ruta ubiquitina-proteasoma.

Además de su acción sobre pRb, las proteínas E7 virales se asocian con las ciclinas A y E, así como con los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas p21 y p27, aumentando su actividad en la regulación del ciclo celular. Sobre éstas, p21 y p27, ejercen su acción bloqueando su actividad inhibidora (Zerfass et al, 1995).

Un tercer grupo de proteínas a las que se une E7 son las Histonas Deacetilasas (HDCAs) (Brehm, 1999).

Una de las propiedades menos estudiadas de E7 de HR-HPV es su habilidad para inducir la inestabilidad genómica. En algunos cánceres HPV positivos se encuentran aneuploidias, lo que sugiere que estos cambios en el número de cromosomas son importantes para la progresión del cáncer (Pett et al, 2004).

La función viral de la proteína E7, así como la de E6, parece ser, al menos en parte, controlar el medio celular de un modo favorable para la replicación del genoma viral, la activación de vías transcripcionales y la inducción de síntesis de ADN, además de promover el crecimiento/desarrollo celular (Münger et al, 2002).

1.1.5.7. L1

L1 en HPV 16 se extiende desde el nucleótido 6153 al 6794 y codifica la proteína mayor de la cápside vírica. Esta proteína por sí sola es capaz de ensamblarse formado estructuras capsídicas vacías con alto potencial inmunogénico (Kirnbauer et al, 1992). Al

ser una región altamente conservada entre todos los diferentes tipos de HPV, sirve como molde para el diseño de los *primers* de consenso que permiten la detección de HPV con PCR (Kornegay et al, 2003). En carcinomas de cérvix su utilidad es menor que los *primers* frente a los ORF *E6* y *E7*, que son los que se conservan e integran en el genoma celular. Así, un estudio, comparando la eficacia de la detección de HPV en carcinomas cervicales con PCR, y empleando primers frente a *L1* y *E6* (específicos de tipo) encontró tasas del 25% y del 54%, respectivamente (Park et al, 2001).

1.1.5.8. L2

L2 codifica la proteína menor de la cápside de HPV. Para llevarse a cabo la encapsidación del virus son necesarias interacciones ADN-proteína y proteína-proteína. L2 es capaz de unirse al propio ADN de HPV (a diferencia de L1), concretamente por su porción N-terminal. Su función sería la de completar el ensamblaje de la cápside introduciendo el ADN vírico dentro de las partículas formadas por la fusión de los dos componentes estructurales de la cápside, las proteínas L1 y L2 (Zhou et al, 1994).

1.1.6. Ciclo celular y replicación vírica

El desarrollo de las neoplasias, como el carcinoma escamoso (CE) de pene, supone un crecimiento progresivo e incontrolado de un grupo celular, que las distingue del resto de células normales. Esta proliferación se debe a que el ciclo celular desregula su maquinaria y sus fases se ven alteradas. Estas células se independizan de los controles celulares de manera que tendrán más facilidad para la proliferación, seleccionando este grupo celular y desarrollándose la neoplasia.

El ciclo celular es el fenómeno fisiológico por el cual una célula se divide en dos, permitiendo la viabilidad de los tejidos. Pero su función no es únicamente originar nuevas células, sino asegurar que el proceso se realice de forma debida y con la regulación adecuada. En el ciclo celular se suceden una serie de fases que se desarrollan de forma consecutiva y no se puede entrar en la siguiente sin completar la anterior. Las fases más importantes son la fase S (síntesis) en la que se replica el material genético y la fase M (mitosis) en el que se produce la división celular. Entre las fases S y M hay dos intervalos, las fases G1 y G2. Las células normalmente se encuentran en quiescencia o fase G0 (Fig. 6).

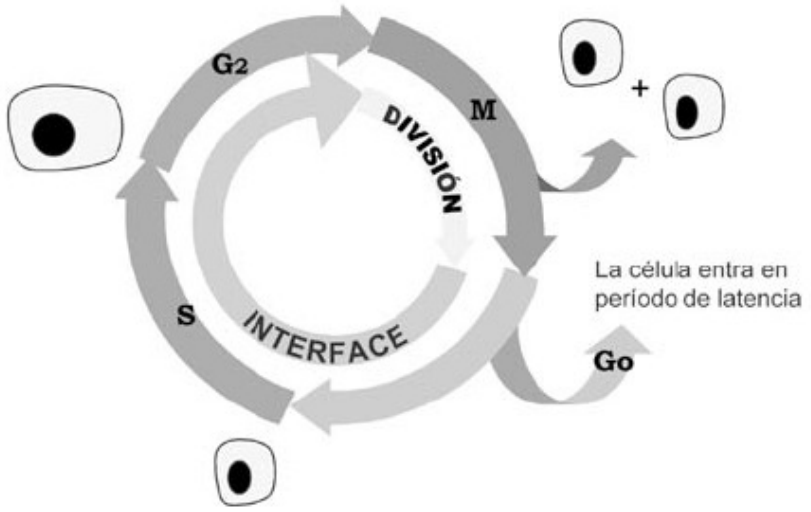

Fig. 6: Esquema del ciclo celular (Lomantto et al, 2002)

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular siguen un orden y supervisión estrictos. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular (Nashmyt, 1996). Existen dos tipos de controles: los *checkpoints* que controlan la finalización de las diferentes fases, cascadas de fosforilaciones de proteínas que hacen avanzar el ciclo a la siguiente fase. El segundo control lo constituyen las quinasas dependientes de ciclinas (reciben este nombre porque sólo son activas al unirse a su ciclina específica) y las propias ciclinas, que según la fase del ciclo en que actúen regulan la transcripción o la actividad mitótica. A su vez, sobre las ciclinas actúan los diferentes factores de crecimiento (Nishitani et al, 2002).

Por último existen una serie de proteínas que actúan como inhibidores de las cdk, que se agrupan en dos familias: CIP/KIP (p21, p27, p57) e INK4 (p15, p16, p18, p19) y que actúan como genes supresores (Harper, 1997).

Otras proteínas muy importantes tanto en el ciclo celular como en el desarrollo del CE son las proteínas producto de los genes supresores *p53* y *Rb*. La proteína p53 tiene diferentes acciones, la principal es unirse al ADN dañado permitiendo su reparación y regulando la expresión de diferentes genes, entre ellos *p21* que tiene capacidad para detener el ciclo en fase S. En caso de que no sea posible la reparación

del ADN dañado, p53 puede inducir la apoptosis mediante la estimulación de genes como *Bax*. No obstante p53 tiene otras acciones al tener una importante capacidad reguladora transcripcional de otros genes implicados en el ciclo celular (Tommasino et al, 2003).

La proteína Rb tiene un papel crucial al controlar el paso de G1 a M. Ejerce este control a través de su unión al factor de transcripción E2F, en su forma hipofosforilada actúa como supresor del mismo. Al fosforilarse libera el factor de transcripción permitiendo la progresión de la célula en el ciclo. La pRb volverá a estar hipofosforilada al finalizar la fase M. (Alcaraz et al, 2002).

Para que se desarrolle la infección, las partículas víricas tienen que ponerse en contacto con células epiteliales susceptibles de ser infectadas por el virus y que son aquéllas que poseen capacidad proliferativa, y posteriormente, dependen de la diferenciación del epitelio para completar su ciclo celular (Longworth MS, 2004; Doorbar, 2005).

El virus penetra a través de heridas en el epitelio y se adhiere a la superficie de las células basales (queratinocitos) por mecanismos aún poco conocidos, sufriendo un fenómeno de endocitosis con posterior destrucción de la cápside y transporte al núcleo. El receptor para la entrada del virus no se conoce actualmente; sin embargo el sulfato de heparina media el ataque inicial de los viriones a las células de la capa basal (Joyce, 1999), que están continuamente dividiéndose y proporcionan un reservorio de células para las capas suprabasales. Tras la entrada del virus en la célula pueden desarrollarse dos tipos de infección (Gross, 1997):

- Una *infección latente*, en la cual se mantiene el virus sin producción de partículas infecciosas. El ADN vírico permanece libre en el núcleo celular (en forma de episoma) y su replicación ocurre junto con la de la célula huésped. Este tipo de infección, al no producir particular víricas completas, no desarrolla el efecto citopático característico de HPV. El epitelio conserva su morfología normal, y para su detección son necesarios métodos moleculares.

- El otro tipo de infección es la llamada *infección productiva*, donde la replicación vírica ocurre independientemente de la de la célula infectada, generando grandes cantidades de ADN vírico infectivo.

La replicación vírica ocurre en las células de las capas intermedias y superficiales del epitelio, y factores transcripcionales específicos de diferenciación, producidos por la

célula, promueven la síntesis de proteínas víricas de la cápside. Esto produce el efecto citopático característico, detectable en citología o histología. La infección por el HPV de estas células permite la activación de la expresión de una cascada de genes víricos que resulta en la producción de aproximadamente 20 a 100 copias de ADN viral extracromosómico por célula. Las primeras proteínas virales expresadas son E1 y E2, que son necesarias para la replicación viral que tendrá lugar junto con la división celular de las células de la capa basal, así el genoma vírico será dividido dentro de las células hijas (Doorbar, 2005).

Posteriormente, algunas de estas células abandonan la capa basal y migran hacia el estrato granuloso, donde tendrá lugar la diferenciación y expresión de las proteínas víricas E6 y E7. La función de las proteínas E4 y E5 en el ciclo celular no se conoce totalmente pero se ha propuesto que pueden estar involucradas en la regulación de las funciones de la fase tardía. Las proteínas L1 y L2 forman la cápside icosaédrica, dando lugar a viriones completos en las capas más superficiales del epitelio (Fig. 7).

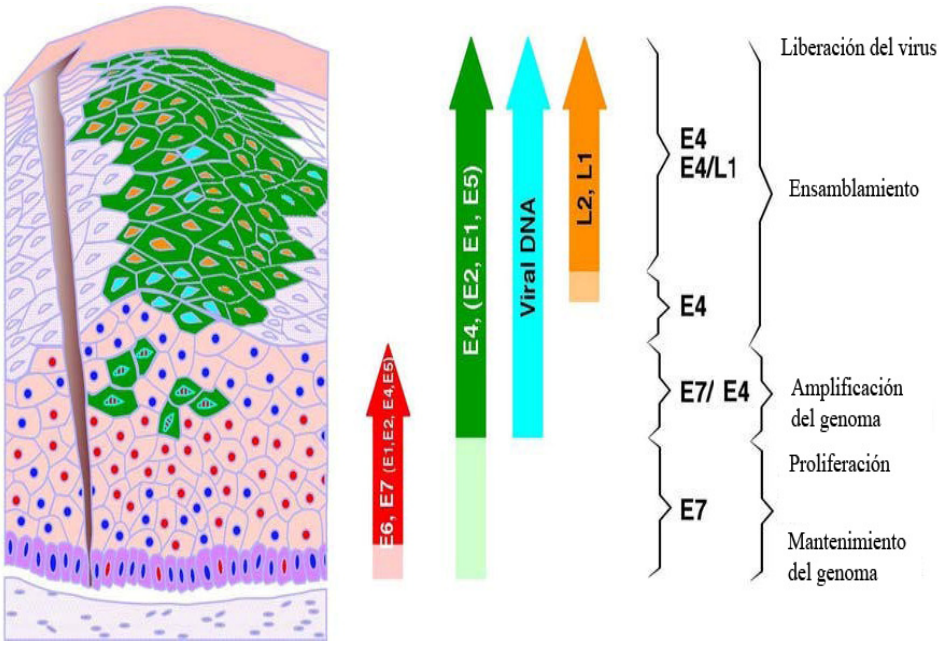

FIG. 7: Ciclo vital vírico y producción de proteínas virales asociada a la maduración del epitelio escamoso (Modificado de Doorbar, 2005)

1.1.7. Genes supresores tumorales relacionados con HPV

1.1.7.1. Proteína p53

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear compuesta de 393 aminoácidos y con un peso molecular de 53 KDa, codificada por el gen del mismo nombre, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13). En su estructura se diferencian cinco dominios de actividad diferentes, entre los que se encuentra uno de unión al ADN y un dominio de transactivación (Fig. 8).

La variedad *wild-type* de la proteína está presente en la mayoría de las células normales pero tiene una vida media corta, de unos pocos minutos. La proteína, en condiciones normales, es ubiquitinada y destruida por Mdm2, por lo que generalmente es indetectable por medios inmunohistoquímicos.

La mutación somática del gen *p53* es un hecho bastante frecuente en el desarrollo de neoplasias humanas y, al ser la proteína mutada más estable que la natural, ésta se acumula en niveles detectables en la célula. Por ejemplo, la acumulación de p53 se ha observado en el 76% de 212 lesiones malignas en humanos, incluyendo carcinomas de mama, colon y estómago, melanomas, carcinomas embrionarios testiculares, carcinoma transicional de vejiga, carcinoma uterino y sarcomas de tejidos blandos (Bartek et al, 1991).

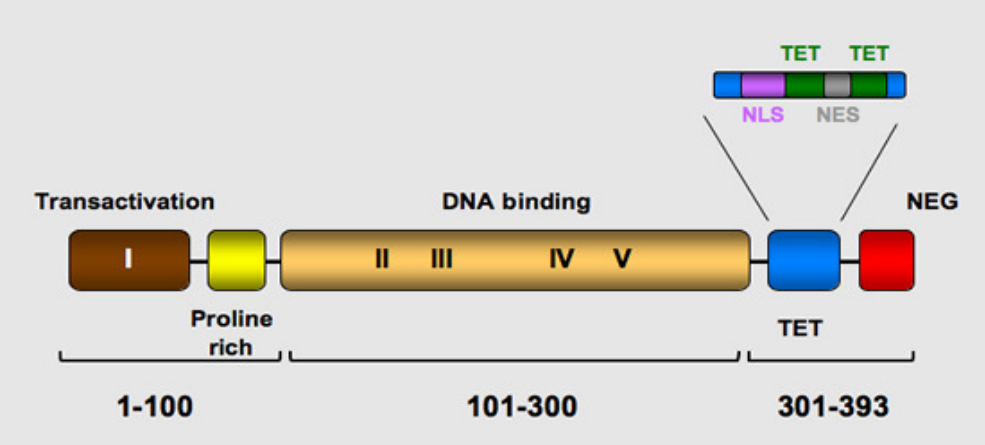

Fig. 8: Estructura de la proteína p53, representación mostrando los 5 dominios de que se compone (Imagen propiedad del Profesor Thierry Soussi, extraída de la web http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html)

1.1.7.2. Proteína p16

La progresión del ciclo celular eucariótico está controlada a través de complejos mecanismos que coordinan la expresión y modificación post-traduccional (p.e. fosforilaciones) de proteínas reguladoras del ciclo celular. De entre estas proteínas, el inhibidor de kinasas dependientes de ciclina $p16^{INK4a}$ juega un papel crucial en el control de la transición de la fase G1 a S del ciclo mediado por la proteína de retinoblastoma (pRB), (Rocco et al, 2001) (Fig. 9).

El gen *p16*^{INK4a} es un gen supresor tumoral que se encuentra funcionalmente inactivo en numerosos tumores, bien por mutación del propio gen o por hipermetilación del promotor. En estos casos, una fuerte sobreexpresión nuclear y citoplasmática de la proteína $p16^{INK4a}$ se puede detectar en algunos tipos de tumores, incluyendo el cáncer cervical (Xiong et al, 1996).

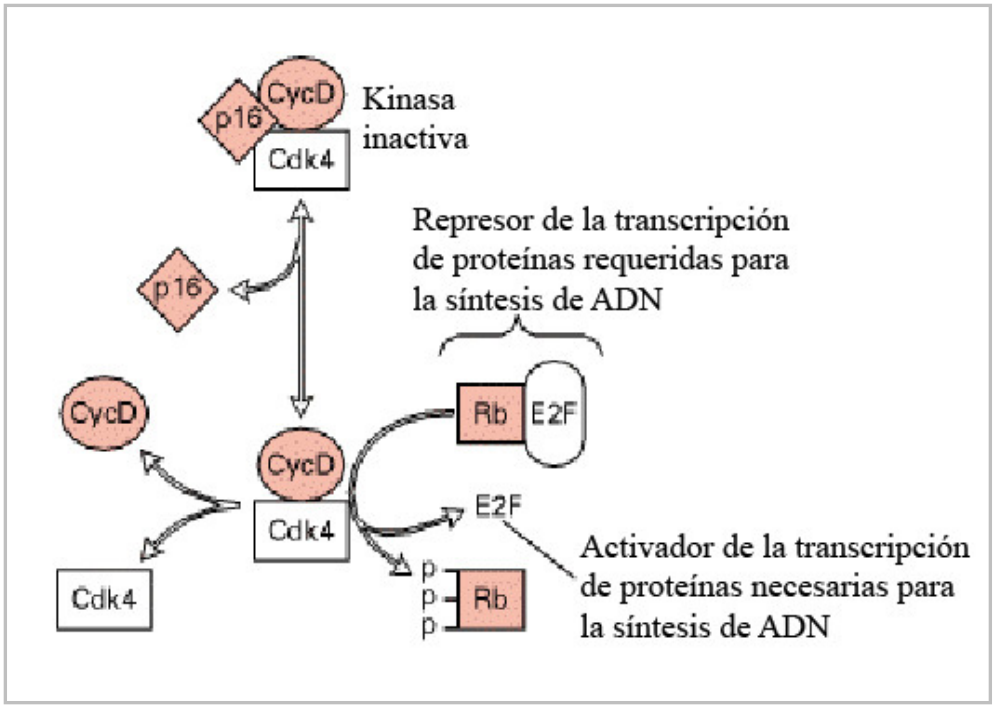

Fig. 9: Esquema representando la interacción p16-pRB (Modificado de Lodish et al, 2000)

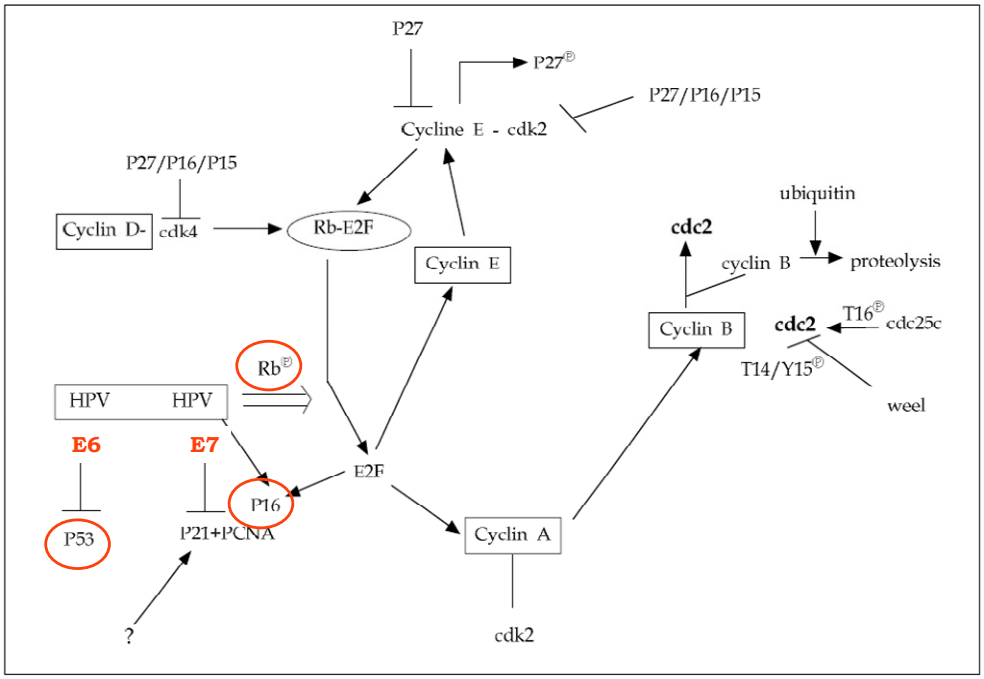

Fig. 10: Rutas de control del ciclo celular e interacciones con las proteínas virales E6 y E7 (Modificado de Cho et al, 2002)

1.1.8. Integración de HPV en el genoma celular

En el ciclo viral normal el genoma del HPV se encuentra en un estado circular (episomal) y en un número aproximado de entre 20-100 copias por célula del estrato basal del epitelio escamoso. La expresión en este estado de los oncogenes *E6* y *E7* está altamente regulada por la expresión de la proteína viral codificada por el gen *E2* de HPV (Laimins, 1998).

En un determinado porcentaje de las infecciones el genoma viral se integra en el genoma de la célula hospedadora, esta integración provoca la pérdida del ORF *E2* y con ello la de la expresión de dicha proteína reguladora. Esto lleva a la expresión desregulada de *E6* y *E7* que puede conducir a la situación de desregulación del ciclo celular (You et al, 2004).

También, dado que la expresión de hTERT es inhibida por E2 y activada por E6, la integración de los HPV de alto riesgo es una vía de activación de la telomerasa y, a través de acciones combinadas de E7, de inmortalización de las células epiteliales infectadas

(Klingelhutz et al, 1996; Veldman et al, 2001). Por todo ello las infecciones persistentes con HPV de alto riesgo se consideran un factor necesario pero no suficiente para la patogénesis de carcinomas.

La frecuencia con la que se detectan estas integraciones de genoma viral es alta, siendo de casi el 100% en casos HPV 18 positivos (Cullen et al, 1991; Pirami et al, 1997; Corden et al, 1999) y de más del 80% en casos HPV 16 positivos (Cullen et al, 1991; Pirami et al, 1997; Melsheimer et al, 2004).

El mecanismo por el cual se integra el genoma de HPV en el de la célula hospedadora no está del todo claro, ya que, al contrario que los retrovirus, no poseen información genética que codifique integrasa alguna y estas integraciones tampoco implican regiones homólogas de los genomas viral y celular.

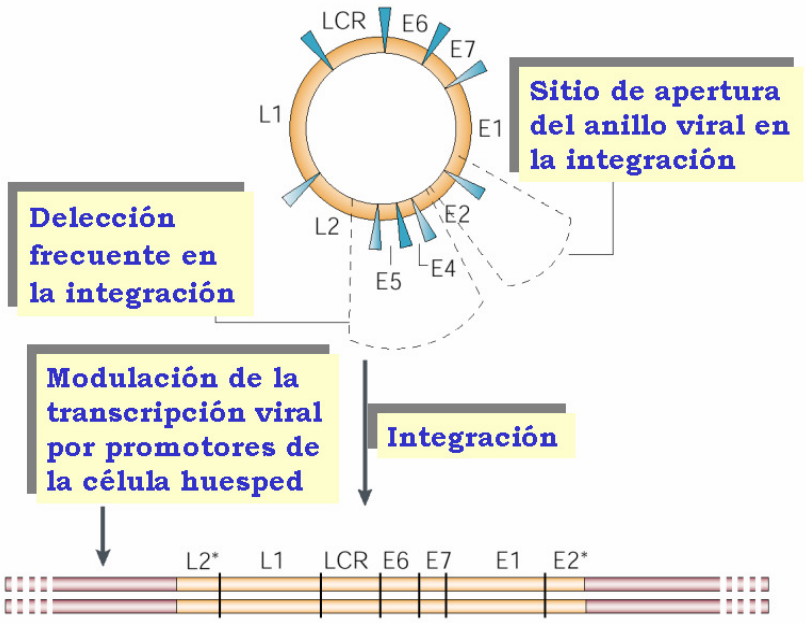

Fig. 11: Esquema de la integración de HPV en el ADN del hospedador (Modificado de zur Hausen, 2002)

Los sitios de integración hallados se encuentran distribuidos por todo el genoma hospedador, sin ninguna región predominante para ello, ni secuencia celular específica, incluso en la misma región genómica de distintos tumores se encuentra la inserción en diferentes secuencias de nucleótidos. A pesar de ello los estudios muestran una "predilección" de la integración en los denominados *common fragile sites* (CFSs). Estos CFSs ofrecen una relativa accesibilidad al ADN del HPV, con la consecuente ventaja

selectiva en el crecimiento determinada por el nivel de transcripción de los onocogenes virales (Wentzensen et al, 2004).

Algunos estudios sugieren una mutagenésis por inserción que jugaría papel en algunos carcinomas cervicales. En estos casos la inserción más frecuente, particularmente en carcinomas cervicales, es en la región del gen *Myc* en la banda cromosomal 8q24. También se ha observado una integración recurrente, aunque a una frecuencia baja, en los *loci Tert* y *Fancc*, en las bandas cromosomales 5p15 y 9q22, respectivamente (Wentzensen et al, 2002; Ferber et al, 2003). Un estudio más reciente apunta que la integración de HPV 18 en 8q24 en líneas celulares de carcinomas cervicales está asociada con el aumento de los niveles de expresión de ARNm de Myc y proteínas asociadas, en comparación con células que contienen integraciones en otros *loci* (Peter et al, 2006).

1.2. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES POR HPV

Desde principios de siglo se conocen las características microscópicas del condiloma acuminado. La presencia del papilomavirus en tales lesiones se confirmó por microscopía electrónica, detección del antígeno vírico, y finalmente por detección del ácido nucleico viral. Aún hoy, la microscopía del frotis citológico, o del corte histológico es el método más frecuente de diagnóstico de la infección.

1.2.1. Citología

El cambio citopático característico de la infección por HPV es la coilocitosis. Los coilocitos se encuentran en las capas superficiales e intermedias de la lesión y poseen un halo claro perinuclear. Los bordes de la célula están bien delimitados y acentuados por un material eosinófilo de condensación citoplásmica. El núcleo tiene un aspecto irregular, arrugado, siendo frecuente la binucleación, multinucleación, hipercromasia y picnosis (Fu et al, 1989).

Los distintos tipos de HPV no pueden identificarse a partir del aspecto microscópico de las lesiones que producen. No obstante, se ha sugerido que las mitosis atípicas indicarían la presencia de HPV 16, distinguiéndose por ello dos tipos de condilomas planos, unos con leve atipia citológica y otros con marcada atipia y mitosis

anómalas. Habría pues, coilocitos caracterizados por células agrandadas, con vacuolas perinucleares, núcleo único o múltiple y cromatina de distribución homogénea y otros coilocitos atípicos asociados con displasia, con mayor densidad e irregularidad de la cromatina, en relación con su aneuploidía, entre los cuales se encontraría HPV 16 (Jacquemeir et al, 1990) (Fig. 12).

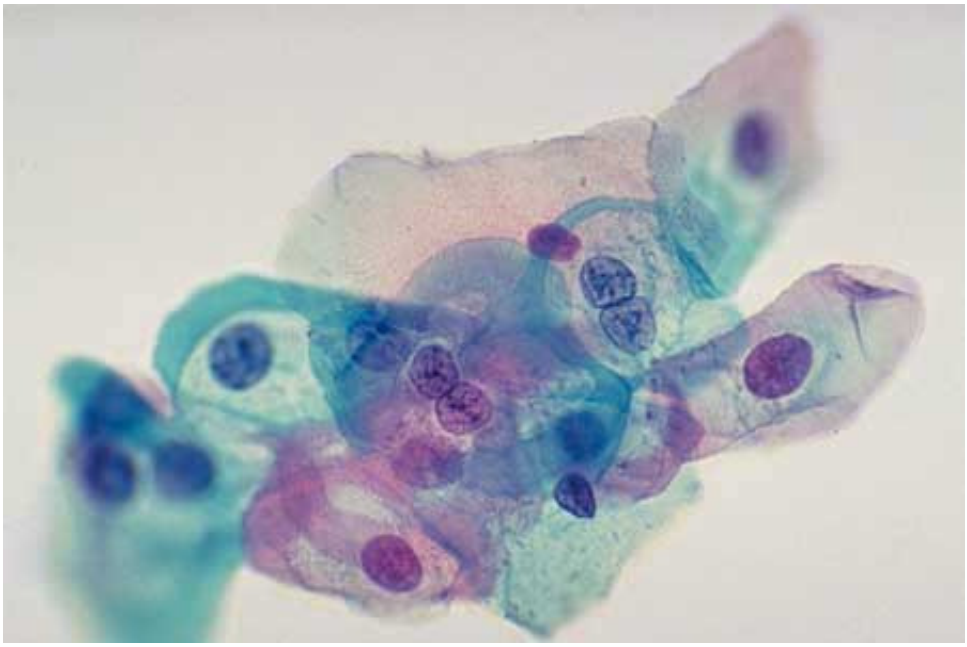

Fig. 12: Coilocitos de citoplasma claro en células epiteliales de frotis vaginal

Mediante técnicas de biología molecular se detecta el virus hasta en el 26% de mujeres con frotis citológicos y cortes histológicos normales (Beyer-Finkler et al, 1990). Estas técnicas detectan el virus aun cuando esté presente en cantidades tan pequeñas que no llega a producir efecto citopático.

1.2.2. Inmunohistoquímica

El método inmunohistoquímico se basa en la utilización de anticuerpos dirigidos frente a los antígenos de la cápside de HPV, concretamente frente a la proteína mayor de la cápside, codificada por el gen *L1*. Por la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa se visualiza la reacción en las células infectadas.

Esto se realiza con una incubación secuencial de la muestra estudiada, con anticuerpos frente a HPV obtenida de conejo, por ejemplo. Estos anticuerpos se fijarán al tejido en el caso de existir HPV. A continuación se añaden anticuerpos obtenidos en un animal diferente frente a los anticuerpos primarios de conejo en cantidad sobrante para que queden libres algunos de los dos sitios de unión de cada anticuerpo. En un tercer paso se añade un complejo peroxidasa-antiperoxidasa obtenido igualmente de conejo. Los sitios libres del anticuerpo secundario se fijarán a su vez a la antiperoxidasa de conejo. Por último para visualizar la reacción se añade un sustrato para el enzima y un crómogeno del tipo de la diaminobencidina, que teñirá los lugares donde se produzca la reacción enzima-sustrato.

La sensibilidad de estos métodos se ha mejorado con la introducción de métodos que usan el complejo avidina-biotina. Se emplean anticuerpos secundarios marcados con biotina que reaccionarán con un complejo avidina-peroxidasa, gracias a la extraordinaria afinidad de la avidina por la biotina., completándose el proceso con la adición del sustrato y el cromógeno.

Sólo en las células escamosas más maduras de las últimas capas de los epitelios se completa el ciclo vital del virus, con las síntesis de nuevas cápsides y es allí donde se detecta la positividad a la reacción de inmunoperoxidasa. Si bien, se ha encontrado positividad ocasional en células de áreas sanas de tejido, lo que se interpreta como que algunos antígenos de la cápside pueden ser sintetizados en células sin signos de efecto citopático.

La sensibilidad de este método es baja, incluso en lesiones de condilomas demostrables histológicamente, sólo hay un 50% de positividades. Es necesaria la presencia de aproximadamente 200 copias víricas por célula para su visualización mediante esta técnica (Kurman et al, 1992). Además, la expresión antigénica se centra en los núcleos de los coilocitos y el porcentaje de células con el antígeno L1 disminuye al aumentar la gravedad de la lesión desde la displasia leve a la displasia severa, no

encontrándose prácticamente nunca en los carcinomas *in situ* o invasivos (Bartholoma, 1989).

Los antisueros reaccionan frente al antígeno específico de grupo, y por lo tanto no permiten la detección del tipo concreto de HPV. El empleo de anticuerpos monoclonales frente a epítopos de la cápside incrementa la sensibilidad hasta cerca del 80% en lesiones condilomatosas o coilocíticas, pero los resultados son negativos en carcinoma invasivos y carcinomas *in situ* (Iwasaki et al, 1992).

1.2.3. Microscopía electrónica

Se detectan partículas víricas semejantes a papilomavirus en condilomas y displasias de cérvix. Usando criterios clínicos, citológicos e histológicos de infección por HPV la sensibilidad de la microscopía electrónica para detectarlos varía del 10 al 50%. Los viriones se encuentran únicamente en células coilocíticas y disqueratósicas. La morfología de todos los de HPV es idéntica, por lo que esta técnica no permite identificar el tipo de HPV observado. Además, para identificar los HPV, la microscopía electrónica se limita a aquellas lesiones que contienen algunas células bien diferenciadas (Roman y Fife, 1989).

1.2.4. Hibridación

Las técnicas de hibridación permiten identificar el ADN de HPV. Se basan en la formación de una doble cadena de ácido nucleico a partir una sonda de replicación de HPV y del ADN vírico que se encuentra en la célula infectada. Ello es posible en función de dos puntos esenciales: (1) dos cadenas de ADN se unen entre sí gracias a la complementariedad de sus nucleótidos; y (2) la estabilidad de los híbridos depende de la composición de bases (las uniones citosina-guanina son más estables que las adenina-timina), la longitud del híbrido, la temperatura, la concentración salina y del grado de compatibilidad de las dos cadenas (el porcentaje de bases incompatibles de dos cadenas que permite la estabilidad del híbrido está en torno al 13%).

El ADN sonda es sintetizado *in vitro* y en él los nucleótidos normales se reemplazan por nucleótidos radiactivos o con marca química, lo que permite su identificación tras la hibridación con la muestra celular a estudiar.

Una forma de marcado es la conocida como *nick-translation*, en el que una desoxirribonucleasa genera hendiduras al azar en la cadena de ADN. A continuación una ADN polimerasa de *E. coli* sustituye las bases afectadas por nucleótidos marcados radiactivamente o con biotina, que se han añadido previamente a la reacción. El resultado es un conjunto de fragmentos de ADN marcados susceptibles de ser hibridados con el ADN vírico de las lesiones en estudio.

En la actualidad existen diversas técnicas de hibridación de ácidos nucleicos utilizadas en el estudio de los HPV. Algunas de ellas pueden efectuarse directamente sobre muestras tisulares, como la hibridación *in situ* y la hibridación *in situ* con filtro, y otras requieren una extracción previa del ADN, como el *Southern blot*, la hibridación inversa (*reverse blot*) o la hibridación en mancha (*dot blot*).

1.2.4.1. Southern-blot

La muestra a estudiar se somete a un tratamiento con enzimas de restricción para la extracción del ADN. Los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis en gel de agarosa. Como las enzimas de restricción actúan sobre secuencias concretas conocidas, los fragmentos obtenidos reflejan la presencia de tales secuencias.

A continuación los fragmentos de ADN son desnaturalizados y transferidos a un soporte sólido, filtros de nitrocelulosa o nylon. Allí se hibridan con sondas conocidas de HPV. Si se usan sondas marcadas con isótopos radiactivos se realiza una autorradiografía, mientras que a las sondas biotiniladas se añade el complejo avidina-peroxidasa y el cromógeno para visualizar la reacción. Esta técnica requiere cantidades relativamente grandes de ADN (10 µg) para conseguir una adecuada sensibilidad.

1.2.4.2. Hibridación inversa (reverse blot hybridization)

En esta técnica en lugar de disponer los fragmentos de ADN celular en el filtro de nitrocelulosa (como en el *Southern blot*), lo que se hace es colocar en el soporte sondas conocidas de diferentes HPV, y es el ADN celular el que se marca. El ADN problema se hibridará con la sonda correspondiente al tipo de HPV que posea.

1.2.4.3. Dot blot

En la hibridación en mancha (*dot blot*) no se realiza digestión del ADN celular ni electroforesis en gel. El ADN se desnaturaliza y se pasa directamente a un filtro de nitrocelulosa con un dispositivo de hendidura. La membrana contiene diferentes concentraciones de ADN de HPV. La presencia en la muestra de HPV dará una señal de hibridación. Se puede realizar una cuantificación comparando las señales con controles de concentraciones conocidas de ADN vírico. Los dos kits comerciales más extendidos *Viratest* y *Virapap* alcanzan una sensibilidad similar a la del *Southern blot*, aunque se limitan a siete tipos de HPV (Schiffman, 1992).

1.2.4.3.1 Comparación PCR / Hibridación por Dot blot. La tasa de detección de HPV en lesiones de bajo grado es muy variable. Entre las razones de ello está el diferente grado de sensibilidad de unas técnicas frente a otras. En un estudio sobre muestras de citologías cervicales (234 casos) que comparaba la detección de HPV con PCR y con hibridación por *Dot Blot* se encontraron tasas globales del 70% y del 24% respectivamente. Esta marcada diferencia en la tasa de detección de HPV hace que el método empleado tenga una importancia fundamental, especialmente en lesiones de bajo grado de malignidad (Duggan et al, 1994).

1.2.4.4. Hibridación in situ estándar

Esta técnica permite visualizar la localización topográfica de las secuencias de HPV estudiadas dentro de cortes tisulares.

Las sondas de hibridación se marcan radiactivamente o con biotina. Se desnaturaliza el ADN celular, normalmente mediante calor, y se añade la sonda. Tras lavar para retirar la sonda no hibridada, se revela la reacción según el procedimiento de marcado.

La hibridación *in situ* permite realizar estudios sobre tejidos incluidos en parafina (Fig. 13). Este método además, discrimina cuando se encuentran dos tipos diferentes de HPV en una misma muestra, si el ADN vírico se sitúa dentro de las mismas células o en diferentes.

La correlación de las lesiones histopatológicas y la presencia del virus permite así mismo comparar resultados con procedimientos inmunohistoquímicos, encontrándose una sensibilidad hasta tres veces superior con la hibridación *in situ* (Alonso et al, 1994). La sensibilidad de la técnica se sitúa en torno a las 10 copias de genoma vírico detectadas por célula.

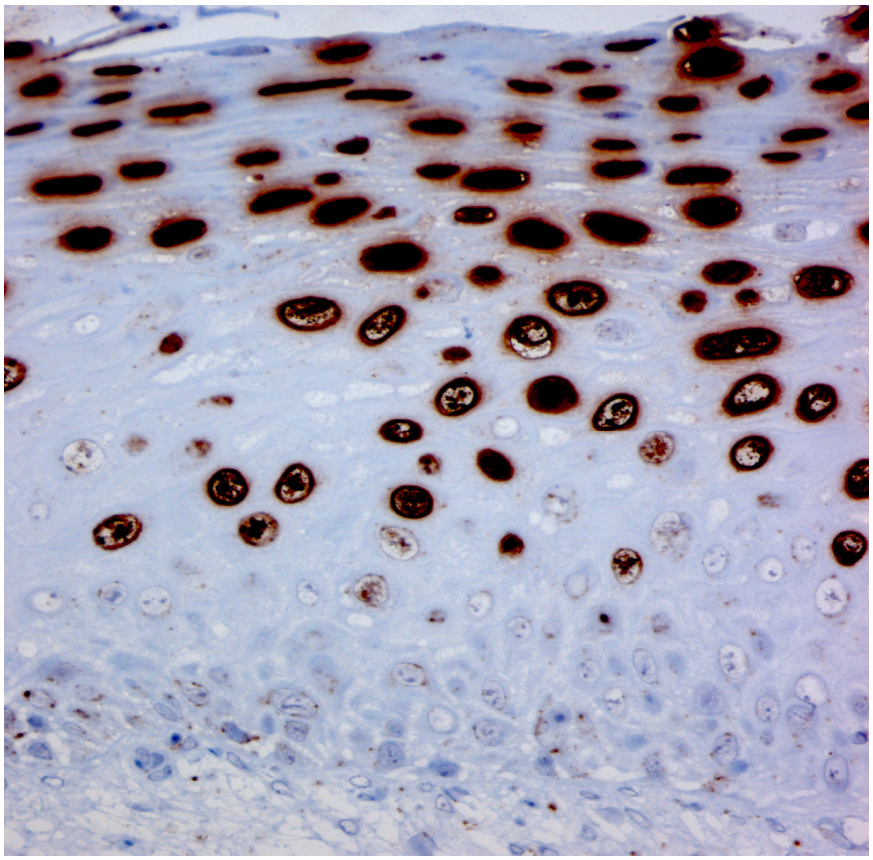

Fig. 13: Detección de partículas virales mediante hibridación in situ. Los depósitos de diaminobencidina (marrón) señalan la presencia de genoma viral

1.2.4.5. Hibridación in situ por fluorescencia

Con esta variante, usando procedimientos de fluorescencia y oligonucleótidos marcados con digoxigenina, se consigue un incremento de sensibilidad que permite detectar HPV en células que contienen entre 1 y 5 copias de genoma vírico (Siadat-Pajouh et al, 1994).

1.2.4.6. Hibridación in situ con filtro

Las muestras a estudiar se aplican directamente a un filtro que es tratado para romper las células y desnaturalizar el ADN. Después se realiza la hibridación y se visualiza la reacción. Esta técnica también evita los procedimientos de extracción del ADN.

En un estudio con un elevado número de casos utilizando esta técnica se detectó hasta un 62% de HPV 16/18 en una muestra de pacientes con carcinoma invasivo de cérvix frente a un 32% de positividades en el grupo control (Reeves et al, 1989).

Sin embargo, muchas de las técnicas que hemos descrito están dejando paso a la detección de secuencias génicas por medio de amplificación del ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser usada para detectar secuencias de ADN presentes en cantidades extraordinariamente pequeñas que escapan a la sensibilidad de cualquier otro método.

1.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1.2.5.1. Fundamentos del método

La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) es una técnica de amplificación selectiva de una secuencia específica de ácidos nucleicos.

La amplificación se realiza a partir de dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) complementarios con los extremos 3' y 5' de la región diana. Tras la desnaturalización del ADN, éste se pone en contacto con los iniciadores, que se unirán con sus secuencias complementarias. En presencia de una polimerasa de ADN cada cadena de genoma con que hayan hibridado los *primers* comenzará a replicarse. Esta enzima necesita un área de ADN de doble cadena para iniciar la síntesis. Los iniciadores, hibridados en las cadenas opuestas, quedan orientados para que la polimerasa actúe en la región entre ambos, permitiendo duplicar el segmento diana de ADN.

Como los productos de la extensión son también complementarios y capaces de unirse a los *primers*, la repetición del proceso en ciclos sucesivos dobla en cada uno de ellos la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo previo, con la acumulación exponencial del segmento diana (Saiki et al, 1988). El medio donde se realiza la reacción necesita la presencia de nucleótidos como sustrato para la síntesis de nuevos fragmentos.

Inicialmente la PCR se desarrolló utilizando el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa I de *E. coli*, pero esta enzima se inactivaba en cada ciclo, siendo necesario reponerla. El aislamiento de la ADN-polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa), que es activa a altas temperaturas, ha permitido la automatización y el aumento de la especificidad del sistema (García et al, 1991). Otras ADN polimerasas termoestables han sido aisladas a partir de *Thermus flavis*, *Thermococcus litoralis* y *Thermus thermophilus*.

La longitud de los productos amplificados puede ser mucho mayor con polimerasas termoestables debido a la reducción de la estructura secundaria de los segmentos diana con las temperaturas más elevadas usadas durante la extensión de los iniciadores. La longitud límite de amplificación con el fragmento de Klenow era de unos 400 pares de bases, mientras que con la *Taq* polimerasa se han sintetizado fragmentos de hasta 10 kb (10.000 pares de bases) (Erlich et al, 1992).

Los ciclos de amplificación constan de tres fases que son reguladas a través de variaciones de temperatura. En primer lugar se desnaturaliza el ADN, es decir, se separan las dos cadenas de nucleótidos, elevando la temperatura hasta unos 95°C. La segunda fase consiste en el acoplamiento de los iniciadores con sus secuencias complementarias. Para ello se reduce la temperatura hasta temperaturas cercanas a los 50°C. La tercera fase es la de síntesis del fragmento de ADN desde los oligonucleótidos iniciadores. En ella se eleva la temperatura hasta unos 70°C para proporcionar a la *Taq* polimerasa las condiciones de extensión más idóneas.

El número de copias del fragmento de ADN deseado crece exponencialmente como 2^n con los ciclos sucesivos. Para frenar la síntesis sólo es necesario enfriar las reacciones tras el último ciclo. La PCR es tan sensible que permite amplificar una única copia de ADN. Así, se pueden identificar genes no repetidos entre largas secuencias genómicas.

El gen de la ß-globina humana fue la primera secuencia que se amplificó con la PCR (Saiki et al, 1988) y la utilización en la detección de secuencias concretas de ADN sigue siendo su principal aplicación.

Sin embargo, las primeras experiencias con PCR se realizaron en 1969 (Kjell Kleppe en el Khorana's Laboratory), con una amplificación de dos ciclos de una secuencia de 30 nucleótidos, con iniciadores de 9 y 10 nucleótidos. Por entonces, la síntesis de iniciadores resultaba extremadamente laboriosa y cara, y era necesario utilizar intacta la molécula de ADN polimerasa I (el fragmento de Klenow fue descubierto en 1971) a un pH lejos del óptimo, para evitar la degradación del producto, lo que hacía necesario largos periodos de incubación y grandes cantidades de enzima. Todo ello retrasó la automatización y la progresión en gran escala de la amplificación de ADN.

La moderna tecnología de PCR fue desarrollada inicialmente por Mullis en 1983. En 1985, Mullis describió la técnica en una reunión de la American Society of Human Genetics, y ese mismo año apareció la primera publicación (Saiki) utilizando la PCR (Smyth, 1992).

Aunque con unas condiciones estándar se logra una adecuada amplificación de diferentes muestras, para secuencias muy variables, la optimización de la PCR debe adaptarse a cada procedimiento analítico.

Los elementos necesarios para preparar una amplificación con la PCR son:

I.- Desoxinucleótidos trifosfatos (desoxiadenina trifosfato -dATP-, desoxicitosina trifosfato -dCTP-, desoxiguanina trifosfato -dGTP- y desoxitimidina trifosfato -dTTP-).

Se añaden a partir de una mezcla de los cuatro con una concentración equivalente de cada uno.

II.- *Primers*: los oligonucleótidos que se hibridarán con los extremos de la región genómica a amplificar y servirán como iniciadores para la extensión por parte de la *Taq* polimerasa.

III.- Tampón de la enzima *Taq* polimerasa, que contiene KCl, Tris HCl, $MgCl_2$, gelatina al 0,1%, y agua bidestilada.

IV.- Enzima *Taq* polimerasa.

V.- Agua bidestilada.

Estos 5 componentes constituyen la mezcla de amplificación. Junto a ella se coloca la muestra problema.

Los requerimientos de la enzima *Taq* polimerasa deben adaptarse para evitar que un exceso de la misma nos produzca un fondo de amplificados inespecíficos, o bien, que su escasa cantidad amplifique insuficiente cantidad del producto deseado.

Las concentraciones de desoxinucleótidos deben guardar también un equilibrio entre la especificidad y la sensibilidad. Las concentraciones demasiado elevadas favorecen la extensión con nucleótidos mal incorporados. La concentración de Mg^{2+} afecta a múltiples factores: la unión de los iniciadores con sus secuencias complementarias, la temperatura de disociación de la cadena original y el producto amplificado, la especificidad del producto, y la actividad de la enzima.

La temperatura y el tiempo requeridos para la hibridación de los *primers* con los extremos de las secuencias a amplificar dependen de la proporción de bases, longitud y concentración de los iniciadores. El rango de temperaturas que proporcionan mejores resultados oscila entre 55 y 72°C. Esta unión con condiciones adecuadas requiere apenas unos segundos. El aumento de la temperatura de unión favorece la adecuada discriminación frente a la unión en lugares incorrectos y reduce la unión de nucleótidos

equivocados. Las bajas temperaturas de extensión junto con altas concentraciones de dNTPs favorecen la incorporación equivocada de nucleótidos.

Para una máxima especificidad la *Taq* polimerasa puede añadirse después del primer paso de desnaturalización en el primer ciclo. La *Taq* polimerasa tiene una tasa de incorporación errónea de nucleótidos de 10^{-5} por ciclo, aunque carece de actividad exonucleasa 3'-5', es decir de reparación de nucleótidos mal fijados. La ADN polimerasa termoestable aislada del *Thermococcus litoralis* sí tiene actividad exonucleasa 3'-5', con una tasa probablemente más baja de incorporación errónea de nucleótidos. Sin embargo, ello podría causar también degradación de moléculas de ADN de cadena única como los *primers* o los productos de amplificación antes de su acoplamiento con el iniciador (Erlich et al, 1992).

El tiempo de extensión depende de la longitud y la concentración del segmento diana. Suele realizarse a 72°C, que se ha encontrado como la temperatura más adecuada en diferentes modelos experimentales. A esta temperatura la tasa de incorporación de nucleótidos oscila entre 35 y 100 por segundo, dependiendo del tampón de la polimerasa, el pH, la concentración salina y la naturaleza del ADN diana. Así, un tiempo de extensión de un minuto resulta suficiente para productos de más de 2000 bases. Tiempos mayores ayudan en los primeros ciclos si la concentración del sustrato es muy baja, y en los últimos ciclos cuando la concentración del producto excede la del enzima.

*** Desnaturalización**

La causa más común de fallo de una PCR es la desnaturalización incompleta del segmento diana o del producto amplificado. Suele realizarse a 95°C durante 30 segundos, o bien a 97°C durante 15 segundos. En segmentos ricos en pares G+C son útiles temperaturas más elevadas.

Aunque la desnaturalización se realiza en unos pocos segundos una vez alcanzada la temperatura adecuada, el problema puede existir en el retraso en alcanzarse esa temperatura dentro del tubo de reacción.

La desnaturalización incompleta permite que las dos cadenas de ADN vuelvan a unirse sin dejar lugar para el acoplamiento de los *primers*.

Sin embargo, la vida media de actividad de la *Taq* polimerasa se reduce al aumentar la temperatura, siendo mayor de 2 h. a 92,5°C; de 40 min a 95°C; y de 5 min a 97,5°C.

*** Número de ciclos**

El número de ciclos óptimo depende de la concentración inicial de ADN diana. El exceso de ciclos incrementa la cantidad y complejidad de los productos inespecíficos. Para un número de moléculas diana de 3 x 10^5, 25-30 ciclos resultan suficientes; para 10^3, 35-40 ciclos; y para 50 moléculas diana, 40-45 ciclos.

*** *Primers***

Las concentraciones excesivas de *primers* favorecen los productos inespecíficos y la formación de dímeros que compiten con el producto deseado por los dNTPs y la enzima, resultando una menor cantidad de éste. Los iniciadores ideales deben tener entre 18 y 28 nucleótidos con una proporción de G+C del 50 al 60%. Deben evitarse las secuencias palindrómicas dentro de los iniciadores y la complementariedad de los extremos 3' de los iniciadores por posible formación de dímeros de *primer*.

*** Efecto meseta**

Consiste en la atenuación de la tasa exponencial de incremento del producto amplificado que ocurre en los últimos ciclos de la reacción. Puede deberse a distintos factores, consumo de dNTPs o *primers*, competición de los reactivos con productos inespecíficos, dímeros de *primers*, desnaturalización incompleta, etc (Innis y Gelfald, 1990).

*** Uso de la PCR con tejido fijado en formol e incluido en parafina**

La posibilidad de estudiar con técnicas de biología molecular tejidos conservados permite efectuar estudios retrospectivos de amplias series de pacientes, así como analizar los cambios genéticos y agentes infecciosos relacionados con las enfermedades.

La forma más habitual de conservar muestras de tejidos humanos es la fijación en formol y la inclusión en parafina. Los estudios acerca del estado de conservación y cantidad de ADN extraíble a partir de este tipo de muestras indican que se obtiene menos ADN de tejidos que han permanecido largo tiempo en fijador, que de aquéllos en los que ha existido un retraso en la fijación. Un tejido mantenido 7 días a temperatura ambiente y fijado posteriormente permitía extraer casi la misma cantidad de ADN que

otro fijado inmediatamente durante 24 h, aunque a partir de tejido en fresco se obtiene hasta 40 veces más ADN y de mayor calidad (menos fragmentado) (Jackson et al, 1990). La fijación prolongada en formol reduce sustancialmente el ADN extraíble.

La inclusión en parafina no parece alterar de manera importante el ADN y han sido aplicados procedimientos de PCR sobre tejidos de más de 40 años de antigüedad (Shibata et al, 1988). Con muestras en parafina de 10 µm de grosor (conteniendo aproximadamente unas 2000 células), tras una amplificación de 40 ciclos, pueden detectarse una media de 0,1-0,2 genomas víricos por célula. La detección de HPV por hibridación *in situ* necesita al menos entre 50 y 200 copias de genoma vírico por célula (Shibata et al, 1988).

En cuanto a los resultados obtenidos con amplificaciones sobre muestras tratadas con distintos fijadores, los estudios comparativos demuestran que el que presenta mejores resultados es la acetona. La fijación formólica proporciona resultados sólo levemente inferiores; y la fijación con Carnoy, Zenker o Bouin produce una mayor alteración del ADN, con lo que la amplificación es más dificultosa (Greer et al, 1991).

La extraordinaria sensibilidad de la PCR tiene como contrapartida el riesgo de contaminación. La sorprendentemente alta incidencia, en diversos estudios, de virus oncogénicos como HPV 16, en muestras cervicales de mujeres sanas, contrasta con una prevalencia de sólo el 3% detectada con PCR realizada con *primers* adaptados para evitar contaminación. Ello obliga a reconsiderar esos resultados y plantearse si son debidos a contaminación o pueden explicarse por factores geográficos en la distribución de los HPV (Beyer-Finkler et al, 1990).

Una reacción de PCR genera hasta 10^{12} moléculas de ADN amplificado en un volumen de 0,1 ml. Por tanto, simplemente la reutilización de una pipeta puede transferir, en un volumen de 0,1 µl, 10^9 copias de la secuencia de ADN (Kwok et al, 1989).

1.2.5.2. Detección de amplificados

Los productos de amplificación de la PCR pueden detectarse mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN (cargado negativamente) se desplaza en el campo eléctrico hacia el polo positivo de un campo eléctrico. La distancia de migración del ADN amplificado depende de su tamaño, los amplificados de poco tamaño se desplazaran más lejos en el gel. Fragmentos de ADN similares migrarán a la misma distancia, por ello, para determinar la posición exacta del ADN amplificado se pueden usar marcadores (fragmentos de ADN con número conocido de pares de bases).

Se añade bromuro de etidio, dentro del propio gel de agarosa, para hacer visible el ADN, y el desplazamiento de los fragmentos de ADN se visualiza bajo luz ultravioleta. El bromuro de etidio es una molécula fluorescente que se une específicamente al ADN. El producto obtenido de la PCR contiene también cantidades variables de los *primers* que no han reaccionado y que, dado su pequeño tamaño, se desplazan más en el gel dando pequeñas bandas de positividad en el extremo del mismo. El ADN original que ha servido de molde para la reacción suele estar en tan pequeña cantidad que rara vez aparece como una banda fluorescente (Stork, 1990).

Las secuencias de ADN amplificadas mediante PCR pueden encontrarse en bajas concentraciones y ser difíciles de visualizar con la electroforesis en gel de agarosa. Existen métodos más sensibles para su visualización a través de su hibridación con sondas complementarias a los productos amplificados.

1.2.5.3. PCR y Papilomavirus

La técnica de PCR posee unas características ideales para la detección, diagnóstico y estudio de los papilomavirus. Su extraordinaria sensibilidad permite detectar hasta una copia de genoma vírico por millón de células, siendo utilizable en material conservado en parafina. Tiene particular interés en el diagnóstico de infecciones latentes u ocultas.

Los primeros estudios que aplicaron esta tecnología para muestras fijadas en formol e incluidas en parafina se llevaron a cabo en 1988 (Shibata et al, 1988). Desde entonces ha sido extensamente utilizada, con múltiples trabajos que confirman la

estrecha relación de papilomavirus con las lesiones premalignas y malignas en el cérvix uterino y en carcinoma de pene.

Esta asociación se detecta en casi el 100% de los carcinomas cervicales, siendo HPV 16 el tipo más frecuentemente hallado en carcinomas invasivos y lesiones intraepiteliales de alto grado con un rango que varía según los diferentes trabajos.

1.2.6. Otras pruebas

No existen pruebas serológicas válidas para la detección de HPV (Armstrong, 1988). A diferencia de los papilomavirus bovino y del conejo de cola de algodón, no ha sido posible transmitir HPV a un huésped no humano ni infectar y transformar células en cultivo. Por tanto el desarrollo de la investigación sobre HPV se hizo posible desde la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Hace unos años de desarrolló una prueba cutánea para detección de infecciones activas y latentes por HPV. A partir de proteínas codificadas por los ORF E4 y L1 de HPV tipo 16, purificadas e inyectadas subcutáneamente, se obtienen en elevado número de pacientes en que se demuestra por otros métodos la infección por HPV, unas pápulas rojizas de 2-6 mm que se corresponden histológicamente con reacciones de tipo Arthus, sin producirse reacción en los controles negativos (Höplf et al*,* 1991).

El desarrollo de anticuerpos frente a proteínas de HPV, principalmente E6 y E7 permite estudios serológicos. Con técnicas de enzimainmunoensayo (ELISA), y *Western-blot* frente a un péptido (E7-2) incluyendo los aminoácidos 11 al 30 de E7 de HPV 16 se han encontrado tasas de positividad del 35% en suero de mujeres con carcinoma cervical, frente al 5,7% del grupo control, en un estudio con 140 casos (Suchankova et al, 1991).

Otro estudio donde se analizaba la presencia de diversos anticuerpos frente a HPV 16, encontró tasas del 63% frente a E4 ó E7 en mujeres con cáncer cervical y del 10% en mujeres sanas. Las tasas de anticuerpos frente a proteínas tardías de HPV 16 (L1 y L2) fueron del 54% en el grupo de pacientes con cáncer cervical y del 44% en el grupo de mujeres sanas (Kochel et al, 1991).

1.3. Neoplasias de pene

1.3.1. Epidemiología del cáncer de pene

El carcinoma de pene es un cáncer poco frecuente en Europa y América del Norte, con una incidencia entre el 0,1-0,9/100.000 habitantes (Ferreux et al, 2003). En regiones de Sudamérica, África y Asia la prevalencia se incrementa hasta representar un 10-20% de los tumores malignos del varón (Malek et al, 1993). En España la tasa de prevalencia del cáncer de pene se sitúa en el 0,7% de los tumores malignos del varón. La máxima incidencia ocurre habitualmente en la sexta década de vida (Soto et al, 2003).

Los estudios epidemiológicos de esta infección están dificultados por lo problemático de cultivar el virus humano y por la ausencia de pruebas serológicas fiables. Papilomavirus bovino (BPV) y de conejo (CRPV, *cottontail rabbit*) sí han podido ser cultivados. Si bien la etiología del cáncer de pene no está todavía claramente establecida, existen una serie de datos epidemiológicos que nos muestran unos grupos de riesgo: los varones no circundados o circundados de forma tardía, aunque alguna publicación reciente lo supeditaría a la presencia de fimosis (Hung-Fu Tseng et al, 2001), varones con historia de condilomas genitales, promiscuidad sexual y hábito tabáquico.

La transmisión sexual de las verrugas genitales no fue plenamente aceptada hasta 1960 cuando estudios independientes demostraron que los compañeros sexuales de personas con verrugas genitales las desarrollaban tras un período de incubación promedio de tres meses (variando entre tres semanas y ocho meses). Es necesario el traumatismo epitelial para inducir infección por papilomavirus en animales. Igualmente, los lugares más frecuentes para el desarrollo de verrugas genitales en humanos son las zonas sujetas a abrasión durante el coito: la parte posterior del introito en las mujeres y el prepucio en los varones (Kurman et al, 1992).

Se ha observado que hasta dos tercios de los individuos que tienen relaciones sexuales con una pareja infectada por HPV llegan a desarrollar una infección. Sin embargo, la mayoría de las infecciones son subclínicas y las lesiones pueden ser curadas por el sistema inmune en menos de un año. Algunas de estas lesiones no son eliminadas por el sistema inmune y pueden persistir por largos períodos de tiempo, incluso décadas (Castellsagué et al, 2002).

Al valorar el factor masculino como riesgo de cáncer de cuello uterino hay también que tener en cuenta el tipo de HPV presente en las lesiones peneanas. En los condilomas acuminados suelen hallarse los tipos 6 y 11 de HPV, los cuales tienen un bajo potencial carcinogénico, encontrándose en menos del 2% de los carcinomas invasivos de cérvix. Sin embargo, en lesiones del tipo de la papulosis bowenoide se detecta con frecuencia HPV 16, el cual sí tiene importante riesgo carcinogénico. Serían pues éstos los casos con un incremento de riesgo de neoplasias de cuello uterino atribuibles a un factor masculino (Hauser et al*,* 1985).

En los hombres, junto al tipo viral, otros factores han de ser tomados en consideración en cuanto a la patogenia del cáncer de pene, como son el estado inmunitario del paciente, los estados de desnutrición, la ausencia de hábitos higiénicos, la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual, la exposición a agentes carcinógenos químicos y físicos, determinadas alteraciones genéticas, la fimosis, la no circuncisión, el inicio precoz de relaciones sexuales, el número de parejas sexuales y el consumo de tabaco (Hung-Fu Tseng et al, 2001; Castellsagué et al, 2002). Al igual que en el caso de las mujeres, los papilomavirus de alto riesgo son factor necesario pero no suficiente para inducir la carcinogénesis. Los cambios cromosómicos provocados a raíz de la inestabilidad génica que provoca la infección por HPV (aneuploidía, mutaciones) dan lugar a alteraciones en genes importantes, no tan sólo en la proliferación celular, sino también en los genes que controlarían la transcripción viral y las funciones de las oncoproteínas (Alcaraz, 2002). La prevalencia de HPV de alto riesgo en maridos de mujeres con carcinoma cervical es 5 veces más alta que en maridos de mujeres sin cáncer de cérvix (Dillner et al, 2000).

La presencia de ADN del HPV en el carcinoma de pene varía mucho según los distintos trabajos que se han descrito en la literatura, y se sitúa entre el 15-71% dependiendo del tipo de tumor y la sensibilidad del método utilizado para la detección del virus. El genotipo más frecuente de HPV en el cáncer de pene es el HPV 16 (Rubin et al, 2001), aunque en algunas regiones de Sudamérica el más frecuente es el 18 (Villa and Lopes, 1986; Picconi et al, 2000).

La historia natural de las infecciones genitales por HPV no sigue un curso definido. No todas las personas con verrugas genitales o infección subclínica presentan displasia o cáncer genital. Sin tratamiento, las verrugas genitales pueden persistir sin cambios, crecer o involucionar espontáneamente. En un estudio sobre la evolución de pacientes con coilocitosis en el epitelio cervical, se encontraron sobre 35 casos con diagnóstico colposcópico, citológico e histológico de infección por HPV, excluyéndose las displasias,

y con seguimiento cada cuatro meses durante un año, que el 18% presentaron regresión espontánea de los signos de infección. El 24% mostró coilocitosis persistente, y el 48% desarrolló una displasia que en todos los casos excepto uno, fue moderada o severa. Entre los tres grupos con diferente evolución de la infección no hubo diferencias significativas de edad o conducta sexual (Evans-Jones et al, 1985).

Las verrugas genitales son la enfermedad de transmisión sexual vírica más frecuentemente diagnosticada en la actualidad. Por otro lado, se tienen pocos datos sobre la prevalencia de las infecciones subclínicas por HPV (Stone, 1989).

1.3.2. Lesiones preneoplásicas de pene

Existen diversas entidades clínico-patológicas que se consideran como posibles precursoras del carcinoma de pene. Algunos tumores benignos relacionados con HPV pueden en ocasiones condicionar la progresión hacia lesiones malignas. Otras lesiones son consideradas como carcinomas intraepiteliales no invasivos, que pueden evolucionar a infiltrantes (Mills, 2004).

1.3.2.1. Tumores benignos: Condiloma acuminado

El condiloma acuminado es un tumor benigno causado por el HPV. Está relacionado con las verrugas vulgares y puede aparecer en cualquier superficie mucocutánea húmeda de los genitales externos en ambos sexos, generalmente entre los 20 y 40 años.

En cuanto al pene, estas lesiones aparecen sobre todo alrededor del surco coronal y en la superficie interna del prepucio. Están formados por una o más excrecencias papilares rojas, sésiles o pediculadas de tamaño variable entre uno o varios milímetros de diámetro. Histológicamente, se aprecia un tejido conjuntivo cubierto por un epitelio acantósico e hiperplásico que a veces muestra hiperqueratosis superficial considerable. La maduración ordenada normal de las células epiteliales aparece conservada. En estas lesiones existe una evidente vacuolización de las células del estrato espinoso (coilocitosis), característica de la infección por el HPV. La membrana basal está indemne, y no hay signos de invasión del estroma subyacente. Los condilomas acuminados tienden a recidivar, pero no suelen evolucionar hacia

cánceres infiltrantes. Sin embargo, en ocasiones algunos condilomas, especialmente los llamados condilomas gigantes, pueden evolucionar a la malignidad.

Entre las distintas clases antigénicas y genéticas del HPV que se conocen, el tipo 6 y, en menor medida, el tipo 11 mantienen una asociación indudable con los condilomas acuminados.

1.3.2.2. Carcinoma in situ o neoplasia intraepitelial

El término histológico de carcinoma *in situ* se utiliza para describir las lesiones epiteliales que presentan cambios de malignidad circunscritos al epitelio, sin signo alguno de infiltración local ni de metástasis a distancia. Se les considera como lesiones precancerosas, dada su capacidad de evolucionar hacia un cáncer infiltrante. En los genitales externos del varón se han descrito tres lesiones que ofrecen signos histológicos de carcinoma *in situ*: la enfermedad de Bowen, la eritroplasia de Queyrat y la papulosis bowenoide.

Se discute si se trata de entidades clínicas distintas o si son variedades de un solo proceso subyacente. Todas estas lesiones tienen una clara asociación con la infección por el HPV. Los datos recopilados por gran número de estudios revelan que en un 80% aproximadamente de los casos, se encuentra HPV, sobre todo el de tipo 16.

1.3.2.2.1. Enfermedad de Bowen. Aparece en la región genital en ambos sexos, generalmente en personas de más de 35 años. En los varones suele afectar a la piel del pene y el escroto.

Macroscópicamente, aparece como una placa única, opaca y engrosada, de color blanco-grisáceo, que superficialmente aparece ulcerada y costrosa. Histológicamente la epidermis muestra proliferación y numerosas mitosis, algunas de ellas atípicas. Hay evidente displasia celular, núcleos grandes e hipercromáticos y ausencia de maduración ordenada. No obstante, el límite dermo-epidérmico está muy bien delimitado por una membrana basal indemne. Con el paso de los años, la enfermedad de Bowen puede llegar a formar un tumor inflitrante (Mills, 2004).

1.3.2.2.2. Eritroplasia de Queyrat. Aparece generalmente en el borde del glande, prepucio y meato uretral de pacientes de edad avanzada, en forma de placas únicas o múltiples, rojas, brillantes y, a veces, de aspecto aterciopelado. Histológicamente, es indistinguible de la enfermedad de Bowen; al igual que ella, es capaz de convertirse en un carcinoma infiltrante (Kaye et al, 1990).

Wieland estudió la presencia de ADN viral (para diferentes tipos de HPV de alto riesgo) en una serie de 8 casos de eritroplasia de Queyrat, así como en una serie de controles, tanto de neoplasias ginecológicas, lesiones inflamatorias de pene y algunos casos de enfermedad de Bowen (Wieland et al, 2000). En 7 de 8 casos de eritroplasia de Queyrat se encontró la presencia de HPV 16, así como en otras lesiones neoplásicas ginecológicas y en la enfermedad de Bowen, pero no en la patología inflamatoria, por lo que la presencia o ausencia de este tipo de HPV podría ayudar en el diagnóstico de estas lesiones preneoplásicas.

1.3.2.2.3. Papulosis bowenoide. Aparece en los adultos que llevan una vida sexual activa. Clínicamente se distingue de la enfermedad de Bowen porque los pacientes afectados son más jóvenes y porque las lesiones papulosas y pigmentadas son numerosas en lugar de solitarias. En algunos casos son lesiones verrucosas que se confunden fácilmente con los condilomas acuminados.

Histológicamente, la papulosis bowenoide es indistinguible de la enfermedad de Bowen, pero a diferencia de las otras dos formas de carcinoma *in situ*, la papulosis bowenoide prácticamente nunca se convierte en un carcinoma infiltrante (Mills, 2004).

1.3.3. Carcinoma epidermoide

El carcinoma de pene es un tumor relativamente infrecuente en nuestro medio constituyendo menos del 1% de las muertes por cáncer en el varón. El carcinoma epidermoide del pene suele asentarse inicialmente en el glande o en la superficie del prepucio, cerca del surco coronal. Desde el punto de vista macroscópico, hay dos tipos: papilar y plano. Las lesiones papilares se parecen a los condilomas acuminados y pueden producir una masa fungosa con aspecto de coliflor. Las variedades planas se presentan como áreas de engrosamiento epitelial de color gris y producen grietas en la mucosa. Al crecer forman una pápula ulcerada.

El carcinoma epidermoide del pene con carácter infiltrante es una lesión de crecimiento lento y produce metástasis locales que, con frecuencia, llevan ya un año o más de evolución cuando el paciente acude al médico. Estas lesiones son indoloras hasta que se ulceran y se infectan secundariamente, además sangran con frecuencia. Las primeras fases de la metástasis afectan característicamente a los ganglios inguinales e ilíacos, pero la diseminación extensa es muy infrecuente hasta que la lesión está muy avanzada.

El pronóstico depende del estadio del tumor. Las personas con lesiones circunscritas y sin invasión ganglionar tienen una supervivencia del 66% a los 5 años, mientras que las metástasis ganglionares implican una supervivencia del 27% a los 5 años (Lukaszuk et al, 2007).

1.3.3.1. Histología del cáncer de pene

El carcinoma epidermoide de pene se clasifica siguiendo a Cubilla (2001) en diversos subtipos (entre paréntesis los porcentajes de prevalencia de cada uno de ellos): común o típico (59%), papilar (15%), basaloide (10%), condilomatoso maligno (*"warty"*) (10%), verrucoso (3%) y sarcomatoide (3%). La presencia de ADN perteneciente al HPV ha podido ser encontrada en las muestras de carcinoma de pene en una frecuencia variable. Los carcinomas de pene de tipo basaloide y los condilomatosos (*warty*) muestran una fuerte asociación con el HPV y la relación etiológica con la infección por HPV es muy probable (Alcaraz et al, 2002).

Sin embargo, la gran mayoría de los carcinomas de pene diagnosticados en Europa y Estados Unidos son de tipo histológico no basaloide, y es todavía una materia en debate cuántos de estos tumores están en relación con el HPV (Ferreux et al, 2003).

Desde el punto de vista anatomopatológico, la mayoría de los tumores malignos que aparecen en la región genital externa del varón se corresponden con carcinomas epidermoides de pene. Mucho más raramente se han descrito casos de melanoma (Begun et al, 1984; Das Gupta et al, 1965; Stilwell et al, 1988) localizados fundamentalmente en glande, que presentan una alta tasa de metástasis ganglionares linfáticas en el momento del diagnóstico y un mal pronóstico. También se han descrito

carcinomas basocelulares (Goldminz et al, 1989), y de forma muy excepcional leiomiosarcomas (Smart, 1984), angiosarcomas (Williams et al, 1979), sarcomas de Kaposi (Lowe et al, 1989), rabdomiosarcomas embrionarios (Ramos et al, 1966), fibrohistiocitomas malignos (Fletcher et al, 1984) y linfomas primarios (González-Campora et al, 1981). A pesar de la gran vascularización que presenta el pene, las metástasis desde otros órganos se han descrito raramente (Bosch et al, 1984).

Los carcinomas epidermoides de pene son similares a los que aparecen en otros órganos, pero especialmente a los que aparecen en vulva, cavidad oral o región anal. Existe un espectro morfológico en el que predominan los carcinomas epidermoides queratinizantes, no verrucosos, y sin características especiales. Sin embargo, aproximadamente un 30% de los casos presentan características diferenciales. Dividiremos los distintos subtipos de carcinomas epidermoides según la clasificación más comúnmente usada y anteriormente comentada, que es la propuesta por Cubilla (Cubilla et al, 2001).

1.3.3.1.1. Carcinoma epidermoide de tipo común. Es la variante más frecuente y representa aproximadamente el 70% de los casos. La edad media de aparición son los 58 años. Clínicamente puede aparecer como una masa irregularmente granular, como una placa que puede ulcerarse, o como una lesión exofítica y ulcerada.

Histológicamente la lesión suele corresponder a un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado con fenómenos de queratinización. El estroma suele contener un infiltrado inflamatorio predominantemente linfoplasmocitario, aunque en ocasiones pueden aparecer numerosos eosinófilos. Se puede encontrar reacción granulomatosa a queratina. Hasta en dos tercios de los casos se pueden encontrar lesiones intraepiteliales de bajo o alto grado de malignidad (Mills, 2004).

1.3.3.1.2. Carcinoma basaloide.Este tipo histológico puede considerarse como de "alto grado", por su alto grado de agresividad y por su alta capacidad de infiltración. Más de la mitad de los pacientes muestran metástasis a ganglios inguinales en el momento del diagnóstico. Representa aproximadamente del 5 al 10% de los casos de carcinoma epidermoide de pene y muestra una edad media de aparición de 52 años. Se localiza fundamentalmente en glande y se supone que se origina a partir del

epitelio de transición del meato urinario. Esta variante suele asociarse a presencia de HPV (Cubilla, 1998).

Macroscópicamente suele aparecer como una masa plana, irregular y ulcerada. La característica microscópica principal es la presencia de nidos sólidos muy agrupados, que suelen presentar necrosis central de tipo comedocarcinoma. En ocasiones se encuentra una abrupta queratinización en el centro de los nidos y una empalizada periférica. Estos nidos pueden presentar hendiduras periféricas por artefacto de retracción. Las células son pequeñas, basaloides, con núcleo inconspicuo y frecuentes figuras de mitosis y apoptosis. Frecuentemente se encuentran lesiones asociadas de hiperplasia de células basales y de carcinoma *in situ* basaloide. Otro hallazgo frecuente es la presencia de infiltración vascular hemática y linfática, y la infiltración perineural. El estroma puede presentar inflamación crónica e hialinización. La tasa de mortalidad es del 59% (Cubilla, 1998).

1.3.3.1.3. Carcinomas verruciformes. En este apartado se engloban los tumores de pene exofíticos que tienen un aspecto macroscópico verrucoso. Microscópicamente presentan características papilares heterogéneas, por lo que se subdividen en dos grandes grupos: el carcinoma condilomatoso (*warty*) y el carcinoma no condilomatoso que se compone a su vez de dos variantes muy similares que son el carcinoma verrucoso y el carcinoma papilar (Fig. 14).

***Carcinoma condilomatoso*:** Son tumores de lento crecimiento y de grado bajo o intermedio de malignidad. Presentan cierta similitud con las lesiones condilomatosas, puesto que muestran marcados cambios coilocíticos (Cubilla, 2000). Son idénticos a los carcinomas condilomatosos de vulva (Kurman, 1992). Macroscópicamente el tumor muestra crecimiento exo y endofítico, con una media de 5 cm de diámetro.

La superficie muestra un aspecto en empedrado. Microscópicamente el tumor muestra un patrón arborescente, con papilas redondeadas o picudas con hiper y paraqueratosis, y con eje fibrovascular prominente. Se observan extensos cambios coilocíticos, que no se limitan a la superficie, sino que pueden abarcar todo el tumor. Se pueden encontrar abscesos intraepiteliales. El límite entre el estroma y el tumor está frecuentemente desdibujado por un infiltrado inflamatorio linfohistiocítico.

El carcinoma condilomatoso se debe diferenciar de los condilomas gigantes, pues éstos no muestran pleomorfismo nuclear y los cambios coilocíticos aparecen limitados a la superficie.

Fig. 14: Esquema de los tipos histológicos de carcinomas verruciformes de pene (Stemberg, 2004)

***Carcinoma verrucoso*:** Son tumores de lento crecimiento, muy bien diferenciados, con un crecimiento papilar exofítico y un límite característico entre el tumor y el estroma que forman estructuras redondeadas (McKee, 1983). Macroscópicamente aparecen como tumores blanco grisáceos que miden entre 1 y 3 cms. de diámetro. La edad media de aparición es a los 57 años. El análisis microscópico muestra papilomatosis, acantosis e hiperqueratosis. Los ejes fibrovasculares de las papilas aparecen poco vascularizados. Se encuentra más frecuentemente ortoqueratosis con gránulos de queratohialina que paraqueratosis. El tumor muestra escasa atipia y figuras de mitosis, y no muestra cambios coilocíticos. La base del tumor es amplia, con margen lobulada y bulbosa. En los carcinomas verrucosos puros no aparecen metástasis, pero sí se pueden observar recurrencias del tumor si se extirpa de forma incompleta.

***Carcinoma papilar*:** Son tumores exofíticos, de lento crecimiento, que no presentan alteraciones coilocíticas, y que muestran un margen irregular. El diagnóstico se hace por exclusión de los otros tipos histológicos. Generalmente aparece en glande. Las metástasis ganglionares son raras.

Macroscópicamente aparecen como lesiones grisáceas exofíticas destructivas, y microscópicamente son neoplasmas papilares bien diferenciados. La hiperqueratosis y la acantosis son prominentes. Las papilas muestran morfología variables con o sin eje fibrovascular.

Se pueden observar algunos cambios coilocíticos, pero poco prominentes. Los nidos de infiltración por carcinoma papilar se deben distinguir de los de la hiperplasia pseudoepiteliomatosa. En el carcinoma papilar los nidos muestran atipia, queratinización y desmoplasia del estroma.

1.3.3.1.4. Carcinoma sarcomatoide. Son tumores raros, grandes y muy agresivos que se caracterizan por un predominio de células fusiformes, que ocasionalmente se entremezclan con células gigantes, y que pueden contener o no focos de carcinoma epidermoide de tipo común. La edad media de diagnóstico es de 60 años y la localización típica es el glande. Estos tumores recidivan con frecuencia. Macroscópicamente aparecen como una masa fungoide de 5 a 7 cm.

Generalmente infiltran en profundidad el cuerpo esponjoso y el cavernoso y pueden presentar nódulos satélites separados de la masa principal. Histológicamente se componen de células fusiformes, pleomórficas, con aisladas células gigantes. Puede aparecer metaplasia condroide u ósea y son frecuentes las áreas de necrosis y las figuras de mitosis (Poblet et al, 2008).

1.3.3.1.5. Carcinoma adenoescamoso. Se trata de una variante excepcional que parece originarse a partir de glándulas ectópicas de región perimeatal (Cubilla, 1996). El estudio histológico de estas lesiones muestra un componente bifásico, escamoso y glandular, aunque predomina el primero. Las glándulas producen mucina y se marcan con antígeno carcinoembrionario (CEA) (Mills, 2004).

Esta variante se debe diferenciar de los carcinomas epidermoides pseudoglandulares, que muestran formación de luces por fenómenos de acantolisis.

1.3.4. HPV y cáncer de pene

En un 50% aproximadamente de los pacientes, se puede detectar el ADN del HPV en las células cancerosas. La asociación del cáncer de pene con el HPV ha sido bien documentada. Casi siempre el responsable es el HPV tipo 16, pero al igual que en otros malignos, también está implicado el HPV 18. En un estudio de 53 casos en Brasil, se encontró que en el 49% existía HPV 16 y en el 9% HPV 18 (McCance et al, 1986). La enfermedad de Bowen es la lesión supuestamente precursora del carcinoma epidermoide del pene y es la que tiene una asociación más estrecha con el HPV, pues se detecta en el 80% de las lesiones (Malek et al, 1993). Otro estudio evidenció la presencia de ADN de HPV en el 42% de los casos de carcinoma epidermoide (Rubin et al, 2001).

Algunos de los casos de carcinoma epidermoide con asociación de HPV tienen lugar en pacientes con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Poblet et al, 1999).

1.4. Neoplasias de vulva

1.4.1. Epidemiología del cáncer de vulva

El carcinoma de vulva se considera por su frecuencia un tumor raro, con una incidencia mundial anual de alrededor de 1-3 / 100.000 mujeres.

Las tres cuartas partes de estos tumores aparecen en labios (generalmente labios mayores) y el resto en clítoris u horquilla vulvar (Finge, 1985). La edad de aparición es muy variable, aunque clásicamente se decía que la mayor frecuencia de aparición era en torno a la séptima u octava década de la vida (Gosling, 1961). Actualmente se han observado dos picos de incidencia en edades tempranas y tardías. Algunas condiciones se han descrito asociadas más frecuentemente a carcinoma vulvar, como el liquen escleroatrófico (Ansink, 1993), la inmunosupresión (Choo, 1982) o la infección por HPV (Bloss, 1991). El papilomavirus humano se ha encontrado en aproximadamente el 50% de los casos (Ansink, 1993). El genotipo predominante es el HPV 16 (Buscema et al, 1988).

Al igual que ocurre con el carcinoma de pene, se han encontrado lesiones displásicas o preneoplásicas, que pueden evolucionar a carcinoma epidermoide. Estas

lesiones se denominan VIN (*vulvar intraepithelial neoplasia*) y se han dividido en grados I a III. Dentro de las lesiones carcinomatosas el tumor más frecuente es el carcinoma epidermoide, que representa aproximadamente el 90% de los tumores de vulva.

En las mujeres los factores de riesgo más conocidos incluyen: consumo de tabaco, multiparidad, tratamiento prolongado con anticonceptivos orales, precocidad en las relaciones sexuales, edad temprana del primer embarazo, presencia de otras enfermedades de transmisión sexual, múltiples compañeros sexuales, y contacto con varones de alto riesgo. Todo ello sugiere que ciertos agentes carcinogénicos son transmitidos por contacto sexual, y entre ellos el papilomavirus humano parece tener especial importancia, aunque esta asociación HPV / tumores de vulva no es tan clara como en el caso de los carcinomas de cérvix o pene.

1.4.2. Lesiones preneoplásicas de vulva

1.4.2.1. Condiloma acuminado

Se trata de una lesión hiperplásica benigna causada por HPV, generalmente del tipo 6 (McLachlin et al, 1994). Aparece como masas sobreelevadas de variable tamaño. Histológicamente se aprecia hiperplasia epitelial verruciforme, son hiperqueratosis y con un estroma subyacente que muestra vasos dilatados. Pueden observarse coilocitosis en los estratos más superficiales. No hay signos de invasión del estroma subyacente. Pueden encontrarse condilomas planos, que muestran características similares, pero sin hiperplasia verrucosa. Al igual que las lesiones de condiloma aluminado de pene, los condilomas acuminados de vulva sólo evolucionan a la malignidad de forma muy excepcional, y en casos de condilomas gigantes.

1.4.2.2. Lesiones escamosas intraepiteliales y carcinoma in situ

Existe un espectro de lesiones de vulva que se consideran precursoras del carcinoma y que reciben su denominación mediante una terminología muy amplia basándose en sus características clínicas o patológicas. Sin embargo, actualmente existe un consenso para denominar a estas lesiones como neoplasias vulvares intraepiteliales (*vulvar intraepitehlial neoplasias*, VIN). Este término se aplica a aquellas lesiones consistentes en atipia limitada al epitelio vulvar, sin componente

infiltrante. Las lesiones de tipo VIN se han clasificado en tres grados: VIN I, VIN II y VIN III, dependiendo del grado de atipia citológica que presenten, y especialmente del espesor del epitelio que aparezca ocupado por las células displásicas (Mills, 2004).

El tipo más frecuente es el VIN III, que constituye aproximadamente el 70% de los casos (Herdo, 1996). Microscópicamente se observa de la polaridad de las células, con células atípicas, de núcleos pleomórficos y con frecuentes figuras de mitosis. Se pueden observar células gigantes multinucleadas (células bowenoides).

1.4.3. Histología del cáncer de vulva

Podemos dividir los carcinomas epidermoides vulvares de forma similar a como hemos clasificado los carcinomas de pene, en cinco subtipos: carcinoma epidermoide de tipo común, carcinoma epidermoide condilomatoso, carcinoma epidermoide basaloide, carcinoma epidermoide verrucoso y carcinoma epidermoide sarcomatoide. En un estudio de 100 carcinomas epidermoides de vulva se observó que 7% eran de tipo condilomatoso, 28% basaloide, 65% queratinizantes de tipo común y el 5% restante de tipos poco frecuentes como el carcinoma sarcomatoide y el verrucoso (Kurman et al, 1993).

1.4.3.1. Carcinoma epidermoide de tipo común

Muestra nidos infiltrantes de carcinoma epidermoide con signos de queratinización. Se encuentra hiperplasia epidérmica adyacente a los focos tumorales en el 83% de los casos (Kurman et al, 1993).

1.4.3.2. Carcinoma basaloide

Se caracteriza por la formación de nidos de células con hipercromasia nuclear, escaso citoplasma y aspecto inmaduro de las células. No se suelen encontrar signos de diferenciación escamosa, pero en ocasiones puede observarse queratinización abrupta en forma de perlas córneas. Al igual que el tipo condilomatoso muestra frecuentemente focos de VIN en epitelio adyacente al tumor (Kurman et al, 1993).

1.4.3.3. Carcinoma verrucoso

Se trata de un tumor muy bien diferenciado que fue descrito por primera vez en vulva por Kraus (1966). Este tumor puede aparecer a cualquier edad, aunque es más frecuente en la sexta o séptima década de la vida. Macroscópicamente se trata de una lesión exofítica y en forma de coliflor, que puede aparecer ulcerada hasta en un tercio de los casos. Microscópicamente se encuentra una marcada hiperqueratosis,paraqueratosis y acantosis. Se encuentran procesos papilares con ejes fibrovasculares poco prominentes. Las crestas papilares son de aspecto bulboso con márgenes bien definidos que crecen de forma expansiva empujando el tejido subyacente. Se pueden encontrar microquistes de queratina. El pleomorfismo nuclear es mínimo y localizado en las zonas basales, al igual que las escasas figuras de mitosis presentes. El carcinoma verrucoso se ha correlacionado con la infección por papilomavirus. Frecuentemente se ha encontrado ADN de HPV (generalmente del tipo 11 ó 16) (Rando et al, 1986).

1.4.3.4. Carcinoma sarcomatoide

Se conoce también como carcinoma de células fusiformes. Se trata de una variante agresiva de carcinoma epidermoide de vulva (Copas et al, 1982). Suele aparecer como una lesión de tipo polipoide con ulceración y hemorragia. Las células tumorales son fusocelulares de aspecto sarcomatoide, anaplásicas y con frecuentes figuras de mitosis.

1.4.3.5. Carcinoma condilomatoso

Tienen un aspecto verrucoso, con hiperplasia papilar de la superficie. Se encuentran nidos infiltrantes, irregulares, en la base del tumor, así como signos de queratinización con perlas córneas y pleomorfismo nuclear.

1.4.4. HPV y cáncer de vulva

Los estudios sobre asociación de HPV y lesiones de vulva se encuentran supeditados a la subdivisión que en estos mismos trabajos se ha hecho de las lesiones vulvares: las lesiones neoplásicas vulvares asociadas a HPV se consideran derivadas de lesiones tipo VIN y tienen una alta tasa de incidencia de los genotipos 16 y 18 del virus (Bloss et al, 1991); por otro lado , las lesiones no asociadas a HPV son principalmente de tipo epidermoide común y se desarrollan en pacientes de mayor edad y con antecedentes de lesiones inflamatorias o autoinmunes (Toki et al, 1991).

En estos trabajos las tasas de asociación de HPV a las lesiones varían según el estudio pero en las lesiones tipo VIN se han encontrado valores de asociación del orden del 90-100% (Hørding et al, 1996;Van Beurden et al, 1998); en el caso de las lesiones neoplásicas los datos de incidencia referenciados con diferenes según la técnica utilizada para la detección del genoma viral, pero van desde el 97% en carcinomas de vulva de tipo *warty* (de Koning et al, 2008) hasta un 24% (Osakabe et al, 2007).

2. OBJETIVOS

- Detectar la presencia de HPV en cáncer de región genital externa, tanto masculina como femenina, mediante técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- Analizar la sensibilidad y especificidad de los dos sets de *primers* de consenso más utilizados en la detección de HPV en carcinomas de cérvix (My 09/11 y Gp5+/6+) en carcinomas de región genital externa.

- Identificar los diferentes genotipos de HPV relacionados con el cáncer de región genital externa.

- Establecer la frecuencia relativa de infección por HPV entre los tumores de región genital externa masculina y femenina.

- Estudiar la frecuencia de los diferentes tipos histológicos de tumores de región genital externa y su relación con la detección de HPV.

- Correlacionar la expresión de los genes supresores tumorales p16 y p53, con la presencia o no de HPV, con los genotipos de HPV detectados y con el tipo histológico de los tumores.

- Establecer si existe correlación entre los resultados obtenidos en tumores de región genital externa femenina y masculina.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE LOS CASOS DE ESTUDIO

3.1.1. Pacientes

Se seleccionaron de forma retrospectiva todos los casos de lesiones de pene y vulva diagnosticados como malignos o sospechosos de malignidad en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Albacete entre los años 1993-2003. La selección de los casos se hizo analizando los informes emitidos durante este período. De esta forma se obtuvieron 100 casos de pacientes con carcinoma de pene y 79 de carcinoma de vulva. Se recogieron los datos de filiación, edad y diagnóstico. Posteriormente se elaboró una tabla en formato Excel con el fin de agrupar los casos que correspondían a un mismo paciente y de poder analizar los datos.

3.1.2. Muestras

Se extrajeron todas las preparaciones histológicas de todos los casos de los archivos del servicio de Anatomía Patológica. Se pudieron obtener preparaciones histológicas de todos los casos. Se revisaron las preparaciones histológicas teñidas con técnica de hematoxilina-eosina y se seleccionaron las más representativas de las lesiones. Se obtuvieron los bloques histológicos de parafina de todas estas preparaciones.

3.2. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES

Una vez seleccionados los casos, se revisaron todas las preparaciones histológicas que se habían extraído de los archivos de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Albacete. Entonces se subclasificaron según los criterios histológicos estándar de las dos clasificaciones que hemos considerado idóneas para nuestro estudio, y que son las que actualmente se estiman como de mayor valor diagnóstico. Estas clasificaciones son las de Cubilla para carcinomas de pene (Cubilla et al, 2001), y la de Kurman para carcinomas de vulva (Kurman et al, 1993) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación histológica de los carcinomas peneanos y vulvares

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS CARCINOMA DE PENE (*Cubilla et al, 2001)*
Carcinoma epidermoide de tipo común
Carcinoma verruciforme
Carcinoma condilomatoso
Carcinoma papilar
Carcinoma verrucoso
Carcinoma sarcomatoide
Carcinoma basaloide

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS CARCINOMAS DE VULVA *(Kurman et al, 1993)*
Carcinomas infiltrantes
Carcinoma epidermoide de tipo común
Carcinoma condilomatoso
Carcinoma basaloide
Carcinoma verrucoso
Carcinoma sarcomatoide
Carcinomas *in situ*

3.3. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

Las técnicas clásicas de tinción histológica son de uso común en todo trabajo del ámbito de la Histología y de la Anatomía Patológica para la observación inicial o preliminar de muestras. Para su diagnóstico inicial las muestras seleccionadas se tiñeron rutinariamente con Hematoxilina-Eosina.

Tinción de Hematoxilina-Eosina

Esta técnica de tinción se basa en el contraste entre la naturaleza básica de uno de los colorantes, la **Hematoxilina de Hansen**, y la naturaleza ácida del otro, la **Eosina**.

Para obtener la Eosina preparamos una dilución al 0,5% añadiendo a 100 ml de agua destilada, 0,5 gr de Eosina amarillenta (Merck). Para hacer un litro de Hematoxilina de Hansen se disuelven 5 gr de hematoxilina en 50 ml de agua destilada caliente. Por otro lado, se disuelven 100 gr de Alumbre Potásico en 1000 ml de agua destilada caliente. Al día siguiente se mezclan las dos soluciones y se le añade 0,885 gr de Permanganato Potásico. La mezcla se lleva a ebullición y se mantiene hirviendo 1 minuto. Se deja enfriar antes de filtrar.

Para la realización de la técnica seguimos los siguientes pasos:

1. Desparafinar los cortes por inmersión en Xilol, tres pocillos con 10 minutos en cada uno.

2. Rehidratar en tres pocillos: el primero de alcohol absoluto, el segundo de alcohol 96º y el tercero de alcohol 70º (5 minutos en cada pocillo).

3. Enjuagar en agua destilada (dos pocillos, 5 minutos cada uno).

4. Introducir en Hematoxilina durante 5 minutos.

5. Lavar con agua corriente, hasta que el agua salga transparente.

6. Introducir en Eosina 2 minutos.

7. Lavar en un pocillo de agua corriente.

8. Deshidratar en tres pocillos de alcohol, en orden inverso a la hidratación inicial: alcohol 70º, alcohol 96º y alcohol absoluto.

9. Aclarar en Xilol, (3x5 minutos) y montar en DPX (BDH Laboratories).

3.4. TÉCNICAS MOLECULARES

Para el análisis del ADN viral recurrimos a la realización de técnicas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

3.4.1. Técnicas de PCR

Dada la gran sensibilidad de esta técnica para detectar el ADN viral, aún presente en número de copias muy bajo, ésta ha sido la base de nuestro trabajo, en lo que se refiere a la detección de HPV.

3.4.1.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de las biopsias incluidas en parafina se llevó a cabo partiendo de cuatro secciones de 5 μm del mismo bloque del tejido empleado para el diagnóstico histológico, teniendo la precaución de utilizar cuchillas nuevas con cada bloque y de limpiar el microtomo y todas las superficies con las que pudieran entrar en contacto las muestras con alcohol de 70º, para impedir la contaminación de ADN entre muestras.

La extracción de ADN se realizó usando un kit comercial para extracción de ácidos nucleicos QIAamp ADN Mini Kit (Ref 51306, Qiagen).

Inicialmente las muestras se desparafinaron realizando dos extracciones con xilol y otras dos extracciones con alcohol absoluto (96-100%). El tejido, una vez desparafinado, fue sometido a una lisis con proteinasa K (20 μl), incubándose durante toda una noche a 56ºC y sometiendo la muestra a agitación periódica para una mayor disgregación del tejido procesado. Una vez completada la digestión, la proteinasa K se inactivó añadiendo 200μl de buffer AL y calentando la muestra a 70ºC durante 10 minutos.

A continuación se aplicó la mezcla a una columna QIAamp Spin con un tubo de 2 ml, centrifugándose a 8000 rpm durante 1 min. A continuación se cambió el tubo que contenía el precipitado por otro limpio. Se añadieron sucesivamente 500 μl de buffer AW1 y 500 μl de buffer AW2, centrifugándose a 8000 y 14000 rpm respectivamente y cambiándose en ambos casos el tubo que contenía el filtrado por otro nuevo. El último paso consistió en añadir 200 μl de buffer AE o agua destilada e

incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, finalmente centrifugándose a 8000 rpm durante 1 minuto.

El filtrado se conservaba a -20ºC y se utilizaba para valorar la concentración y pureza del material genético extraído mediante medida en Nanodrop y posterior análisis por medio de PCR.

Aquellas muestras con una concentración de ADN menor de 15 ngr/µl, medida mediante Nanodrop, se consideraban insuficientes para el estudio de amplificación génica y se procedía a una nueva extracción de las mismas.

3.4.1.2. Amplificación mediante PCR

Describimos a continuación los diferentes pasos y componentes que forman parte de esta técnica, según los protocolos de trabajo utilizados para la realización del estudio.

3.4.1.2.1. Primers. Como ya se ha comentado en la introducción de la técnica, para la amplificación de regiones génicas mediante PCR es necesario el diseño e inclusión en el protocolo de sets de *primers* o iniciadores de la reacción que serán fragmentos (de ADN en este caso) complementarios a los extremos de la secuencia a amplificar.

En este caso se eligieron dos sets de *primers* de consenso referidos en la bibliografía previa, los sets My09/11 y Gp5+/6+ (Karlsen et al, 1996). Ambos sets de *primers* amplifican una región del gen L1 viral, pero con amplitudes distintas (Tabla 3).

El set de *primers* My09/11 amplifican una región de L1 de 450 pares de bases (pb) de amplitud, mientras que el set de *primers* Gp5+/6+ amplifica una región de L1 de 150 pb, teniendo la particularidad de que esta región es interna a la amplificada por My09/11.

Gp5+/6+ es un set de *primers* de consenso, es decir, su secuencia es aquélla lo más similar posible a todos los genotipos de HPV que se pretenden detectar. Por otro lado, los *primers* My09/11 son *primers* degenerados, la mezcla de *primers* que se incluye en las reacciones comprende variaciones de los mismos, con cambios de nucleótidos puntuales para aumentar su sensibilidad.

Tabla 3: Primers específicos para HPV que se han utilizado y secuencias.

PRIMER	SECUENCIA	LONGITUD DEL AMPLIFICADO (pb)
My09	5´- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3´(*)	450
My11	5´- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3´(*)	450
Gp5+	5´- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3´	150
Gp6+	5´- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3´	150

(*) Las variaciones en la secuencia de los primers My 09/11 son: M=A,C; R=A,G; W=A,T; Y=C,T

Como control de la calidad y de la integridad del ADN extraído, de manera previa a los protocolos de amplificación del genoma viral, se realizó a cada muestra la amplificación de un gen humano constitutivo, el de la β globina humana. Para ello se utilizó un set de *primers* específicos para una región de dicho gen, el set Hg063/064 (Saiki et al, 1988) (Tabla 4).

Tabla 4: Primers específicos para hemoglobina que se han utilizado y secuencias

PRIMER	SECUENCIA	LOMGITUD DEL AMPLIFICADO (pb)
Hg063	5´- ACT CCC AGG AGC AGG GAG GG -3´	249
Hg064	5´- TGG TCT CCT TAA ACC TGT CT -3´	249

***3.4.1.2.2. Descripción de la técnica*.** Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl por muestra, que incluían, además del ADN extraído, los *primers* correspondientes, la enzima *Taq* polimerasa y Cl_2Mg como sal requerida por el enzima.

El ADN se añadía en cantidad suficiente para alcanzar los 200 ngrs en cada reacción, dependiendo de su concentración inicial.

En el caso de los *primers*, y según indicaciones del proveedor, se añadía un volumen determinado de una dilución 1:10 de cada uno en su forma inicial. En el caso

del set My09/11 se añadían 2,5 µl de cada *primer* (2,5µl de My09 y 2,5 µl de My11) y en el caso del set de *primers* Gp5+/6+ se añadían volúmenes distintos de cada uno de ellos (3 µl de Gp5+ y 2,7 µl de Gp6+).

Para la adición de la polimerasa y las sales requeridas por ésta se optó por el uso de un kit comercial o mix, que incluía ambos componentes en las proporciones adecuadas para la reacción (Amplitaq Gold PCR Master Mix, Ref: 4318739, Applied Biosystems, U.S.). En este caso se añadieron 25 µl de la mezcla comercial por reacción, obteniendo así 2,5 unidades de polimerasa por cada mililitro de volumen final de reacción.

El volumen final, hasta alcanzar 50 µl, era completado con H_2O destilada, en el caso de que no se alcanzara dicho volumen con la mezcla de todos los componentes.

Como cada set de *primers* requería una temperatura de anillamiento distinta, se desarrollaron dos protocolos de PCR diferentes, uno para cada tipo de amplificación (Tabla 5).

Tabla 5: Condiciones de amplificación por PCR de genoma viral

CONDICIONES DE AMPLFICACIÓN DE HPV			
	TEMPERATURA	**TIEMPO**	**Nº CICLOS**
DESNAT. INICIAL	**94ºC**	**5 min**	**1**
DESNATURALIZACIÓN	**94ºC**	**30 seg**	**40**
HIBRIDACIÓN My/Gp	**55.9ºC/53ºC**	**1 min**	**40**
EXTENSIÓN	**72ºC**	**1 min**	**40**
EXTENSIÓN FINAL	**72ºC**	**10 min**	**1**

Las condiciones de amplificación del gen control (β-globina humana) eran distintas a las del virus, necesitando temperaturas e incluso número de ciclos distintos para su desarrollo (Tabla 6)

Tabla 6: Condiciones de amplificación por PCR de β globina humana

CONDICIONES DE AMPLFICACIÓN β GLOBINA			
	TEMPERATURA	TIEMPO	Nº CICLOS
DESNAT. INICIAL	94ºC	7 min	1
DESNATURALIZACIÓN	94ºC	1 min	45
HIBRIDACIÓN Hg	60ºC	1 min	45
EXTENSIÓN	72ºC	2 min	45
EXTENSIÓN FINAL	72ºC	10 min	1

3.4.1.3. Visualización de los resultados

La visualización de los resultados de la amplificación de HPV se realizó mediante el revelado con bromuro de etidio, en gel de agarosa. Para ello se preparó una dilución de agarosa 2% en tampón TAE (TAE Buffer 50x, Ref: 8548, Pronadisa), añadiéndose 5 µl de bromuro de etidio por cada 100 ml de dilución. Tras calentar la mezcla para una correcta homogeneización, se dejaba enfriar en molde para la elaboración del gel. Quince (15) µl del amplificado de cada muestra eran cargados en el gel junto a 2 µl de tampón de carga, y sometidos a electroforesis a 90-100 voltios a temperatura ambiente, para provocar la migración del genoma amplificado.

En un carril de los geles se añadían 3 µl de marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp ADN ladder, SM0243, Fermentas), a la vez que las muestras, para usarlo como patrón del tamaño de los amplificados obtenidos.

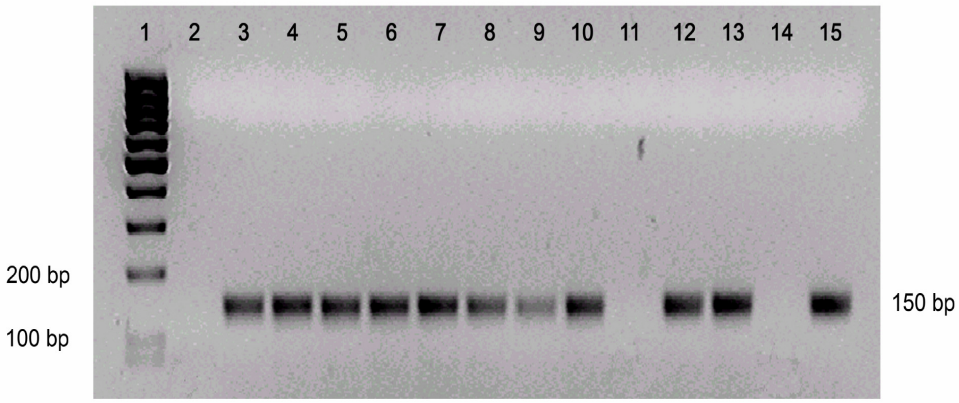

Fig. 15:- *Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN después de amplificación mediante PCR usando el set de primers Gp5+/6+. Se incluye un marcador de peso molecular en la columna 1, observándose la banda de amplificación de los casos positivos en el rango de los 150 pb. Los carriles 3- 13 presentan muestras estudiadas, el carril 2 corresponde al control de H_2O y los carriles 14 y 15 corresponden a los controles Hacat y Hela respectivamente*

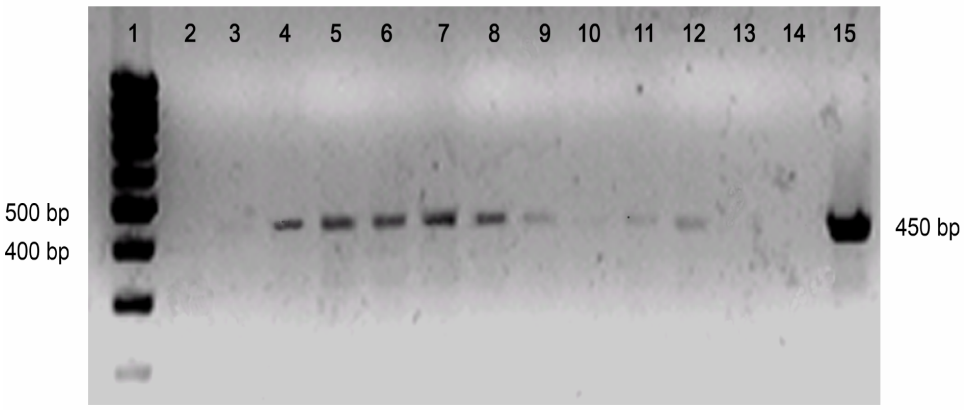

Fig. 16:- *Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN después de amplificación mediante PCR, y usando el set de primers My09/11. En este caso, la banda de amplificación de los casos positivos aparece en el rango de las 450 pb. Los carriles 3- 13 presentan muestras estudiadas, el carril 2 corresponde al control de H_2O y los carriles 14 y 15 corresponden a los controles Hacat y Hela respectivamente*

3.4.1.4. Controles

En todos los experimentos de amplificación se incluyó un control positivo, consistente en ADN extraído de la línea celular establecida transformada por HPV, la línea HeLa. De esta línea celular debemos obtener siempre un resultado positivo en la amplificación de HPV, puesto que se encuentra infectada y transformada por el genotipo HPV 18.

Como control de la especificidad de la técnica se usó una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados no transformados por HPV, la línea HaCat.

Contrariamente a Hela, de esta línea debemos obtener resultados negativos en la amplificación al ser una línea inmortalizada pero sin infección por HPV.

Se incluyó también un control negativo con agua, que contenía todos los componentes de la reacción excepto el ADN (sustituido éste por un volumen equivalente de H_2O destilada), para descartar la existencia de contaminaciones en el proceso.

Sobre estos controles, tanto positivos como negativos se realizó el mismo protocolo de amplificación que sobre las muestras, simultáneamente a éstas.

3.4.2. Identificación de genotipos

Las muestras que resultaron positivas en el análisis por PCR se secuenciaron utilizando el método desarrollado por Sanger (1977). Las reacciones se realizaron con el Kit Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing y las secuencias se determinaron en un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el sistema informático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), con el fin de determinar los genotipos del HPV presentes en nuestros casos de carcinoma de pene y vulva (Altschul et al, 1997).

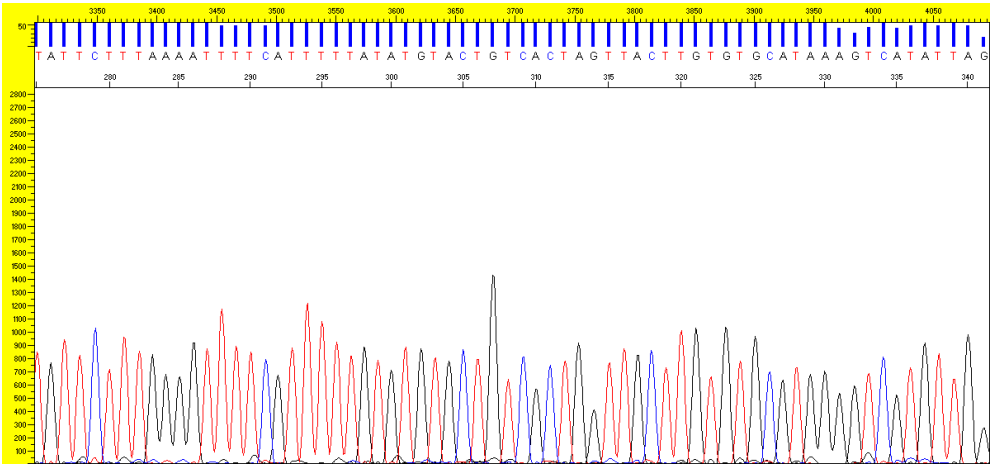

Fig. 17: Representación gráfica mediante software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) de la secuencia obtenida mediante amplificación por PCR

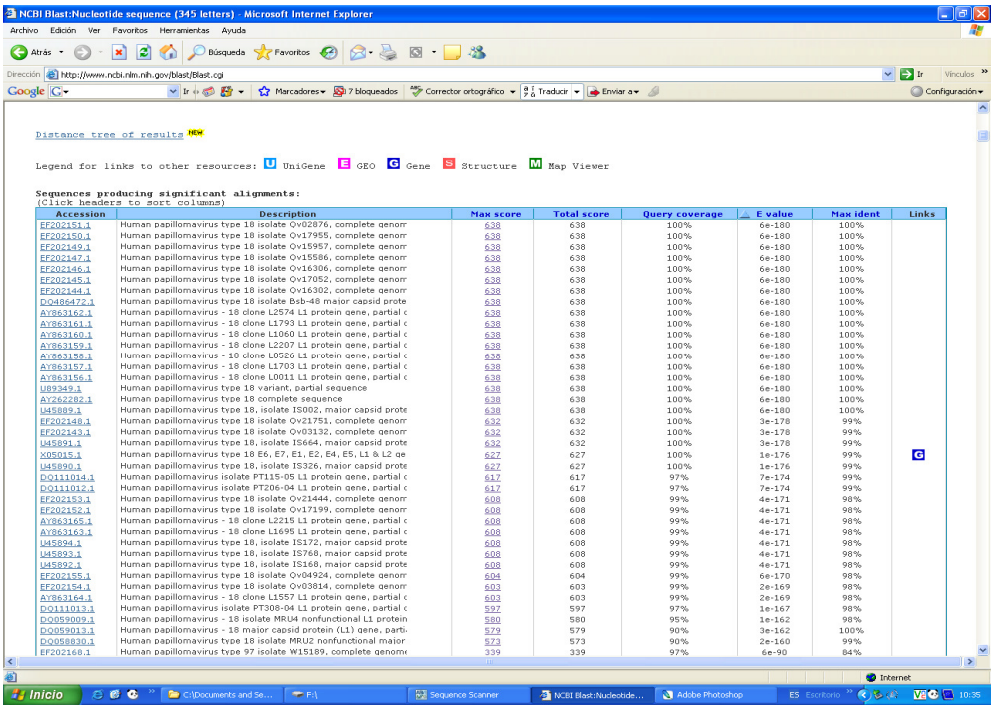

Fig. 18: La búsqueda informática con el sistema BLAST nos presenta el listado de coincidencias con nuestra secuencia y las referencias a consultar

3.5. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

El estudio inmunohistoquímico llevado a cabo en este trabajo fue enfocado a la detección de los productos de los dos genes a estudiar, las proteínas celulares p53 y p16.

Para ello, de las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, se cortaron secciones de 4 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas mediante inmersiones secuenciales en xilol y alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 80% y 75%) hasta introducirlas en agua destilada.

De manera previa al protocolo de marcaje inmunohistoquímico, las muestras fueron sometidas a un proceso de recuperación antigénica por calor. Una jarra Couplin con solución de desenmascaramiento (Target Retrieval Solution Ref. S2031, DAKO) fue precalentada a 95-99ºC, y entonces se introdujeron los cortes histológicos, incubándose durante 40 minutos en esta solución. Tras esto se dejaron enfriar las muestras (inmersas aún en el tampón) a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Este pretratamiento de recuperación antigénica supone un aumento de la intensidad de marcaje de numerosos anticuerpos primarios. Su principal objetivo es permeabilizar el tejido, para que el anticuerpo pueda acceder mejor al epítopo y eliminar las posibles interacciones de grupos reactivos del tejido con los productos de fijación, eliminando enlaces o puentes que impidan el acceso del anticuerpo.

El proceso de marcaje inmunohistoquímico, propiamente dicho, se realizó de manera automatizada en inmunoteñidor Dako Autostainer (S3400, Dako).

3.5.1. Detección inmunohistoquímica de proteína p53

Para la identificación de la proteína p53 en los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina se utilizó un anticuerpo específico anti-p53, clon DO-7.

1. Bloqueo de la peroxidasa endógena del tejido: 5 minutos de incubación con H_2O_2.

2. Lavado de las muestras con PBS.

3. Incubación de la muestra con el anticuerpo primario correspondiente durante 30 mintuos: 100 µl de anticuerpo/muestra.

4. Lavado de las muestras con PBS.

5. Aplicación del reactivo secundario (Link-HRP) durante 15 minutos: 100 µl reactivo/muestra.

6. Lavado de las muestras con PBS.

7. Aplicación del reactivo terciario (SA–HRP) durante 15 minutos: 100 µl reactivo/muestra.

8. Lavado con PBS.

9. Incubación con Diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos: 100 µl reactivo/muestra.

10. Lavado con PBS.

11. Contrastado con hematoxilina durante 5 minutos: 150 µl /muestra.

3.5.2. Detección inmunohistoquímica de proteína p16

En el caso concreto de p16, las técnicas de detección inmunohistoquímica se realizaron con el kit comercial CINtec $p16^{INK4}$ Histology Kit (K5336, Dako), que implica el uso de un anticuerpo específico anti-p16, clon E6H4.

1. Bloqueo de la peroxidasa endógena del tejido: 5 minutos de incubación con Peroxidase Blocking Reagent.

2. Lavado de las muestras con PBS.

3. Incubación de las muestras con el anticuerpo primario correspondiente durante 30 minutos: 100 µl de anticuerpo/muestra.

4. Lavado de la muestras con PBS.

5. Aplicación del reactivo de visualización durante 30 minutos: 100 µl reactivo/muestra.

6. Lavado con PBS.

7. Incubación con DAB durante 10 minutos: 100 µl reactivo/muestra.

8. Lavado con PBS.

9. Contrastado con hematoxilina durante 3 minutos: 150 µl/muestra.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el tramiento de los datos a nivel estadístico se consideraron los datos obtenidos como variables cualitativas dicotómicas, considerando en todos los casos la ausencia/presencia, es decir, se consideró la la infección como presencia/ausencia de HPV, así como la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos.

El test realizado fue, inicialmente el de X^2 para interpretación de tablas de contingencia 2x2, relacionando la presencia/ausencia con la expresión/no expresión de cada uno de los marcadores, con una *P=0,05* para el estadístico de Fisher. En el caso de que este test diera resultados no significativos se realizó la comprobación de la no asociación mediante los test de correlaciones bivariadas de Pearson y Rho de Spearman, con *P=0,05*

4. RESULTADOS

4.1. MUESTRAS

Inicialmente se realizó una búsqueda de casos en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Albacete, y se seleccionaron 179 casos de lesiones malignas, premalignas, o sospechosas de malignidad, de la región genital externa; 100 casos fueron de varón y 79 de mujer.. El análisis posterior de estas muestras demostró que los casos válidos para nuestro estudio eran 72 de región genital externa masculina y 44 de región genital externa femenina. Los casos que se descartaron se debieron a falta de material suficiente para los estudios que se iban a realizar. Además, se realizó un análisis clínico-patológico inicial de estas muestras, y tras éste, se descartaron 6 casos más de lesiones de pene y 2 de lesiones de vulva por tratarse de lesiones displásicas, pero que no reunían todos los requisitos para considerarse inequívocamente como carcinomas. Así pues, los casos seleccionados finalmente se corresponden a 65 muestras de carcinoma de pene y 42 de carcinoma de vulva. Todas las muestras seleccionadas mostraban material suficiente y susceptible de la realización de las técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de PCR necesarias para la realización de la presente tesis doctoral. Además, disponíamos de los datos de filiación necesarios que se correspondían con estas muestras.

4.1.1. Estudio histológico

Los casos de carcinoma fueron subclasificados utilizando la clasificación ya descrita en el apartado de material y métodos del presente trabajo.

4.1.1.1. Tipos histológicos de carcinomas de pene

Los casos analizados mostraban la distribución en tipos histológicos que aparece en la Tabla 7 y en la Figura 19.

Tabla 7: Tipos histológicos de carcinoma de pene en la serie

SUBTIPO HISTOLÓGICO	NÚMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE PREVALENCIA
C. EPIDERMOIDE C.	28	43%
C. BASALOIDE	1	1,60%
C. SARCOMATOIDE	1	1,60%
C. CONDILOMATOSO	24	37%
C. PAPILAR	6	9,20%
C. VERRUCOSO	2	3%
C. *in situ*	3	4,60%

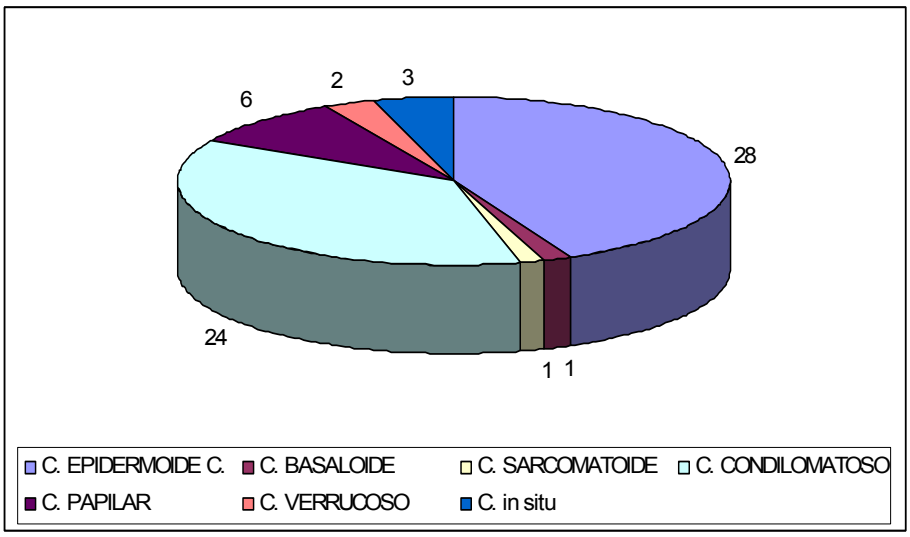

Fig. 19: Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de pene

Carcinoma *in situ*: De los 65 casos de carcinoma de pene 3 mostraban signos de carcinoma intraepitelial, con marcados signos de displasia intraepitelial severa, pero sin infiltración del estroma (Fig. 20).

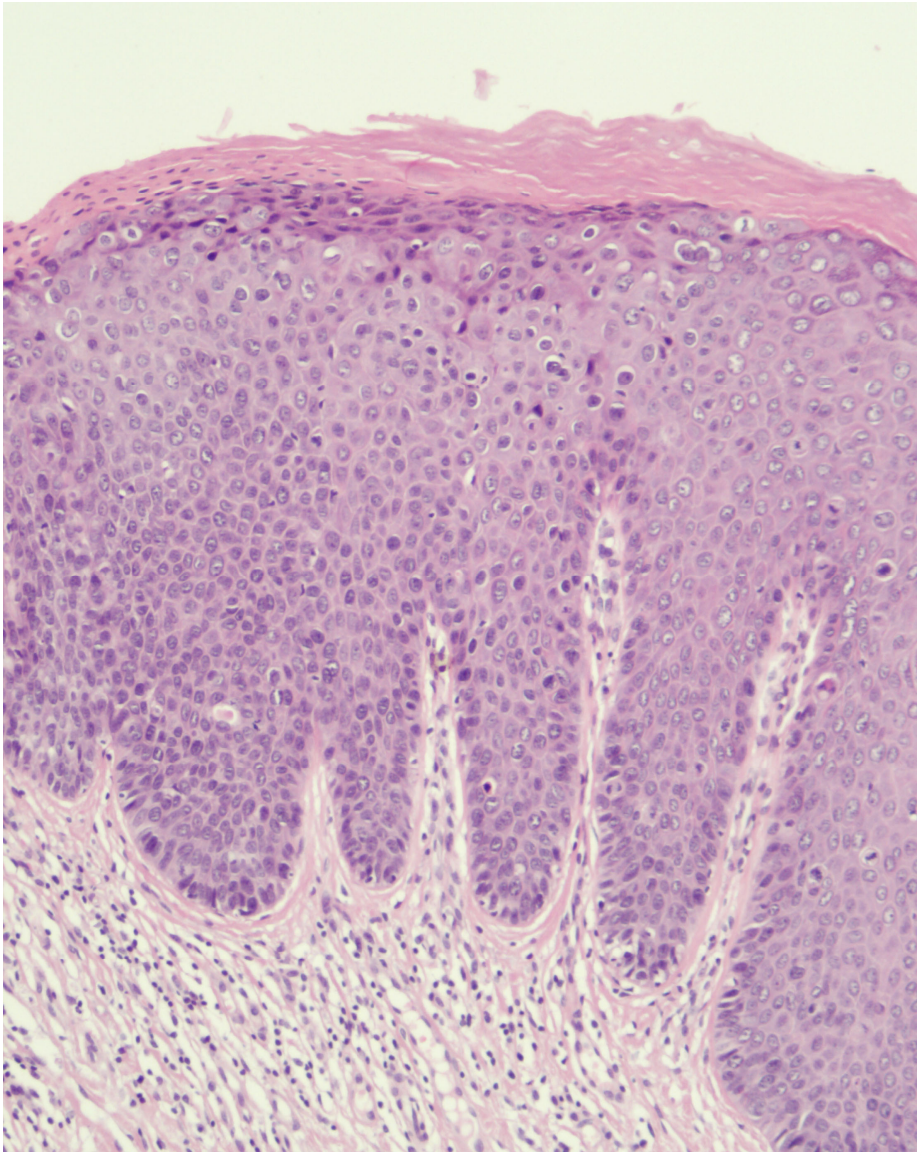

Fig. 20: Caso de carcinoma in situ. El epitelio muestra intensa atipia citológica y desorganización celular, sin que se aprecien signos de infiltración del estroma subyacente (HE x100)

Carcinoma de tipo común: 28 de los 65 casos mostraban, además de intensa atipia citológica, nidos infiltrando claramente el estroma (Figs. 21 y 22) con las características de carcinoma epidermoide de tipo común, con mayor o menor grado de diferenciación y queratinización.

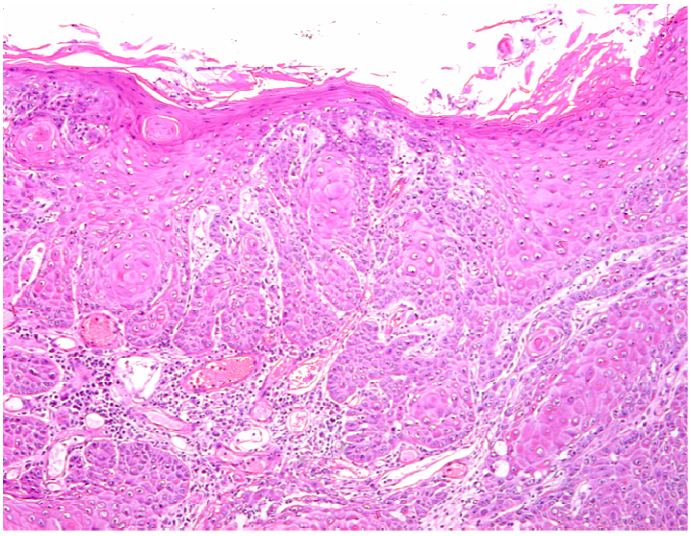

Fig. 21: Caso típico de carcinoma de pene de tipo común, en el que se aprecia un epitelio con hiper y paraqueratosis y desorganización epitelial, con infiltración del estroma (HE x40)

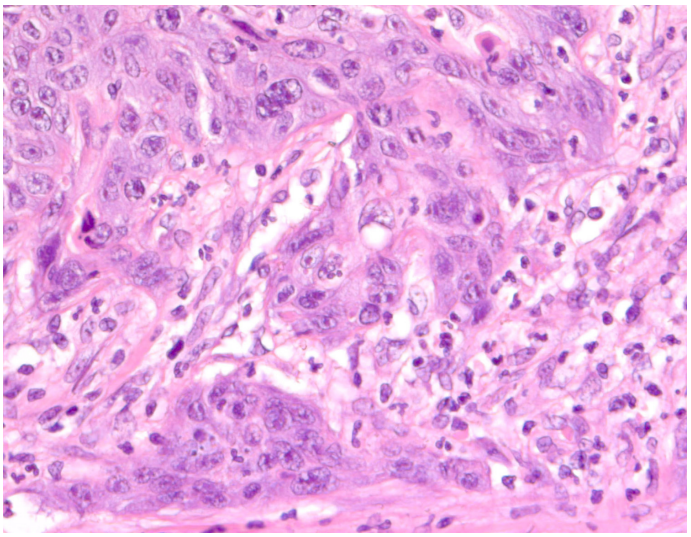

Fig. 22: Microfotografía a mayor aumento de la lesión anterior en la que se observa intensa atipia celular (HE x400)

Carcinomas verruciformes: Un total de 32 muestras fueron clasificadas dentro de este grupo heterogéneo que tienen en común el crecimiento exofítico con formación de papilas excrecentes. A su vez, siguiendo la clasificación de Cubilla (Cubilla et al, 2001) estos casos fueron subclasificados en los siguientes tres subtipos histológicos:

a) Carcinoma condilomatoso: 24 de los 65 casos presentaban características de carcinoma condilomatoso. Estos casos se caracterizan por la presencia de papilomatosis, con paraqueratosis (Figs. 23-25). Se observa atipia citológica, y de forma característica aparecen numerosas células con atipia de tipo coilocítico, que muestran citoplasmas claros y células binucleadas. De forma característica, en estos casos aparecían acúmulos de células inflamatorias de tipo neutrofílico, formando abscesos, en el interior de los nidos infiltrantes.

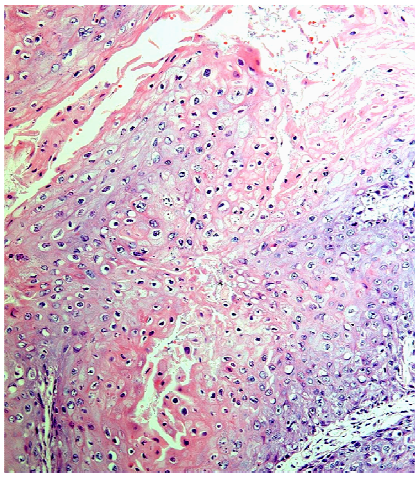

Figura 23: Carcinoma condilomatoso. Hiperplasia verrucosa epitelial con paraqueratosis y atipia citológica (HE x100)

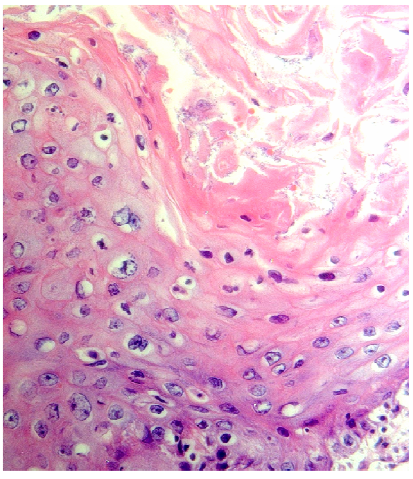

Figura 24: Mayor aumento de otra zona de la misma muestra que en la figura anterior, que muestra la habitual atipia coilocítica con células binucleadas y citoplasma claro (HE x400.

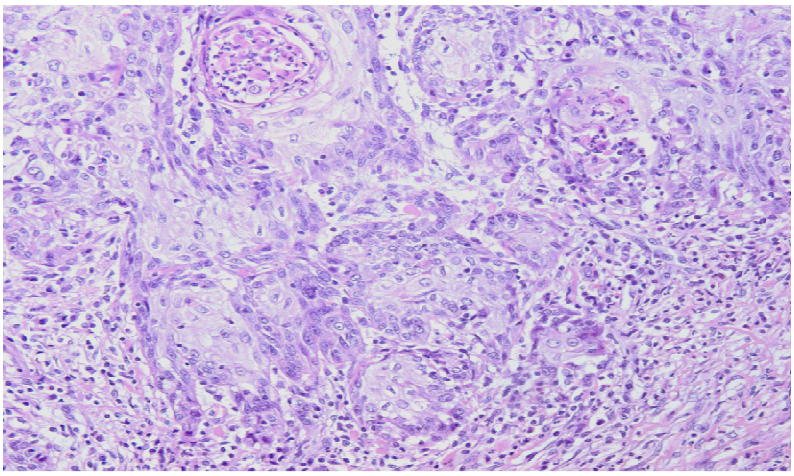

Fig. 25: Zona infiltrante de carcinoma condilomatoso. Se observan nidos y cordones infiltrantes de células epiteliales malignas, con abscesos neutrofílicos (HE x100).

b) Carcinoma verrucoso: Dos de los carcinomas de pene analizados presentaban las características de carcinoma verrucoso, con escasa atipia citológica e infiltración en frente único, formando lengüetas epiteliales rodeadas por inflamación linfocítica (Fig. 26)

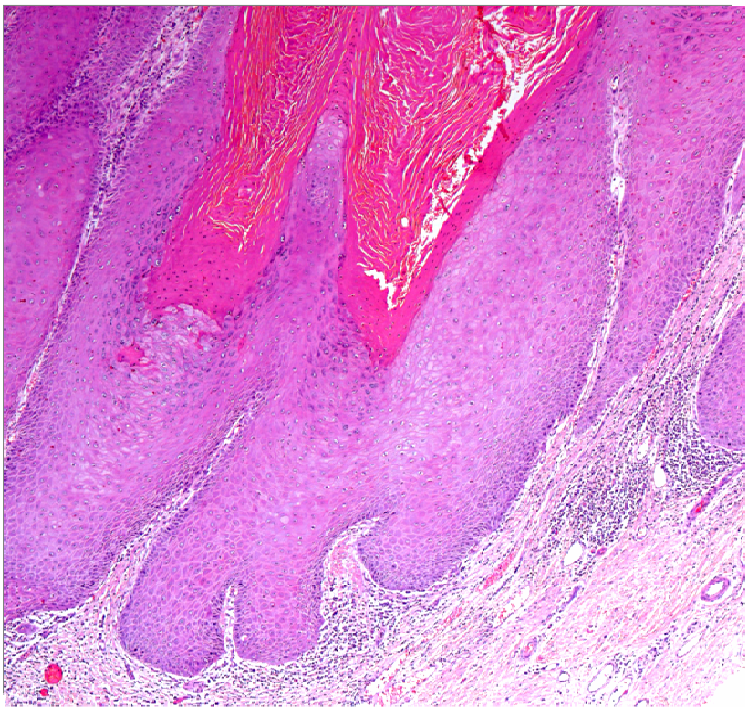

Fig. 26: Carcinoma verrucoso con frente de infiltración expansivo y escasa atipia citológica (HE x400)

c) Carcinoma papilar: Seis de los casos seleccionados para el estudio mostraban características de carcinoma papilar (Fig. 27). Esta entidad presenta características que se pueden considerar intermedias entre el carcinoma condilomatoso y el carcinoma verrucoso. Muestra un carácter infiltrante, pero sólo de forma muy focal puede encontrarse atipia coilocítica.

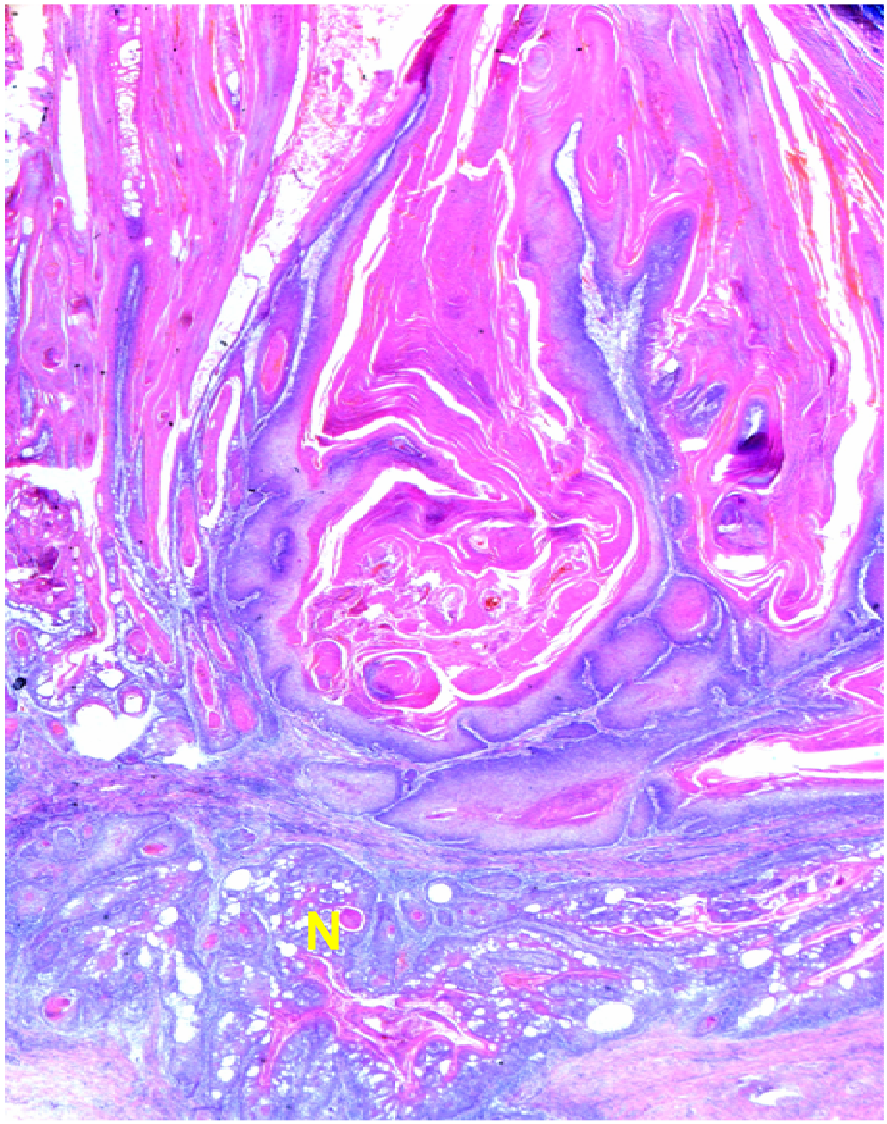

Fig. 27: Carcinoma papilar, con marcada hiperqueratosis y papilomatosis. Se observan en profundidad nidos infiltrantes (N) *(HE x250)*

Carcinoma sarcomatoide*:* Uno de los carcinomas presentaba características de carcinoma sarcomatoide. Este caso mostraba el doble componente epitelial-mesenquimal característico de estas lesiones (Figs. 28-30).

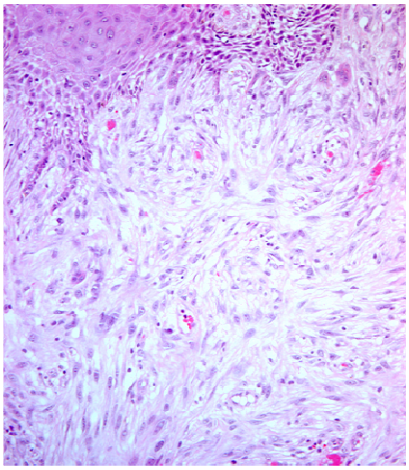

Fig. 28: Carcinoma sarcomatoide. Existe un componente bifásico fusocelular y epitelial (HE x100)

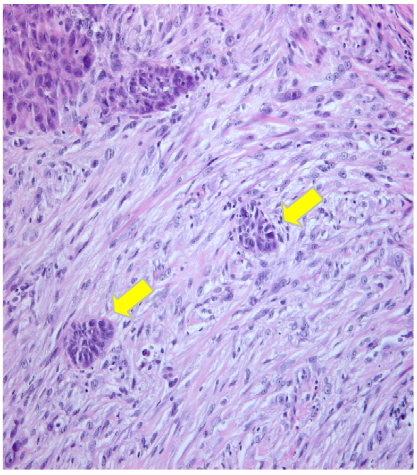

Fig. 29: Se observan nidos de carcinoma entre el componente sarcomatoide (flechas) (HE x200).

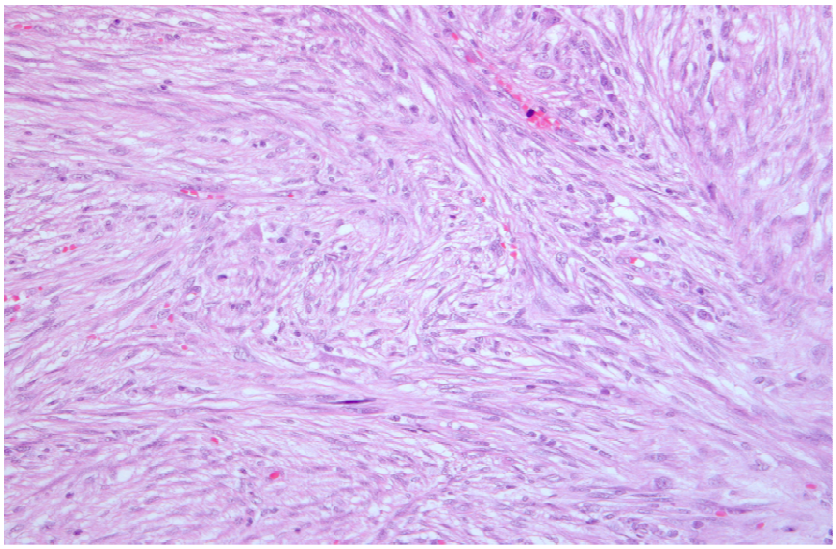

Fig. 30: El componente sarcomatoide es típicamente fusocelular, formando haces entrelazados, con atipia citológica (HE x200.

La naturaleza mesenquimal y epitelial de los tumores pudo ser demostrada mediante técnicas de inmunohistoquímica, con vimentina (Fig. 31) y keratina (Fig. 32) respectivamente.

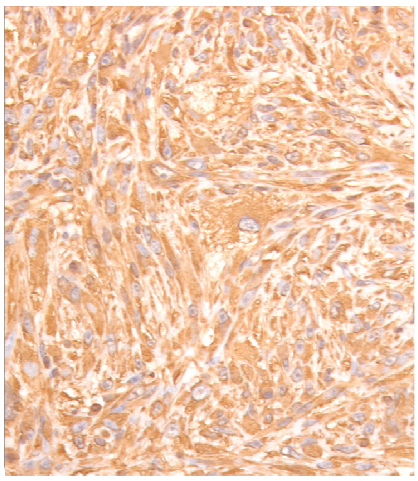

Fig. 31: Tinción inmunohistoquímica con vimentina.El carcinoma sarcomatoide muestra positividad difusa (x200)

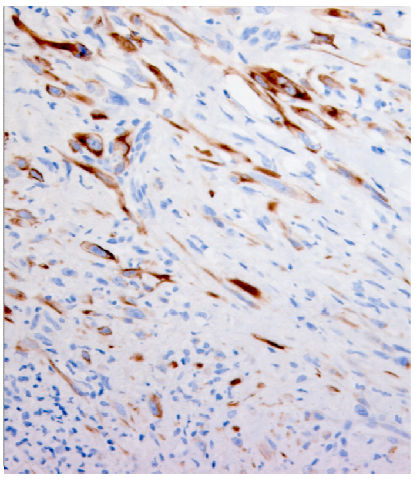

Figura 32: Tinción inmunohistoquímica con citoqueratina AE1-AE3. El carcinoma sarcomatoide muestra positividad en células aisladas (x200)

Carcinoma basaloide*:* Uno de los casos analizados se correspondía con un carcinoma basaloide, en el que las células tumorales mostraban un aspecto basaloide, con células en la periferia que adoptaban una disposición en empalizada (Fig. 33).

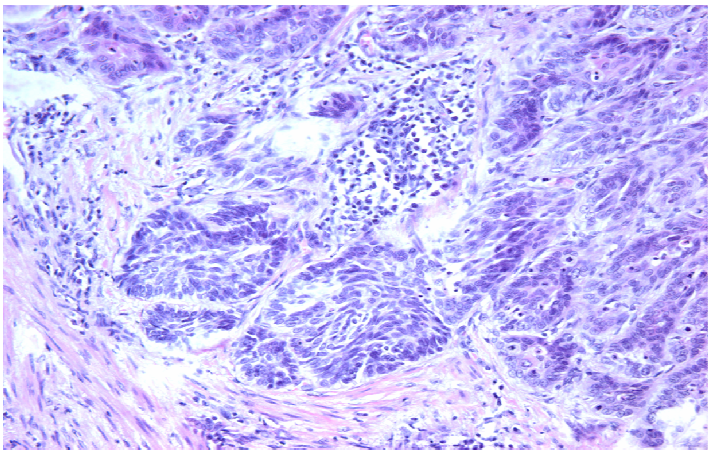

Fig 33: Se muestran los nidos infiltrantes del único carcinoma basaloide de pene de la serie (HE x 100)

4.1.1.2. Tipos histológicos de carcinomas de vulva

La Tabla 8 y la Figura 34 muestran los resultados de los tipos histológicos obtenidos tras el análisis de los casos de carcinoma de vulva.

Tabla 8: Tipos histológicos de carcinoma de vulva encontrados en la serie

SUBTIPO HISTOLÓGICO	NÚMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE PREVALENCIA
C. EPIDERMOIDE C.	23	54,80%
C. BASALOIDE	3	7,10%
C. CONDILOMATOSO	3	7,10%
C. *in situ*	12	28,60%
C. BASOCELULAR	1	2,40%

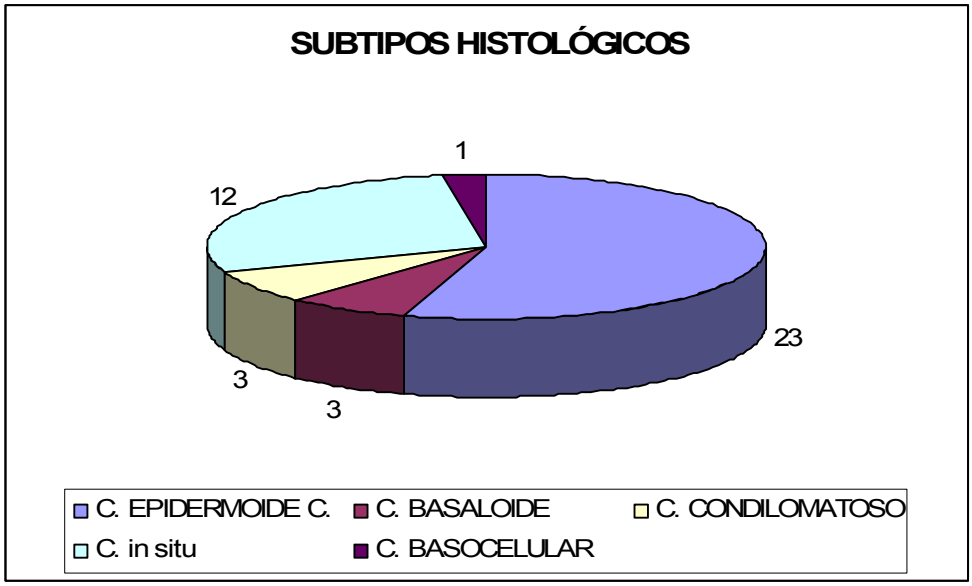

Fig. 34: Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de vulva

Carcinoma *in situ*: 12 de los 42 casos de carcinoma de vulva mostraban intensa atipia epitelial sin que se observara infiltración del estroma (Fig. 35).

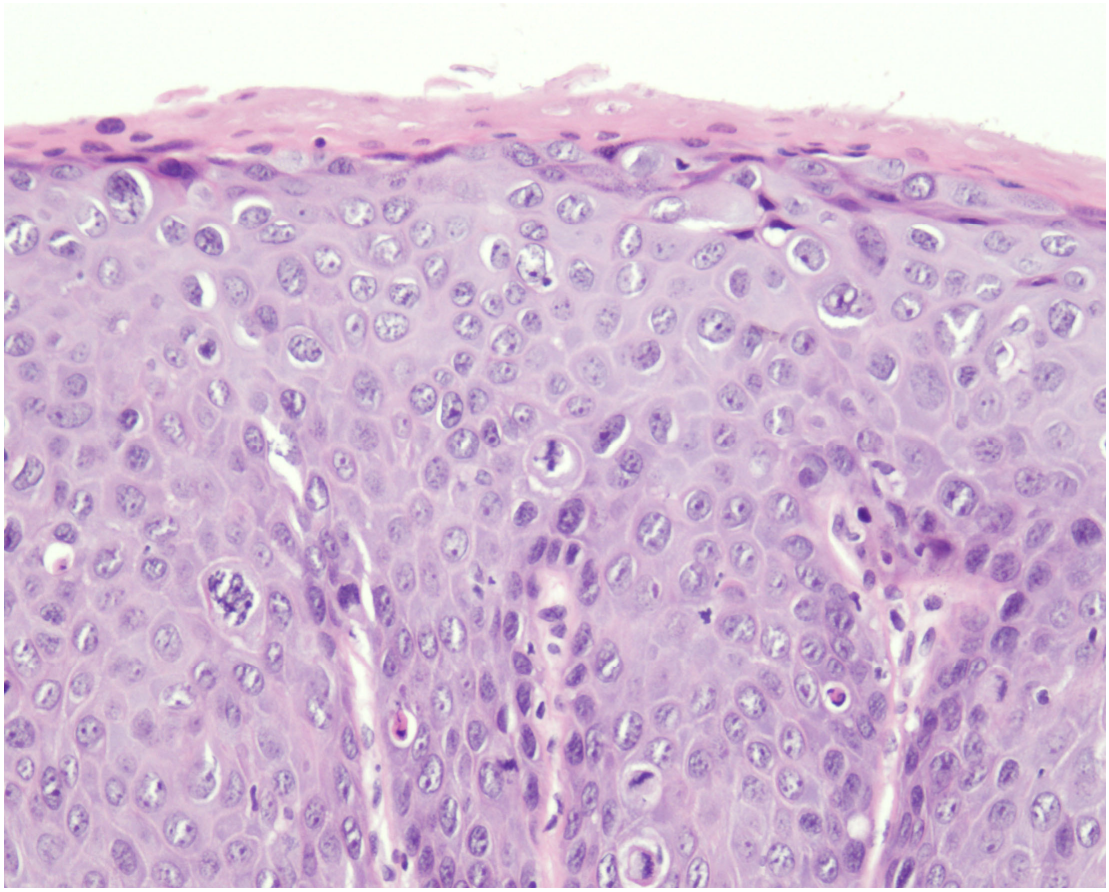

Fig. 35: Caso de carcinoma in situ. El epitelio muestra una intensa atipia citológica y desorganización celular, con frecuentes figuras de mitosis. No se aprecia infiltración del estroma subyacente (HE x200)

Carcinoma de tipo común: De los 42 casos analizados 23 mostraban nidos de infiltración neta del estroma, con intensa atipia citológica (Figs. 36 y 37).

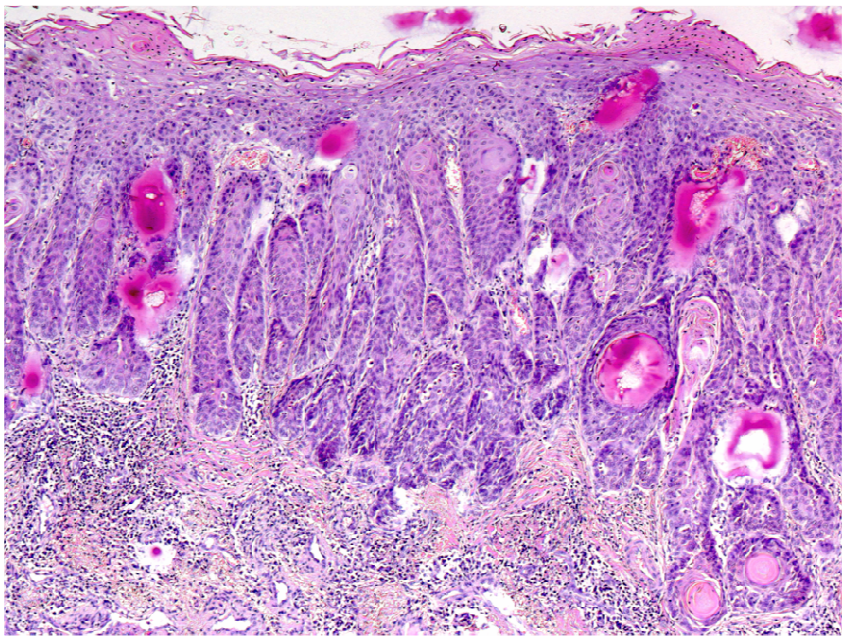

Fig. 36: Caso de carcinoma de vulva de tipo común que muestra diferenciación escamosa, con nidos de queratinización (HE x100)

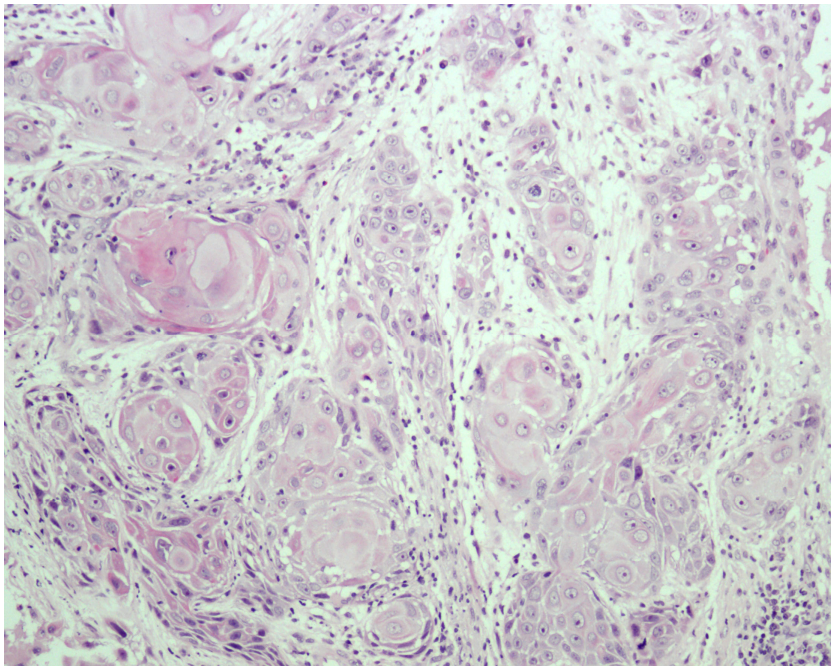

Fig. 37: Carcinoma de vulva de tipo común. Nidos infiltrantes con atipia citológica (HE x200)

Carcinoma condilomatoso: De los 42 casos analizados de tumores de vulva 3 presentaban características de carcinoma condilomatoso. Estos casos se caracterizaban por la presencia de papilomatosis, con paraqueratosis y atipia citológica de tipo coilocítico que muestran citoplasmas claros y células binucleadas (Fig. 38).

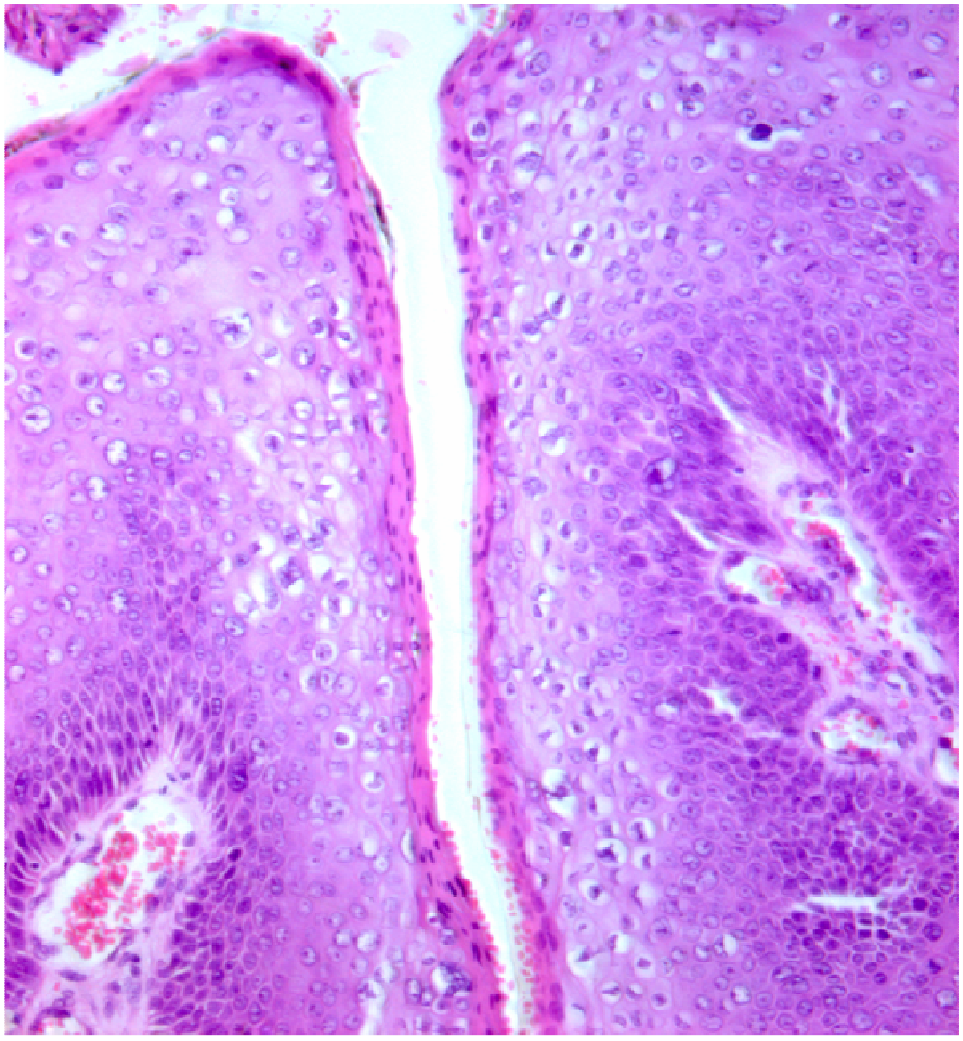

Fig. 38: Carcinoma condilomatoso de vulva con atipia citológica de tipo coilocítico (HE x200)

Carcinoma basaloide: Sólo 3 de los casos de la serie de carcinomas de región genital externa femenina presentaban características de carcinoma basaloide.

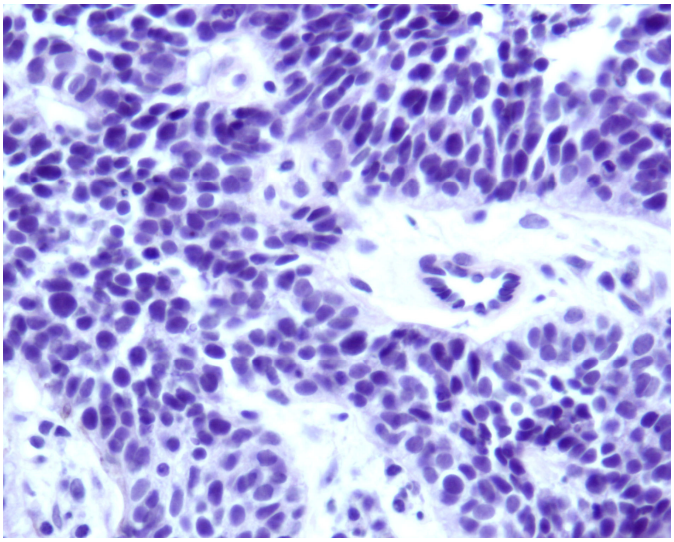

Fig. 39: Carcinoma de vulva de tipo basaloide. Células basófilas atípicas con escaso citoplasma (HE x200)

Carcinoma basocelular: A diferencia de los carcinomas basaloides, el caso de carcinoma basocelular descrito en la serie presentaba nidos con clara empalizada periférica, compuestos por células basaloides con fenómenos de apoptosis y numerosas figuras de mitosis.

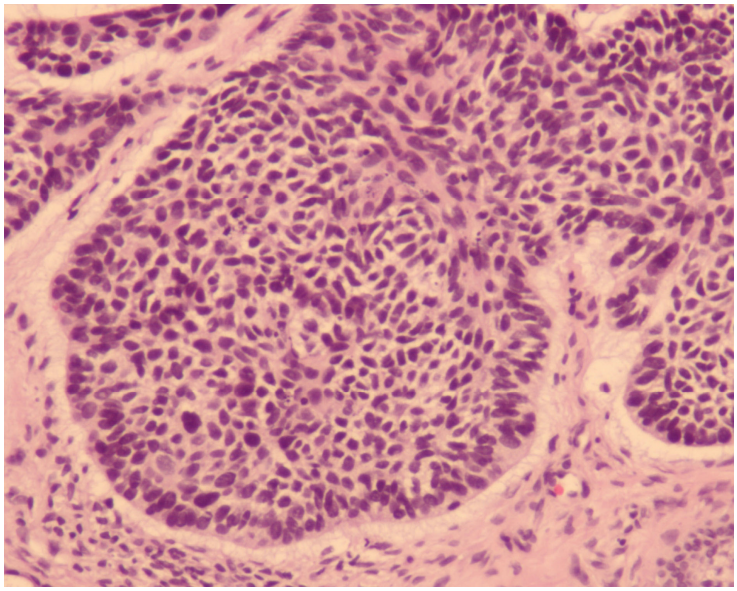

Fig. 40: Carcinoma basocelular de vulva. Los nidos tumorales muestran empalizada periférica y retracción del estroma (HE x200)

4.1.2. Resultados de los estudios de PCR

4.1.2.1. Detección de HPV en casos de carcinoma de pene

El número de casos de carcinoma de pene positivos para HPV o casos en los que la detección de papilomavirus fue posible, resultaría de la suma de los casos positivos con los *primers* Gp5+/6+, con los *primers* My09/11, o con ambos juegos de *primers*. Estos resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Porcentajes de positividad con la técnica de PCR en carcinomas de pene

CON UNO O AMBOS PRIMERS	49/65 (75,4%)
CON My09/11	43/65 (70,7%)
CON Gp5+/6+	25/65 (38,4%)

4.1.2.2. Detección de HPV en casos de carcinoma de vulva

También los carcinomas de vulva mostraban un número distinto de casos positivos con los dos juegos de *primer*s que se analizaron. En este caso los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Porcentajes de positividad con la técnica de PCR en carcinomas de vulva

CON UNO O AMBOS PRIMERS	11/42 (26,2%)
CON My09/11	7/42 (16,7%)
CON Gp5+/6+	7/42 (16,7%)

4.1.2.3. Análisis de la sensibilidad de la técnica

Para el análisis de la sensibilidad de la técnica de PCR consideramos como casos positivos o *gold estándar* todos los casos que resultaron positivos con cualquiera de los dos sets de *primers* empleados, o con los dos.

Este número total de muestras positivas es de 60 contabilizando las muestra de pene y de vulva, valor que usaremos como referencia para el cálculo del porcentaje de sensibilidad de los diferentes sets de de *primers.*

Mediante la amplificación con los *primers* My09/11 obtuvimos un total de 50 muestras positivas (43 de pene y 7 de vulva), lo cual representa un porcentaje de positividad del 83,3 % del total de sensibilidad de la técnica.

Con el set de *primers* Gp5+/6+ obtuvimos 32 muestras positivas (25 de pene y 7 de vulva), siendo un 53,3 % del total de la sensibilidad de la técnica.

4.1.2.4. Genotipado de las muestras

Todos los casos donde se detectó la presencia de papilomavirus fueron genotipados mediante secuenciación, siguiendo la técnica que se describió en el apartado Material y Métodos. Los genotipos detectados en carcinomas de pene aparecen en la Tabla 11 y los de carcinoma de vulva en la Tabla 12. Los casos en los que no se pudo determinar el genotipo son probablemente casos infectados por varios genotipos, en los que la secuenciación puede aparecer distorsionada.

Tabla 11: Genotipos detectados en carcinomas de pene y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos

	CASOS	PORCENTAJE
HPV+	**49/65**	**75,40%**
HPV 16	**42/49**	**85,70%**
HPV 18	**4/49**	**8,30%**
HPV 11	**1/49**	**2,00%**
NO CONCLUYENTES	**2/49**	**4,00%**

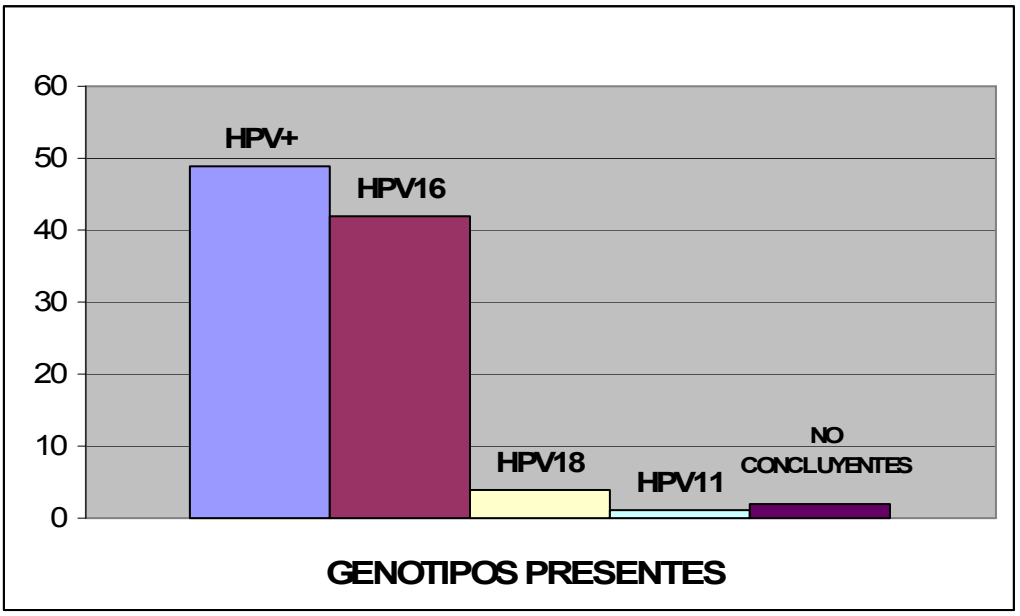

Fig. 41: Genotipo de los 49 casos positivos de carcinoma de pene

Tabla 12: Genotipos detectados en carcinomas de vulva y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos

	CASOS	PORCENTAJE
HPV+	**11/42**	**26,2%**
HPV 16	**2/11**	**18,2%**
HPV 18	**5/11**	**45,5%**
HPV 33	**3/11**	**27,3%**
HPV 35	**1/11**	**9%**

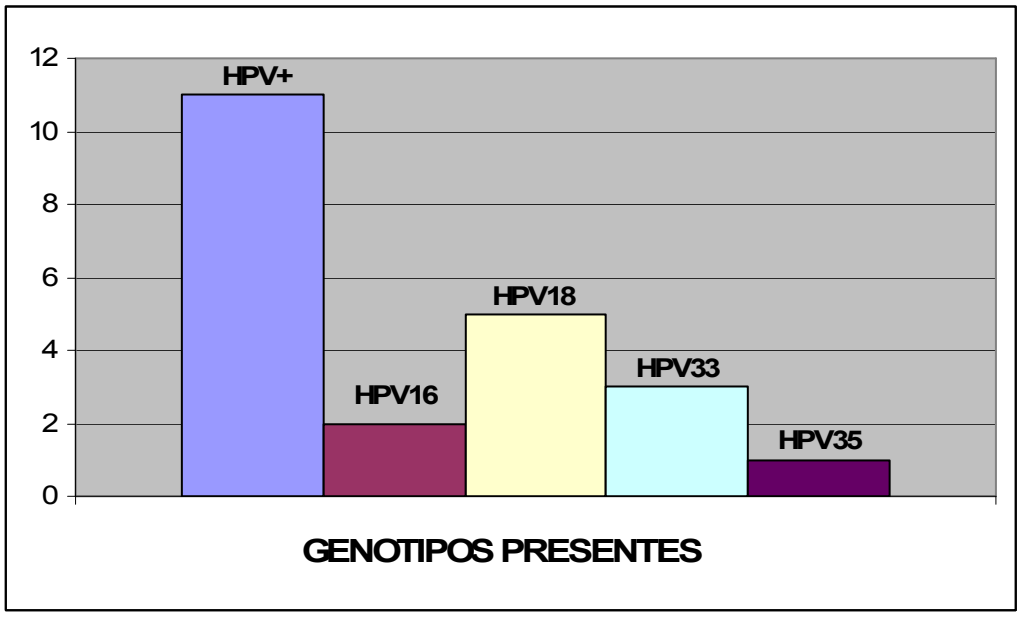

Fig. 42: Genotipo de los 11 casos positivos de carcinoma de vulva

4.1.3. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos

Los patrones de tinción inmunohistoquímica resultaron similares en los grupos de tumores de región genital externa masculina y femenina, aunque presentaban distinta frecuencia. Los resultados, en cuanto a los casos positivos y las diferencias de intensidad de tinción inmunohistoquímica, los presentamos en los siguientes apartados.

4.1.3.1. Análisis inmunohistoquímico de p53 en carcinomas de región genital externa

La expresión inmunohistoquímica de p53 se pudo detectar en el núcleo de los casos positivos. De acuerdo a los parámetros de interpretación que establecimos (ver Material y Métodos) encontramos que 35 casos de carcinoma de vulva y 58 de carcinoma de pene fueron p53 positivos (Figs. 43-45), siendo el resto de casos negativos.

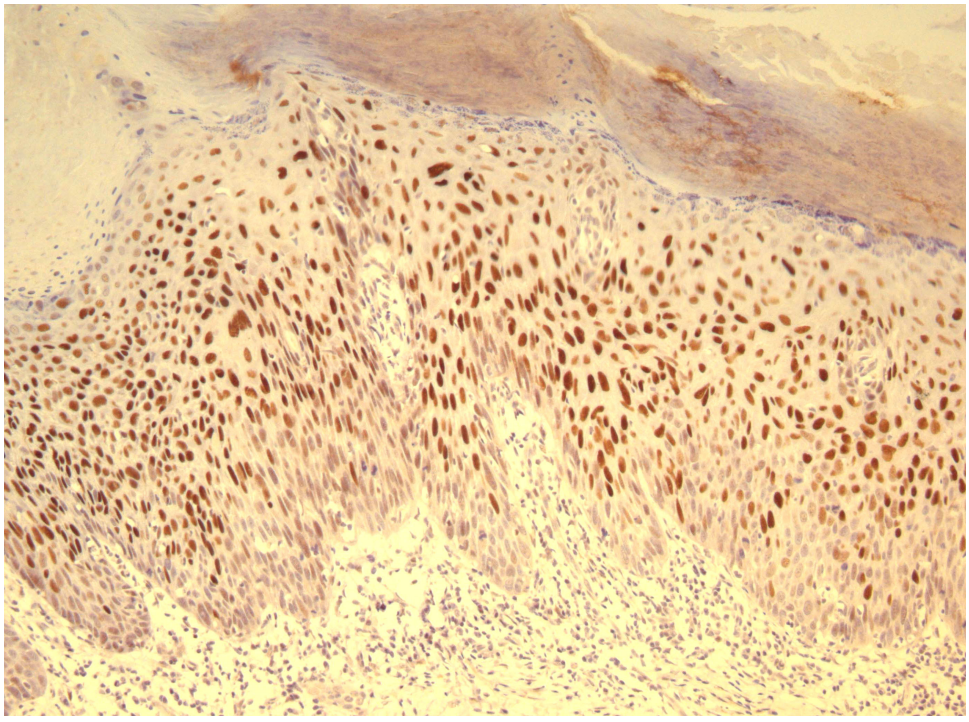

Fig. 43: Caso moderadamente positivo de carcinoma de pene. Se observa tinción de núcleos de la capa media, respetando las zonas periféricas (x40)

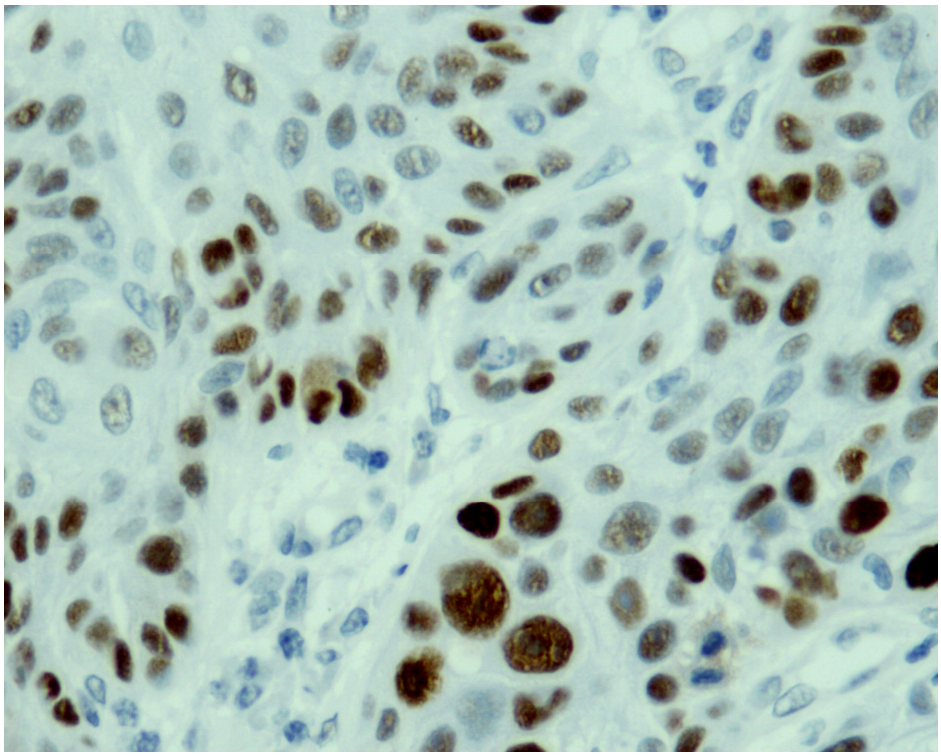

Fig. 44: Caso moderadamente positivo de carcinoma de pene (x400)

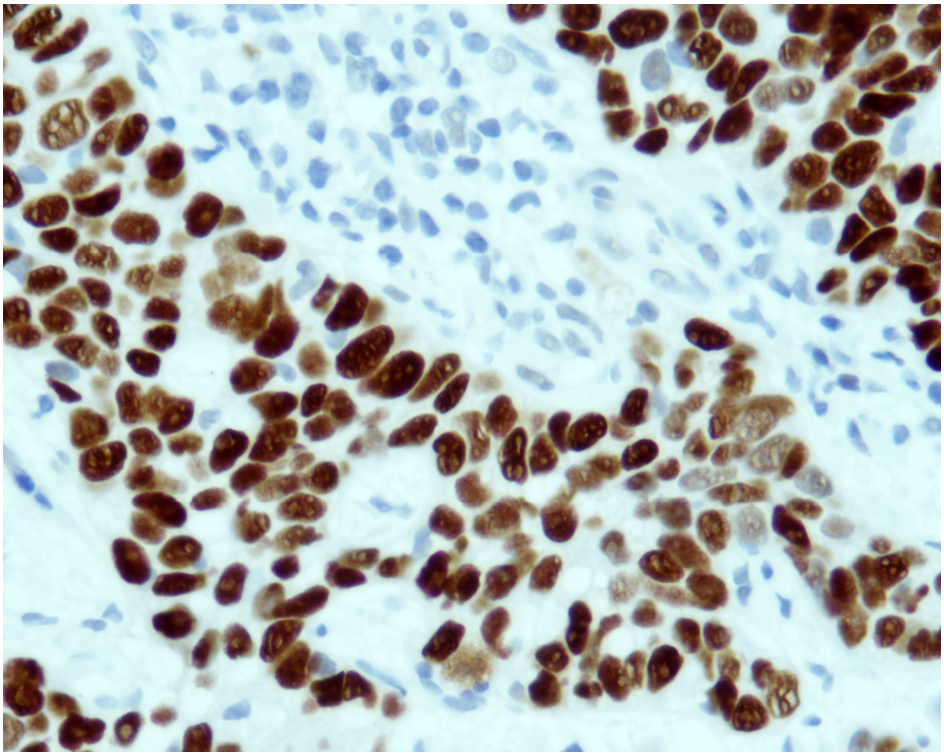

Fig. 45: Caso intensamente positivo de carcinoma de pene (x400)

4.1.3.2. Análisis inmunohistoquímico de p16 en carcinomas de región genital externa

La detección de la proteína producto del gen supresor tumoral p16 en los carcinomas de pene y vulva analizados demostró tinción tanto en núcleo como en citoplasma. El análisis inmunohistoquímico con p16 demostró que 41 muestras de carcinoma de pene y 14 muestras de carcinoma de vulva resultaron ser p16 positivas (Figs. 46-48).

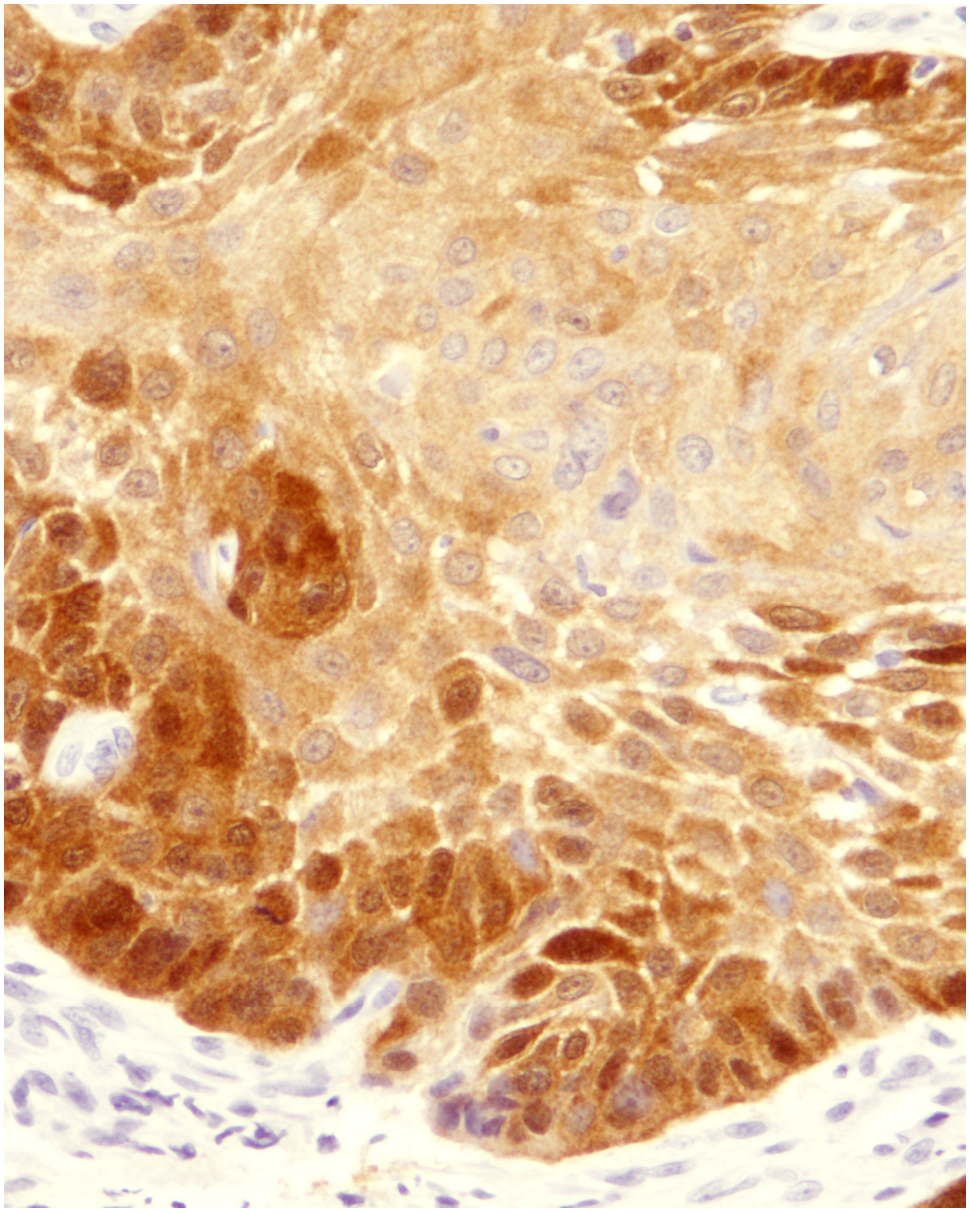

Fig. 46: Carcinoma epidermoide de pene moderadamente positivo para p16 (x200)

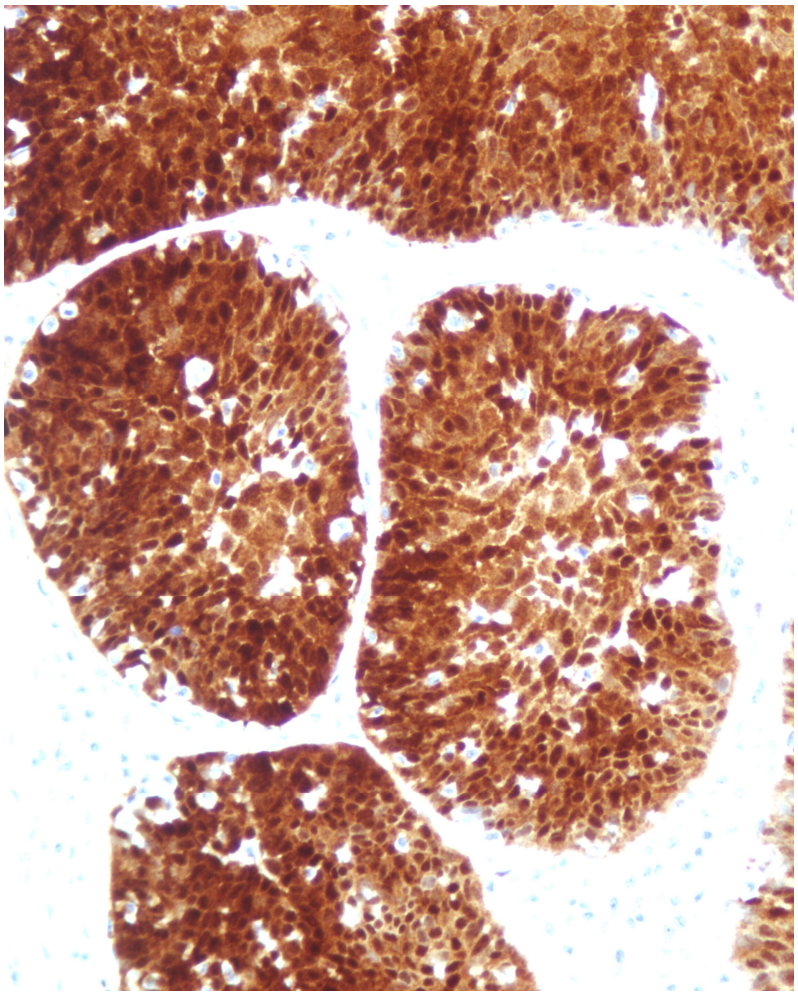

Fig. 47: Carcinoma epidermoide de pene intensamente positivo para p16 (x100)

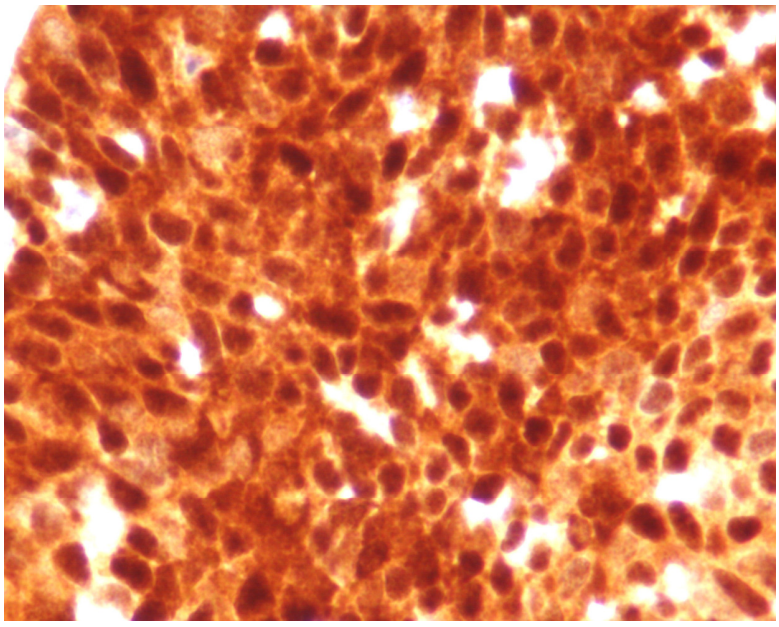

Fig. 48: Carcinoma epidermoide de pene intensamente positivo para p16. Se observa tinción tanto en el núcleo como en el citoplasma (x400)

4.1.3.3. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de pene

De las 16 muestras de pene negativas para presencia de HPV, 14 fueron p53+, y de las 49 muestras positivas para HPV 44 fueron p53+. El marcaje de p16 resultó positivo en 32 muestras HPV+ y en 9 muestras HPV- (Tabla 13 y Figura 49).

Tabla 13: Número de muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentajes de expresión sobre el total de carcinomas de pene

	CASOS HPV+	CASOS HPV-
	49 (75,4%)	16 (24,6%)
p16+	32 (65%)	9 (56,3%)
p53+	44 (88%)	14 (87,5%)

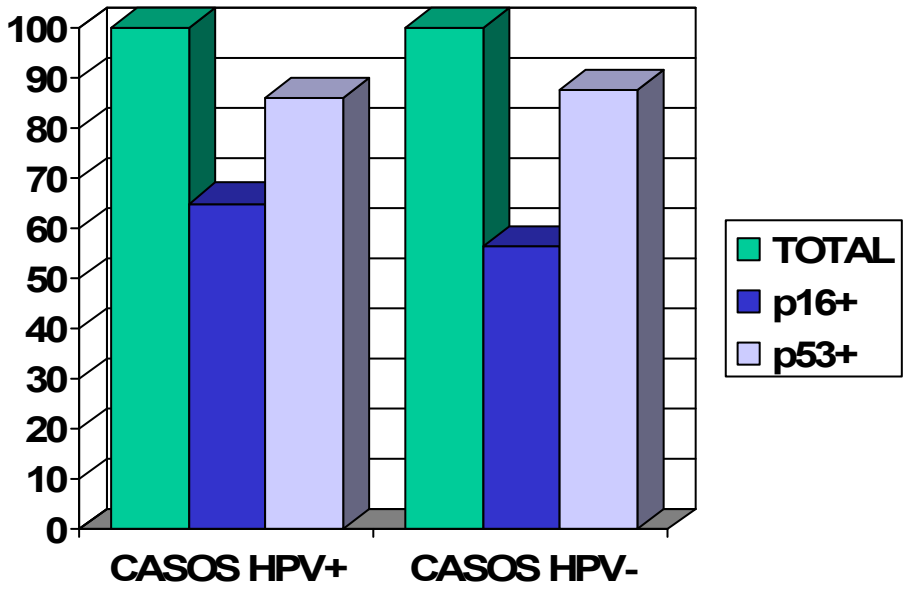

Fig. 49: Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en carcinomas de pene

4.1.3.4. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de vulva

De las 11 muestras de carcinoma de vulva positivas para HPV, 6 demostraron ser positivas para p53, y de las 31 muestras negativas para HPV, 29 fueron p53+. De las 11 muestras HPV+ en vulva, 6 fueron p16 positivas, mientras 8 de las 31 muestras HPV- fueron p16 positivas (Tabla 14 y en la Figura 50)

Tabla 14: Número de muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentajes de expresión sobre el total de carcinomas de vulva

	CASOS HPV+	CASOS HPV-
	11 (26,2%)	31 (73,8%)
p16+	6 (54,5%)	8 (25,8%)
p53+	6 (54,5%)	29 (93,5%)

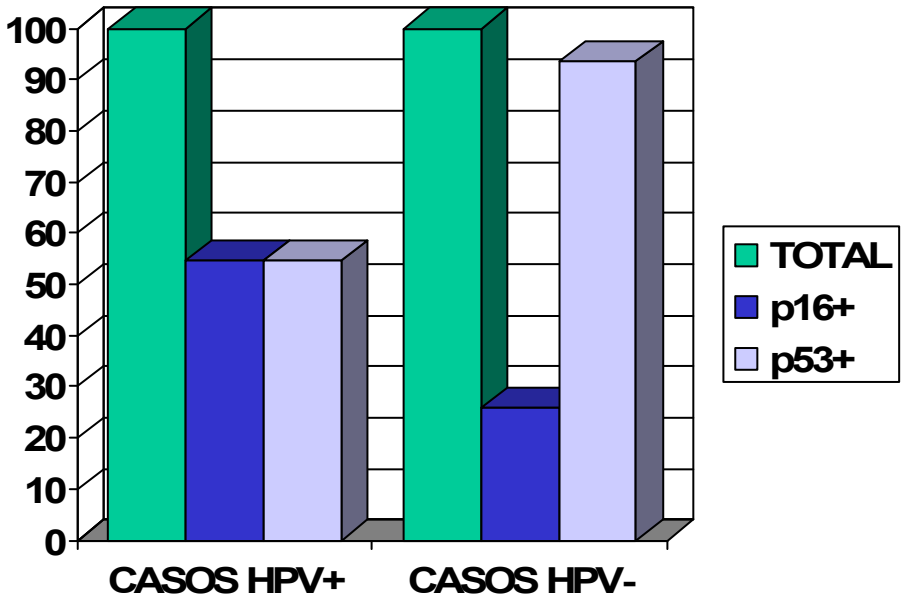

Fig. 50: Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en carcinomas de vulva

4.2. PACIENTES

4.2.1. Número de pacientes seleccionados

Una vez analizados los datos de filiación de las 65 muestras seleccionadas de carcinoma de pene para el estudio, pudimos comprobar que se correspondían a 49 pacientes. Un paciente aportaba 5 muestras, diez pacientes presentaban 2 muestras tomadas en distintos momentos evolutivos, y dos pacientes aportaban 2 muestras cada uno al estudio. De las 42 muestras seleccionadas de carcinoma de vulva, 4 correspondían a una misma paciente y otras 2 pacientes aportaban 2 muestras cada una. Por lo tanto, el número de pacientes con carcinoma de vulva incluídas en el presente trabajo es de 37 y el número de pacientes con carcinoma de pene es de 49.

4.2.2. Edad de los pacientes

En el caso de los pacientes con carcinomas de pene la media de edad era de 71,57 años y en el caso de las pacientes con carcinomas de vulva la edad media era de 72,67 años. En el total de pacientes estudiados en el estudio el 83% era mayor de 60 años.

Una particularidad a resaltar en nuestra serie es que no hemos encontrado los dos picos de máxima incidencia que se describen para el carcinoma de vulva en algunos artículos. Según los autores que describen estas dos edades de promedio de mayor incidencia de carcinoma de vulva, estos datos se podrían explicar por la presencia o no de papilomavirus y su posible factor etiopatogénico en el carcinoma de vulva, siendo el papilomavirus responsable etiopatogénico en el grupo poblacional de menor edad. Por el contrario, los resultados que aportan otros autores concuerdan con nuestros datos en la edad promedio en la aparición de las lesiones y en la ausencia de dos picos de mayor incidencia.

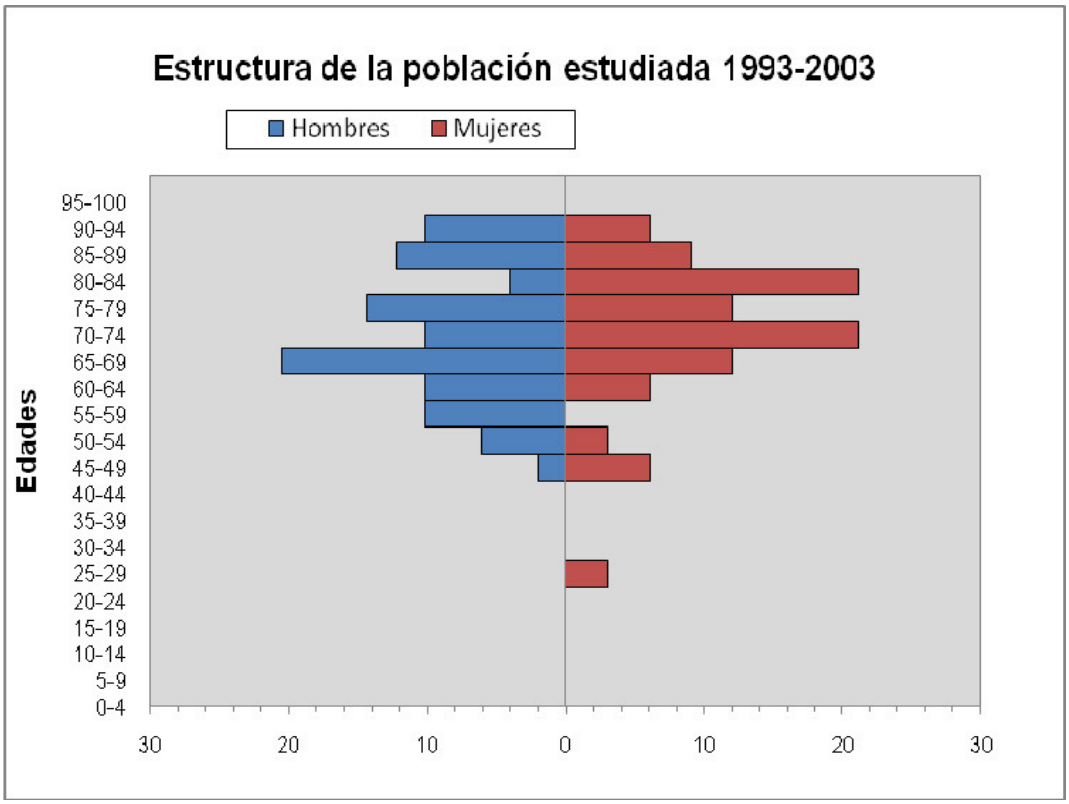

Fig. 51: Distribución de la población estudiada por edades y sexo

4.2.3. Estudio histológico

4.2.3.1. Tipos histológicos de carcinomas de pene por pacientes

La distribución y clasificación histológica de los casos por pacientes mostraba, como dato más significativo (Tabla 15 y Figura 52) la no aparición del subtipo de carcinoma *in situ*, algo esperable ya que eran casos de lesiones de bajo grado, previos a la aparición de lesiones malignas en los pacientes.

Tabla 15: Tipos histológicos de carcinoma de pene encontrados en el estudio por pacientes

SUBTIPO HISTOLÓGIGO	NÚMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE PREVALENCIA
C. EPIDERMOIDE C.	24/49	49%
C. BASALOIDE	1/49	2%
C. SARCOMATOIDE	1/49	2%
C. CONDILOMATOSO	18/49	37%
C. PAPILAR	4/49	8%
C. VERRUCOSO	1/49	2%

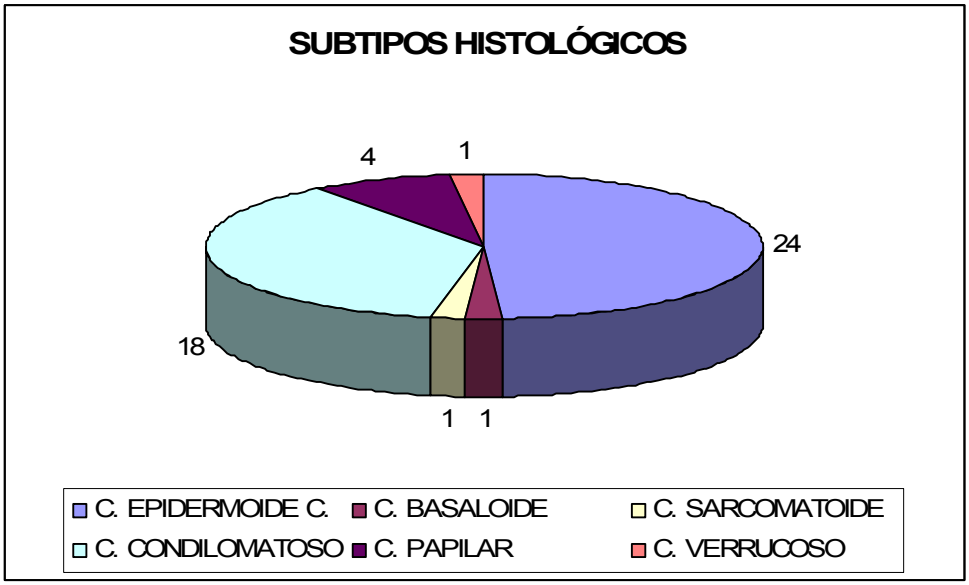

Fig. 52: Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de pene por pacientes

4.2.3.2. Tipos histológicos de carcinomas de vulva por pacientes

El análisis de los casos de carcinoma de vulva por pacientes muestra una distribución según tipos histológicos similar a la distribución por muestras. En este caso sí encontramos el subtipo correspondiente a carcinomas *in situ* que no encontrábamos en la distribución de pacientes masculinos (Tabla 16 y Figura 53).

Tabla 16: Tipos histológicos de carcinomas de vulva encontrados en el estudio por pacientes

SUBTIPO HSITOLÓGICO	NÚMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE PREVALENCIA
C. INFILTRANTES	**26/37**	**70,3%**
C. EPIDERMOIDE	**20/26**	**77%**
C. BASALOIDE	**2/26**	**7,7%**
C. CONDILOMATOSO	**3/26**	**11,5%**
C. BASOCELULAR	**1/26**	**3,8%**
C. *in situ*	**11/37**	**29,7%**

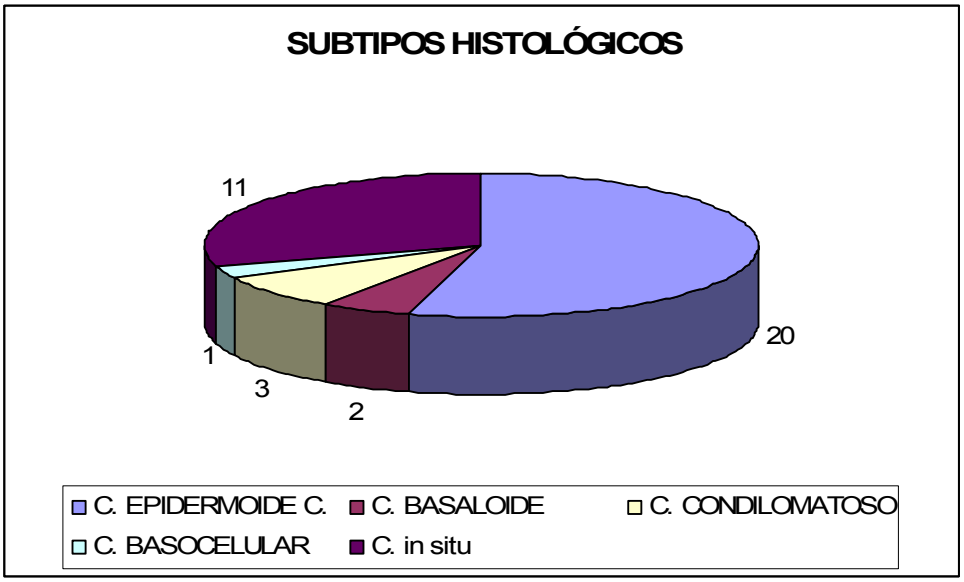

Fig. 53: Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de vulva

Esta distribución de los tipos histológicos de muestras de vulva en carcinomas infiltrantes y lesiones preneoplásicas o *in situ,* se debe a que los trabajos anteriores realizados sobre este tipo de casos se han centrado casi exclusivamente en uno u otro tipo de lesiones. Por lo tanto, para poder realizar un análisis comparativo de los datos elegimos esta presentación de los datos, que será a través de la cual se analicen los datos por pacientes

4.2.4. Resultados de los estudios de PCR

4.2.4.1. Detección de HPV en casos de carcinoma de pene

El número total de pacientes en los que se detectó la presencia de HPV fue de 38, siendo mayor el número de pacientes en los que se llevó a cabo la detección con My09/11 (30) que los detectados con Gp5+/6+ (20), como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17: Porcentaje de positividades con la técnica de PCR en pacientes con carcinoma de pene

CON UNO O AMBOS PRIMERS	38/49 (77,55%)
CON My09/11	30/49 (61,20%)
CON Gp05+/6+	20/49 (40,80%)

4.2.4.2 Detección de HPV en casos de carcinoma de vulva

En la Tabla 18 se muestran los resultados de detección de HPV en los carcinomas de vulva, observándose en este caso un número total de pacientes HPV+ de 11, con ambos sets de p*rimers* detectando siete casos cada uno.

Tabla 18: Porcentaje de positividades con la técnica de PCR en pacientes con carcinoma de vulva

CON UNO O AMBOS PRIMERS	11/37 (29,8%)
CON My09/11	7/37 (19%)
CON Gp05+/6+	7/37 (19%)

4.2.4.3 Genotipos encontrados

En el caso de la distribución de los genotipos encontrados en los 38 casos positivos de carcinomas de pene observamos cómo, respecto al estudio por muestras, sólo se encuentran dos genotipos presentes en las infecciones (Tabla 19 y Figura 54).

Tabla 19: Genotipos detectados en pacientes de carcinoma de pene y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos

	CASOS	**PORCENTAJE**
HPV+	**38/49**	**77,5%**
HPV 16	**32/38**	**84,20%**
HPV 18	**4/38**	**10,50%**
NO CONCLUYENTES	**2/38**	**5,30%**

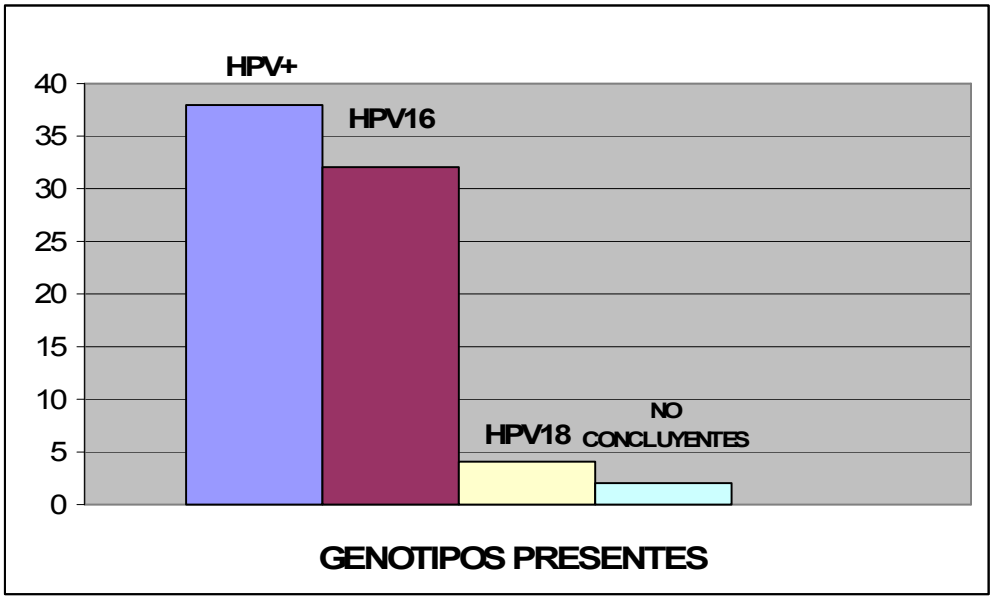

Fig. 54: Genotipos en los 38 pacientes positivos de carcinoma de pene

El estudio de los genotipos de las pacientes de carcinoma de vulva muestra los mismos datos encontrados que en el caso del estudio de muestras, ya que la reducción del tamaño muestral no alteró el número de casos positivos para la presencia de HPV. La variación es, por tanto, en el porcentaje que representan estos genotipos al referirlos en esta ocasión al número de pacientes (Tabla 20 y Figura 55).

Tabla 20: Genotipos detectados en pacientes con carcinomas de vulva y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos

	CASOS	PORCENTAJE
HPV+	**11/37**	**29,7%**
HPV 16	**2/11**	**18,2%**
HPV 18	**5/11**	**45,5%**
HPV 33	**3/11**	**27,3%**
HPV 35	**1/11**	**9%**

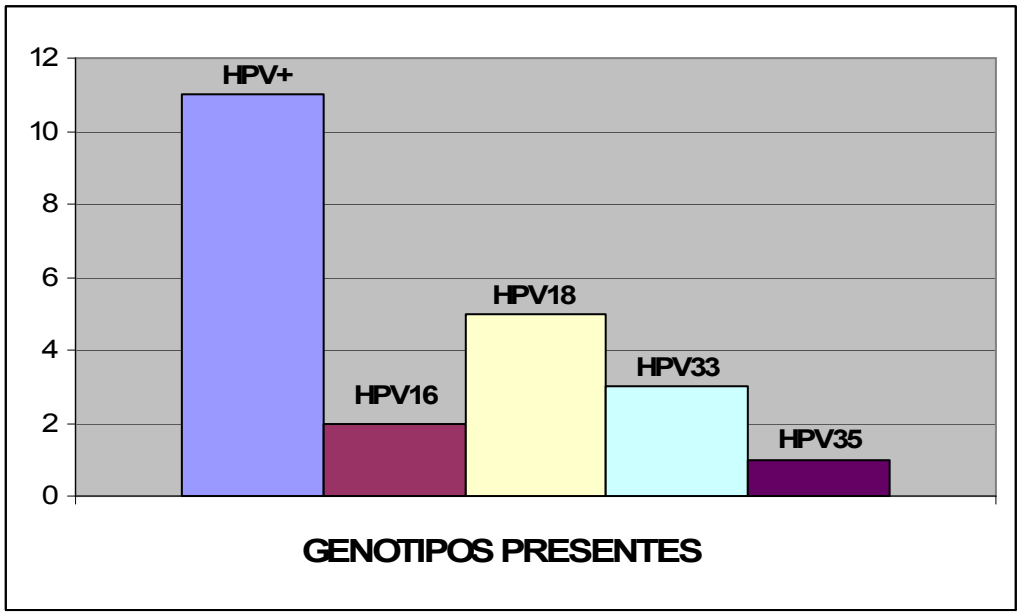

Fig. 55: Genotipos en las 11 pacientes positivas de carcinoma de vulva.

4.2.5. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos

4.2.5.1. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de pene

De los 38 pacientes con infección por HPV, 25 fueron positivos a p16, mientras que de los 11 pacientes negativos para HPV, sólo 5 mostraron marcaje positivo de p16. En el caso del marcaje de proteína p53, 33 de los 38 pacientes positivos para HPV fueron también positivos para esta proteína; 9 de los pacientes negativos para HPV mostraron marcaje positivo (Tabla 21 y Figura 56).

Tabla 21: Número de pacientes con muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentaje de expresión sobre el total de carcinomas de pene

	CASOS HPV+	CASOS HPV-
	38 (77,5%)	11 (22,5%)
p16+	25 (65,8%)	5 (45,45%)
p53+	33 (86,8%)	9 (81,8%)

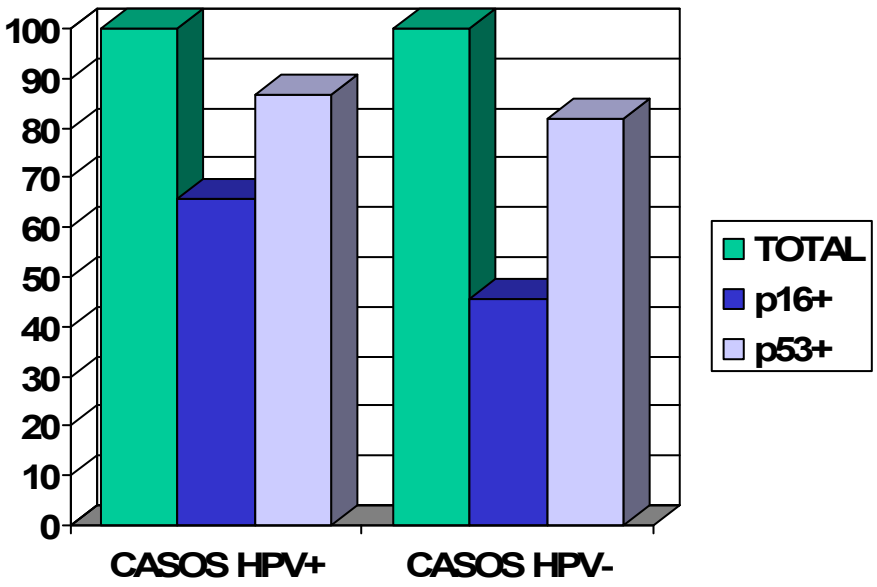

Fig. 56: Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en pacientes con carcinoma de pene

4.2.5.2. Correlación de la detección de HPV con la expresión de p53 y p16 en carcinomas de vulva

El número de pacientes HPV+ con marcaje positivo para p16 fue de 5, mientras que en pacientes HPV- este número fue mayor, 7 de las pacientes lo presentaban. En el caso del marcaje de p53, en pacientes HPV+ encontramos seis positivas, mientras en pacientes HPV- encontramos quince cuyas muestras resultaron positivas al marcaje (Tabla 22 y Figura 57).

Tabla 22: Número de pacientes con muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentaje de expresión sobre el total de carcinomas de vulva

	CASOS HPV+	CASOS HPV-
	11 (29,8%)	26 (70,2%)
p16+	5 (45,45%)	7 (27%)
p53+	6 (54,5%)	15 (57,7%)

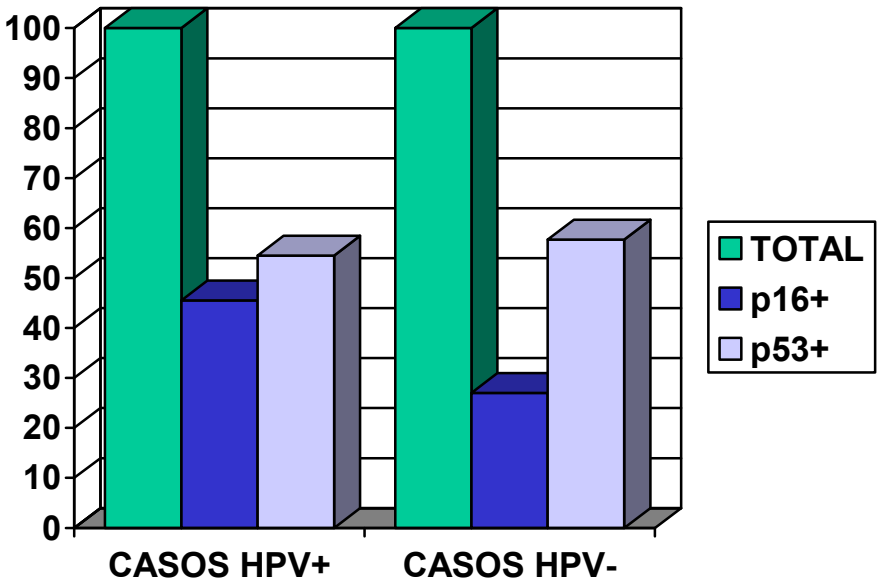

Fig. 57: Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en pacientes con carcinoma de vulva

5. DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DE LA TASA GLOBAL DE INCIDENCIA DE HPV EN CARCINOMAS DE REGIÓN GENITAL EXTERNA

5.1.1. Tasa de incidencia de HPV en carcinomas de pene

La incidencia de infección por HPV para carcinomas de pene que se ha comunicado en la literatura para es muy variable, con tasas que oscilan entre el 13,5 y el 71% en series amplias de casos. La variabilidad de resultados podría ser explicada por distintos factores, entre los que destacaríamos, por un lado, la variabilidad de las poblaciones que se analizan, y por otro, la técnica utilizada para la detección del virus. Con el fin de poder analizar estos factores, realizamos un análisis comparativo de las series que aparecen en la literatura con mayor número de casos, y que han utilizado la técnica de PCR para la detección del virus. Los datos del análisis bibliográfico los resumimos en la Tabla 23, que muestra cómo los resultados obtenidos son proporcionalmente elevados, en lo que respecta al porcentaje de positividad para HPV.

Tabla 23: Tabla de incidencia de HPV en carcinoma de pene según análisis bibliográfico. En la columna de autores se reseña sólo el primer autor

Autores	Año	Casos	Población	Metodología	Primers	HPV+
Villa L	1986	18	Sao Paulo	Muestras congeladas PCR Radiactiva	Gp5+/6+	44,4%
Picconi MA	2000	38	Argentina	Formol/Parafina PCR Radiactiva	Gp5+/6+	71%
Chan KW	1994	41	Hong Kong	Formol/Parafina	Sólo para HPV 16/18	14,6%
Rubin MA	2001	142	USA y Paraguay	Formol/Parafina	SPF10	42,2%
Lont AP	2006	171	Holanda	Formol/Parafina	Gp5+/6+	29%
Bezerra ALR	2001	82	Brasil	Formol/Parafina	Gp5+/6+	30,5%
Heideman DAM	2007	83	Holanda	Formol/Parafina	Gp5+/6+	55%

5.1.2. Análisis de causas para la alta incidencia detectada en nuestro trabajo

La tasa de detección de HPV que hemos alcanzado en nuestro trabajo, comparada con la de los estudios expuestos, puede ser considerada elevada, aproximándose a la serie que muestra una incidencia más alta de HPV y que alcanzaba el 71% (Picconi et al, 2000). Esta alta incidencia puede tener varias explicaciones: por un lado una influencia de tipo genético; por otro lado podría estar influenciada por los hábitos socio-sanitarios de la población de estudio; y por último, podría influir la técnica utilizada para detectar el papilomavirus.

Por lo que respecta a la influencia de un factor genético según las poblaciones de estudio, se puede ver que diferentes estudios realizados en poblaciones de origen similar muestran tasas de infección por HPV distintas. Esto se ve tanto en trabajos realizados en poblaciones de Holanda, donde 2 artículos distintos muestran una incidencia del 29 y 55% (Lont et al, 2006; Heideman et al, 2007), como en la población de Brasil, con oscilaciones entre el 71% y el 13,5% (Picconi et al, 2000). Además, más adelante cuando analicemos la prevalencia de HPV en carcinoma de vulva veremos, que ésta es igual o menor que en el resto de poblaciones estudiadas. Si existiera un determinante de tipo genético cabría esperar, en principio, que se manifestara en ambos sexos, puesto que las alteraciones descritas como posibles causantes de mayor susceptibilidad a la infección por HPV son ligadas a los genes de p53 o p16 (Jee et al, 2004) que no se encuentran en el cromosoma Y.

Los datos de variabilidad en la detección de HPV en distintos estudios de una misma población, parecerían también excluir la influencia de los hábitos de comportamiento sexual en las poblaciones de origen para explicar la variabilidad de la presencia de HPV en carcinomas de pene. Sin embargo, existe un dato en la serie que presentamos que determina la alta incidencia de detección de ADN de HPV en las muestras de nuestro estudio. Este factor está en relación con la alta prevalencia de carcinomas de tipo condilomatoso en la población estudiada. Como explicaremos en el apartado de la discusión sobre los tipos histológicos, este tipo de carcinoma muestra marcados signos de cambios coilocíticos y se asocia muy frecuentemente con infección por HPV (Ouban et al, 2003), lo que podría explicar la mayor incidencia de HPV encontrada en nuestro trabajo.

Sin embargo, con los datos que presentamos, el factor que mayor influencia parece tener en la detección de HPV en carcinomas de pene, está en relación con la técnica utilizada para la detección del virus. Así, vemos que los trabajos destinados a la detección de tipos virales específicos (genotipos 16 y 18) muestran una incidencia baja de 14,6% (Chan et al, 1994).

Por lo tanto, creemos que el principal condicionante que puede explicar las diferencias de sensibilidad en la detección del virus es la metodología utilizada para ello. Los protocolos técnicos diseñados para nuestro estudio tenían como objetivo poder detectar la presencia de HPV con una alta sensibilidad, manteniendo la especificidad. De esta forma pretendemos acercarnos a la tasa real de casos positivos para HPV. Para ello, la metodología diseñada garantizaba, en primer lugar, que sólo se utilizaran casos en los que hubiera cantidad suficiente de ADN en cada muestra, para garantizar que los resultados obtenidos de la técnica de PCR fueran fiables. Con este fin, sólo consideramos válidas las muestras donde la extracción de ADN nos permitiera la obtención de suficiente cantidad de, de al menos 15 nanogramos/microlitro de extracto medidos mediante espectrofotometría (Nanodrop), para usar una cantidad fija de 200 nanogramos de ADN en cada reacción. Además de presentar una suficiente cantidad de ADN, otro requisito que debían cumplir las muestras para ser incluidas en el estudio, era que este ADN obtenido debía estar en un buen estado de conservación. La calidad del ADN la determinamos realizando una amplificación específica de un gen constitutivo en humanos (β- globina), tal como explicamos en el apartado Material y Métodos. Todas las muestras que no cumplieron estos requisitos fueron excluidas del estudio.

Además de los dos factores analizados previamente, y dentro de los factores técnicos que influyen en la sensibilidad de la técnica, pensamos que la selección de los *primers* es el factor aislado que más influencia la sensibilidad de la técnica.

5.1.3. Tasa de incidencia de HPV en carcinomas de vulva

Existen algunos trabajos que han analizado la presencia de HPV en carcinomas de vulva. Aunque emplean diferente metodología a la utilizada en esta tesis, pueden servirnos para un análisis comparativo de los resultados. Estos trabajos se resumen en la Tabla 24.

Un dato reseñable de los estudios incluidos en esta revisión bibliográfica es que la mayoría de ellos hacen especial referencia a las lesiones *in situ* de tipo VIN III. En puntos posteriores de esta discusión analizaremos de forma más específica esta relación, aquí nos fijaremos en la cifra global de casos.

El primer hecho que llama la atención al comparar nuestros resultados con los de la bibliografía consultada al respecto, es la baja incidencia de HPV obtenida en nuestro trabajo, con respecto a la mayoría de los trabajos anteriores. El dato a tener en cuenta para esta comparación sería la incidencia de la infección obtenida al tomar como referencia el número de pacidentes estudiados, ya que éste es el criterio usado en la mayoría de los casos, valor que en nuestro caso representa un 29,8% de presencia del virus, sobre el total de 37 pacientes o casos.

Este resultado de menor incidencia obtenida, podría ser achacado al tamaño muestral de la serie, que podría no ser representativo. Sin embrago, esto se puede descartar, ya que, exceptuando tres de los trabajos reseñados (Skapa et al, 2007; Madsen et al, 2008; Sutton et al, 2008), en los demás artículos citados se trabajó sobre un número de muestras menor o igual al nuestro.

Como se comentó en el apartado anterior de la presente discusión, las muestras procesadas para el estudio de los carcinomas de vulva correspondían a una población femenina, con un rango de edad mayoritario cercano a los 65 años. Esto contradice algunos de los estudios anteriores, que muestran cómo las infecciones de HPV detectadas en carcinomas de vulva se presentan en dos picos o rangos de edad, uno en población femenina joven en edad reproductiva, y otro que comprende a pacientes con edad a partir de los 60 años que correspondería a la mayoría de los casos encontrados en nuestro estudio.

La no aparición de este pico de incidencia a la edad más temprana, puede ser debida al tipo de población atendida en el área asistencial que es objeto de estudio. El territorio de Castilla-La Mancha asistido por el Complejo Hospitalario de Albacete, del cual se obtuvieron las muestras estudiadas, comprende un espectro de población

mayoritariamente por encima de los 60 años, con lo que estadísticamente las posibilidades de que las pacientes entraran en el rango de edad correspondiente al segundo pico de incidencia son muy elevadas.

Por otra parte, esta tendencia estadística de dos picos de incidencia máxima, se puede atribuir también a la implantación de los sistemas de revisiones ginecológicas regulares desde hace unos años en los sistemas de sanidad, precisamente motivada por la necesidad de la detección precoz de patologías carcinomatosas *in situ* o preneoplásicas antes de su malignización. Este sistema de cribado sanitario podría haber creado un sesgo en las poblaciones a estudiar, teniendo por un lado todas aquellas pacientes que por edad han entrado en el sistema de detección precoz a una edad avanzada y, por ello, tienen mayores probabilidades de que la patología genital se haya iniciado y desarrollado con anterioridad; en otro rango de edad estarían las pacientes más jóvenes de los estudios, que corresponderían a todas aquéllas a quienes los protocolos ginecológicos de detección precoz del cáncer genital han podido detectar dichas lesiones en estadios primarios no malignos, en la mayoría de los casos.

En concreto, y según lo expuesto anteriormente, en nuestra población de estudio, al estar compuesta por pacientes con edades incluidas en el segundo pico teórico de incidencia, sería de esperar un diagnóstico mayoritario de los subtipos malignos de carcinomas de vulva, por la ausencia de los controles de cribado en su momento correspondiente. Efectivamente, el porcentaje de estos subtipos en nuestro estudio es del 71,40% sobre el total de casos estudiados, siendo solamente del 28,60% el porcentaje de casos correspondientes a lesiones preneoplásicas o *in situ*.

Esta distribución de la patología en dos rangos de edad más o menos determinados se apoya también por la identificación de dos vías independientes implicadas en la carcinogénesis vulvar (van der Avoort et al, 2006). Una primera vía sería la asociada a la presencia de HPV, que tiende a ocurrir en mujeres jóvenes con historial clínico de verrugas genitales, displasia cervical y/o inmunosupresión. Estos carcinomas suelen pertenecer a los subtipos basaloide o condilomatoso y se desarrollan a partir de lesiones *in situ* de tipo VIN III. Una segunda vía, de aparición de carcinomas vulvares no asociada a HPV es la encontrada en mujeres de edad avanzada. Histológicamente corresponden a carcinomas epidermoides de tipo común y su aparición se asocia a procesos inflamatorios crónicos o lesiones del tipo del *lichen sclerosus.* Aunque este punto se desarrollará más ampliamente en el apartado correspondiente a la relación entre subtipos histológicos y HPV, la elevada edad media

de la población estudiada y el tipo de lesiones encontradas, se relacionan directamente con la disminución de la aparición de ADN viral en nuestras muestras, respecto a la literatura previa presentada.

Tabla 24: Tabla de incidencia de HPV en carcinoma de vulva según análisis bibliográfico. En la columna de autores se reseña sólo el primer autor

Autores	Año	Casos	Población	Metodología	Primers	HPV+
Toki T	1991	30	USA	Formol/Parafina PCR H.*i.s.*	Específicos para E6	13 (43,3%)
Park JS	1991	30	USA	Formol/Parafina PCR H.*i.s.*	Específicos para E6	21 (61%)
HØrdind U	1994	78 carcinomas	Dinamarca	Formol/Parafina	Específicos para E6	24 (30,8%)
HØrdind U	1996	76 carcinomas 67 VIN III	Dinamarca	Formol/Parafina	Específicos para E6	90% en VIN III 42% en carcinomas
Van Beurden M	1998	27 (VIN)	Holanda	Formol/Parafina	Gp5+/6+	100% en VIN III
Srodon M	2006	34 VIN III	USA	Formol/Parafina PCR	PGMY 09/11	43 (100%)
Skapa P	2007	172	República Checa	Formol/Parafina RLB	Gp5+/6+	98.8% en VIN 42.0% en carcinomas
Osakabe M	2007	21	Japón	PCR-RFLP	Gp5+/6+	5 (24%)
Madsen BS	2008	116	Holanda	Formol/Parafina	Gp5+/6+	50%
Sutton BC	2008	116	Holanda	Formol/Parafina	Gp5+/6+	70%
de Koning MN	2008	39	Holanda	Formol/Parafina	Gp5+/6+	38 (97%)

5.1.4. Análisis comparativo de la presencia de HPV en carcinomas de región genital externa masculina y femenina

La diferencia en la detección de HPV que encontramos en nuestro estudio entre los carcinomas de región genital externa masculina y femenina, es relevante en cuanto a la diferencia del número de casos HPV positivos entre un sexo y el otro. La proporción de casos HPV+ en los carcinomas de región genital externa masculina alcanzó una tasa del 77,55%, mientras que en carcinomas de región genital externa femenina fue del 29,8%.

Nuestro trabajo es el primero que se realiza en el que se analiza la presencia de HPV en carcinomas de región genital externa de ambos sexos, en una misma población mediante una metodología de detección de HPV idéntica, por lo que no

podemos extrapolar los resultados obtenidos con los de otros. El hecho de que exista esta marcada diferencia en la detección de HPV puede indicar, en primer lugar, que los mecanismos etiopatogénicos que inciden en la aparición de los carcinomas de pene y de vulva son distintos. Como se ha hecho notar anteriormente, existen otros condicionantes etiopatogénicos que se ha demostrado que influencian la aparición de estos carcinomas. Entre éstos, se pueden destacar factores locales y generales o sistémicos. Al hablar de factores locales, podemos referirnos a lesiones que producen alteraciones crónicas, que puedan incrementar el riesgo de aparición de carcinomas. Entre éstos, se encuentran el liquen escleroatrófico o el liquen simple crónico.

En cuanto a factores sistémicos, se ha comprobado que las alteraciones de la inmunidad, especialmente la inmunodeficiencia, incrementan la tasa de carcinoma genital (Poblet et al, 1996). Otros factores generales que también se han descrito como influyentes para esta patología serían el tabaco o el nivel socioeconómico (Castellsagué et al, 2002). Otro factor que pensamos que podría influir en la mayor presencia de HPV en carcinomas de región genital externa masculina frente a la femenina, es el que se refiere a la detección de las lesiones precursoras. Algunos carcinomas de de región genital vienen precedidos por lesiones preneoplásicas de tipo VIN o PIN. Precisamente, estos carcinomas que provienen de la evolución de lesiones displásicas son los que se han relacionado más con la infección por HPV, y existe al menos un factor que influye en esta prevención sanitaria de lesiones preneoplásicas, fundamentalmente en la población femenina. Serían las campañas de prevención de carcinoma de cérvix, que si bien no incluyen la prevención de lesiones vulvares entre sus objetivos directos, pueden influir positivamente en su prevención, porque cualquier alteración observada en las pacientes será documentada durante dichas revisiones ginecológicas.

5.2 ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE LOS DOS SETS DE PRIMERS UTILIZADOS

Al analizar la sensibilidad de los dos sets de *primers* que hemos utilizado en nuestro trabajo, nos encontramos con que en el total de casos estudiados la proporción de casos positivos con los sets de *primers* My09/11 y Gp5+/6+ es diferente. Cuando se analizan los casos de carcinoma con el set de *primers* My09/11 se observa una sensibilidad del 83,3%, frente a un 53,3% de sensibilidad del set de *primers* Gp5+/6+.

5.2.1. Teoría para explicar la mayor sensibilidad de los *primers* My09/11

Existe una teoría, generalmente aceptada, de que en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, que se analizan mediante técnicas de amplificación por PCR, el porcentaje de casos positivos obtenidos es mayor cuanto menor es el tamaño del fragmento de ADN a amplificar (Qu et al, 1997). Esto se explica porque el proceso de fijación en formol e inclusión en parafina produce una fragmentación del ADN y, en consecuencia, una pérdida de la eficiencia de amplificación; es decir, cuanto mayor sea el fragmento a amplificar, mayor probabilidad de que se encuentre incluido en él alguno de los posibles puntos de ruptura del ADN por la mala conservación en los fijadores.

Sin embargo, en nuestro estudio observamos que no se cumple esta teoría, puesto que obtuvimos un porcentaje mayor de positividades con los *primers* My09/11, que generan un producto de amplificación de 450 pares de bases, que con los *primers* Gp5+/6+ que generan un producto de amplificación menor, de tan sólo 150 pares de bases. La posible explicación de este hallazgo la podemos encontrar en que el set de *primers* Gp5+/6+ amplifica adecuadamente niveles bajos de ADN del virus cuando hay un número limitado de bases no concordantes entre el ADN de HPV en la muestra sometida a estudio y el *primer* utilizado. Sin embargo, cuando el número de bases que no son concordantes es de 4 ó más, se ha visto que la sensibilidad de la amplificación disminuye cuatro veces o más (de Roda Husman et al, 1995).

Como hemos descrito, en los cánceres y lesiones de alto grado donde el papilomavirus desempeña un papel patogénico, existe generalmente una integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedadora. Cuando esta integración tiene lugar, se producen numerosos fenómenos de delección y/o mutación en el ADN (Van

den Brule et al, 1990; de Roda Husman et al, 1995). Si estos fenómenos de delección y/o mutación se producen en las regiones de solapamiento del ADN viral con los iniciadores de la reacción de amplificación, se observa una marcada disminución de la sensibilidad de detección de papilomavirus al utilizar los *primers* Gp5+/6+ (Karlsen et al, 1996; Qu et al, 1997). Estos resultados no se han comunicado cuando se utiliza el set de primers My09/11, posiblemente debido a que éstos son *primers* de consenso degenerados, que se diseñaron para la detección de múltiples variantes del papilomavirus. En el diseño de estos *primers* degenerados se sustituye aleatoriamente una o más de las bases que componen el *primer* por otras bases. De esta forma, los *primers* de consenso degenerados incluyen en cada cadena de 8 a 16 posibles variantes (Tabla 25), y por lo tanto, pueden detectar un amplio rango de tipos de ADN viral (Manos et al, 1990).

Tabla 25: Primers específicos para HPV que se han utilizado y secuencias

PRIMER	**SECUENCIA**
My09	5´-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3´(*)
My11	5´-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3´ (*)
Gp05+	5´-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3´
Gp06+	5´-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3´

(*) Las variaciones en la secuencia de los primeres My09/11 son: M=A, C; R=A,G; W=A,T

5.2.2. Demostración de la conveniencia de asociar diferentes sets de *primers*

En el presente trabajo hemos encontrado que la asociación de al menos dos juegos de *primers* incide notablemente en el incremento de la detección de HPV. Como se ha comentado anteriormente, los trabajos que se han realizado en carcinomas de pene utilizan sólo un par de *primers* de consenso (Villa et al, 1986; Sarkar et al, 1992; Chan et al, 1994; Bezerra et al, 2001; Picconi et al, 2000; Rubin et al, 2001). Sin embargo, los trabajos realizados con diferentes sets de *primers* en cérvix, especialmente los que han utilizado los *primers* más frecuentemente usados, My09/11 y Gp5+/6+, han demostrado una marcada discrepancia entre el número de casos amplificados con cada set de *primers*. Esto sugiere que cada uno de estos set de *primers* tiene un potencial diferente para amplificar ADN viral. Por esta razón, la

prevalencia de la presencia de ADN viral en muestras clínicas puede ser subestimada si sólo se utiliza un set de *primers* (Qu et al, 1997), hecho demostrado previamente en investigaciones realizadas en carcinomas de cérvix mediante PCR.

Si tenemos en cuenta que el número total de muestras examinadas es de 107, el uso del set de *primers* My09/11 nos indicaría que 50 de éstas son positivas para HPV, un 46,7% del total; el uso de Gp5+/6+ nos mostraría la positividad de 32 muestras, un 30% del número total de muestras. Sin embargo, la aplicación del protocolo de uso conjunto de los dos sets de *primers* de consenso nos permite ampliar el número total de muestras positivas hasta 60 (valor que hemos considerado nuestro *gold estándar* para los análisis de sensibilidad), lo cual representa un 56% de positividad global de las muestras estudiadas.

De esto se desprende que el uso de más de un juego de *primers* de consenso, dos en este caso, aumenta considerablemente la sensibilidad de la detección de HPV en carcinomas de región externa.

5.3. TIPOS HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE HPV

En los numerosos estudios sobre la incidencia de la presencia de HPV en carcinomas de región genital externa, se ha establecido una posible relación entre los diferentes subtipos histológicos descritos, y su evolución con la presencia / ausencia del virus en los mismos.

En el caso del pene, un análisis de los datos existentes en la bibliografía previa, nos presenta unos datos medios aproximados de la aparición de cada subtipo histológico (Tabla 26): el subtipo mayoritario, con un 59% de casos globales, sería el carcinoma epidermoide común; la segunda proporción mayor correspondería a los carcinomas verruciformes, dentro de los cuales el subtipo papilar sería el más representado; con un 15% de los casos, seguido del tipo condilomatoso o *warty,* con un 10%, y por último, el subtipo verrucoso, con apenas un 3% de los casos. Como ya se comentó anteriormente la aparición de los subtipos basaloide y sarcomatoide es minoritaria frente al resto, siendo de un 10% y un 3%, respectivamente (Cubilla et al, 2001). Respecto a la relación de cada subtipo con la infección por HPV, es destacable la prácticamente nula aparición de casos de carcinoma verrucoso asociados a infección por HPV, mientras que los carcinomas de tipo condilomatoso presenta una relación con HPV mucho mayor que el resto.

Con estos datos preestablecidos, la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo arroja un dato significativo, y es la aparición de un porcentaje de carcinomas de tipo condilomatoso, que prácticamente cuadruplica los datos de la literatura previa, un 37% obtenido por nuestro grupo, frente al 10% esperado según los resultados de trabajos anteriores.

Este alto porcentaje de aparición del subtipo condilomatoso explicaría en gran medida el alto porcentaje de incidencia de HPV en carcinoma de pene obtenido en el estudio, ya que, como se ha comentado anteriormente, es el subtipo que más frecuentemente se asocia a la infección por HPV. En nuestro estudio, la incidencia detectada es del 75,4% sobre el total de casos, porcentaje muy alto, en comparación pero achacable en parte a esta aparición mayoritaria del subtipo histológico de carcinoma condilomatoso.

Tabla 26: Incidencia de subtipos histológicos de carcinoma de pene en la literatura previa y en el presente trabajo, y su relación con la infección por HPV

	% (Literatura previa)	% (Trabajo presente)	HPV
C. EPIDERMOIDE C.	**59%**	**49% (24/49)**	**+**
C. BASALOIDE	**10%**	**2% (1/49)**	**++**
C. SARCOMATOIDE	**3%**	**2% (1/49)**	**+**
C. CONDILOMATOSO	**10%**	**37% (18/49)**	**++**
C. PAPILAR	**15%**	**8% (4/49)**	**+**
C. VERRUCOSO	**3%**	**2% (1/49)**	**-**

En el caso de los carcinomas vulvares, la literatura al respecto es menos extensa, ya que los trabajos realizados en aparato genital femenina estaban centrados hasta hace unos años principalmente en el cáncer cervical por su alta incidencia mundial entre la población femenina.

Desde el punto de vista histológico, y como ya hemos comentado someramente en apartados anteriores, muchos de los trabajos previos se centran en lesiones preneoplásicas o malignas de bajo grado, es decir, lesiones tipo VIN (Srodon et al, 2006; Skapa et al, 2007), aunque recientemente ya se dispone de más información global sobre la incidencia de las lesiones carcinomatosas de alto grado en vulva, y su relación con la presencia de HPV. En estos trabajos se han identificado dos vías independientes de carcinogénesis vulvar (van der Avoort et al, 2006), una relacionada con la infección por HPV, y otra segunda vía relacionada con procesos inflamatorios crónicos o autoinmunes.

En cualquier caso, los subtipos predominantes son los correspondientes a lesiones *in situ,* posibles precursoras de lesiones de alto grado, y a carcinomas de tipo epidermoide común, seguidas por la aparición de los tipos basaloide y condilomatoso, que al igual que en el caso del pene, son los que mayor asociación presentan con la presencia de HPV en dichas lesiones (Tabla 27).

Según lo discutido en el apartado correspondiente al análisis de la incidencia global de HPV en los carcinomas de vulva, la población estudiada consistía, en un gran porcentaje en muestras que provenían de pacientes con una edad avanzada.

Este hecho justificaría la alta proporción de carcinomas de tipo epidermoide común encontrada en nuestro estudio. Al encontrarse este tipo de carcinoma asociado en mayor medida a la vía de aparición sin asociación con HPV, los resultados presentados por nuestro estudio demuestran concordancia con los valores teóricos esperados, es decir, un número elevado de pacientes con edades en un rango alto suponen un mayor aporte de casos no encuadrados en los supuestos de asociación con HPV.

Tabla 27: Incidencia de subtipos histológicos de carcinoma de vulva en la literatura previa y en el presente trabajo, y su relación con la infección por HPV

	% (Literatura previa)	% (Trabajo presente)	HPV
C. INFILTRANTES			
C. EPIDERMOIDE	**65%**	**55% (20/37**	**+**
C. BASALOIDE	**28%**	**5,50% (2/37)**	**++**
C. CONDILOMATOSO	**7%**	**8,20% (3/37)**	**++**
C. BASOCELULAR	**<2%**	**2,70% (1/37)**	**-**
C. *in situ* (*)		**29,70% (11/37)**	**++**

(*)No se presenta porcentaje esperado de carcinomas in situ porque, al ser tratados siempre como un subtipo específico, se han estudiado sin formar parte del resto

5.4. GENOTIPOS ENCONTRADOS EN LOS CASOS HPV+

La asociación causal del carcinoma genital con la presencia de HPV (zur Hausen, 1996), ha llevado al análisis exhaustivo de esta relación y a la clasificación de los subtipos virales según su grado de patogenicidad, como ya se ha expuesto previamente, en HPV de alto o de bajo riesgo. Los datos más recientes apuntan a una asociación de más del 90% entre cáncer cervical y HPV de alto riesgo. Éstos HPV de alto riesgo corresponden a los genotipos 16, 18 y 33 entre otros (Sutton et al, 2008).

Esta asociación, en mayor o menor medida, sería esperable en el resto de patologías carcinomatosas genitales relacionadas con la infección por HPV. En el caso de los carcinomas de pene este porcentaje de aparición de genotipos parece estar sujeto a variabilidad según la región geográfica de realización de cada trabajo. Mientras en los estudios llevados a cabo en Europa y zonas de América del Norte el genotipo más frecuente, con diferencia sobre el resto, es el HPV 16 (Sarkar et al, 1992; Rubin et al, 2001). En los trabajos con muestras de regiones de América del Sur aparece como genotipo predominante el HPV 18 (Villa y Lopez, 1986; Picconi et al, 2001). Como se ha mostrado en los apartados referidos a la presentación de resultados por muestras y por pacientes, los datos obtenidos en el presente trabajo presentan la concordancia esperada según esta distribución geográfica y epidemiológica de los genotipos, encontrándose el HPV 16 en el 85% de los casos positivos estudiados. El siguiente genotipo en frecuencia de aparición es HPV 18, además de dos casos en los que la secuenciación no fue concluyente a la hora de asegurar el genotipo presente en esas muestras.

Los datos correspondientes a lesiones neoplásicas de vulva y a los genotipos presentes en las mismas (Sutton et al, 2008) muestran una prevalencia de los genotipos de alto riesgo 16, 33 y 18 en diferentes proporciones. En el caso del HPV 16 se presenta con una prevalencia de entre un 50% y un 80,2%, mientras el HPV 33 muestra una incidencia aproximada del 15%. Hay que tener en cuenta que estos datos representan porcentajes de aparición de genotipo de HPV en lesiones de tipo carcinoma invasivo, ya que en el caso de tener en cuenta lesiones de bajo grado tipo VIN, los porcentajes varían con la graduación de la lesión. En lesiones tipo VIN I los genotipos asociados son principalmente los HPV 6 y HPV 11 de bajo riesgo. Por el contrario, en lesiones graduadas como de tipo VIN III, supuestas precursoras de lesiones invasivas o malignas, entre un 90% - 100% de los genotipos encontrados corresponden a HPV 16 (Srodon et al, 2006). Este hecho apoyaría la teoría de las lesiones tipo VIN III como precursoras de los carcinomas.

El genotipado de las muestras de vulva en nuestro trabajo nos permitió confirmar la presencia de estos tres genotipos de alto riesgo en las mismas, encontrado que el HPV 18 se encontraba presente el el 45,5% de las muestras positivas para HPV. HPV 33 fue el segundo genotipo en porcentaje de presencia, con un 27,3%; mientras que HPV 16 y 35 aparecieron minoritariamente, con un 18,2% y un 9% de presencia, respectivamente.

5.5. EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE HPV Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES SUPRESORES TUMORALES *P16* y *P53*

Uno de los objetivos propuestos para la elaboración de la presente tesis doctoral es el de evaluar la correlación entre los resultados obtenidos en la clasificación histológica de las muestras, la presencia / ausencia de HPV y sus índices de incidencia, y la expresión de las proteínas celulares p16 y p53. En los anteriores apartados de la discusión hemos desarrollado todos aquellos aspectos relacionados con la histología y la detección viral en el trabajo realizado; en este apartado intentaremos establecer, basándonos en los datos inmunohistoquímicos, la posible relación existente entre todo ello y estas dos proteínas que han sido propuestas como factores diagnósticos para las patologías neoplásicas asociadas a HPV.

Cabe recordar para ello, la interacción demostrada entre estas dos proteínas reguladoras del ciclo celular y varios de los transcritos virales de HPV. La proteína p53 en su condición normal en el ciclo celular tiene función reguladora de los procesos de reparación del ADN, a través de la activación de proteínas que intervienen tanto en la propia reparación como en el paro del ciclo celular hasta que el daño esté reparado, como es el caso de la proteína p21. La interacción de la proteína E6 de los HPV de alto riesgo con p53 se produce a través de su unión a ella y a una ubiquitina ligasa celular (E6AP), lo que lleva a la ubiquitinización y posterior degradación proteasómica de p53. Esto reduce su vida media, y con ello su capacidad de activación de los mecanismos celulares que controla.

Además de esta alteración de la función normal de p53, existe otra posible alteración sin mediación de infección viral, y es la mutación somática de p53, dando lugar a una forma más estable de la proteína, con lo que los niveles alterados de esta proteína también llevan a una desregulación del control del ciclo celular.

Precisamente, el hecho de que con relativa frecuencia exista en algunos tumores esta versión mutada de p53, es el principal obstáculo a la hora de valorar sus resultados como marcador diagnóstico de la infección por HPV. La mayoría de trabajos realizados al respecto basan su metodología en la detección inmunohistoquímica de p53 o en la detección por PCR de mutaciones en el gen, pero no en ambas técnicas.

En el caso de carcinomas de vulva, por ejemplo, los estudios inmunohistoquímicos muestran que la sobreexpresión de p53 es común e independiente de la presencia de HPV (Kagie et al, 1997). Sin embargo, investigaciones en las que sólo se usaron técnicas moleculares para el análisis de p53 sugieren que los tumores sin presencia de HPV tienen tendencia a tener una mayor frecuencia de mutaciones del gen p53 que los tumores donde era detectado HPV (Lee et al, 1994).

Los datos que aporta nuestro trabajo se basan en protocolos inmunohistoquímicos de detección, y por ello muestran concordancia con los resultados anteriores obtenidos con esta técnica. En nuestro estudio, el 54,5% de los casos con presencia de HPV mostraban sobreexpresión de p53, mientras que en los casos sin presencia de HPV, p53 se sobreexpresaba en un 57,7%. Tras el tratamiento estadístico obtuvimos una no asociación entre las variables que suponían la sobreexpresión de la proteína y la presencia o no de virus, es decir, la expresión de p53 es independiente de la infección.

La proteína p16 pertenece a la familia INK4 de inihibidores de las kinasas celulares dependientes de ciclinas, las cuales actúan como mediadores del ciclo celular. La interacción de p16 con CycD y Cdk4 mantiene inactiva la kinasa celular; en el momento que p16 se disocia de este complejo, la kinasa se activa e interviene en la separación del complejos pRb/E2F. La liberación de estos componentes promueve la transcripción de proteínas necesarias para la síntesis de ADN a través de E2F, y por otro lado libera la forma fosforilada de pRb.

Las acciones de la proteína E7 de los HPV de alto riesgo sobre pRb pueden llevar a una variación detectable de los niveles celulares de p16. Esta variación también puede deberse a mutaciones del propio gen o a hipermetilaciones del promotor.

En la carcinogénesis del cérvix se considera que existe una sobreexpresión de p16, que es resultado de la inactivación de pRb por E7, considerándose así, esta

sobreexpresión, como un marcador específico para carcinomas cervicales con infección por HPV de alto riesgo. Algunos trabajos han propuesto también p16 como marcador específico de neoplasias vulvares con presencia de HPV (Santos et al, 2004), pero no existen datos suficientes que apoyen esta teoría. Por el contrario, Osakabe sugiere, tras comprobar la expresión de p16 y de pRb conjuntamente, que la sobreexpresión de p16 en carcinomas epidermoides de vulva es inducida por vías diferentes a las establecidas por la teoría anterior (Osakabe et al, 2007).

Refiriéndonos a los datos concretos ofrecidos por nuestro estudio observamos que la sobreexpresión de p16 en casos relacionados con HPV se da en un 45,45% de los casos. Sin embargo, al ver los resultados en muestras no relacionadas con HPV tenemos que un porcentaje cercano al 30% de las muestras presenta sobreexpresión tras el tratamiento estadístico. Se puede decir, por lo tanto, que en los casos analizados en la presente tesis doctoral no se observa una correlación entre la expresión de p16 y la presencia de HPV. Este hecho podría ser explicado por las diferentes vías de alteración de la ruta de p16 que se detallan posteriormente.

Un dato que podría llamar la atención al analizar los resultados estadísticos de asociación obtenidos es la existencia de relación entre HPV y sobreexpresión de p16 en el análisis de muestras. Esto es lógico dado que había un determinado número de pacientes que aportaban varias muestras al estudio, pero dicha asociación se pierde al considerar el número de pacientes como elemento de estudio.

El estudio de estos marcadores en los casos de carcinoma de pene resulta más discordante con los datos previos. Ferreux, en su trabajo de 2003, expuso por primera vez un estudio del marcaje de $p16^{INK4}$ en carcinomas de pene, encontrando expresión de la proteína en un 65% de los casos positivos para HPV y sólo en un 6% de los casos negativos incluidos en su estudio. En esta misma línea han sido publicados posteriormente varios trabajos que reportan un aumento de expresión de p16 en casos de carcinoma de pene (Kreuter et al, 2008; Prowse et al, 2008), con porcentajes de aparición del marcaje del 50% y del 100% de los casos positivos para HPV. Hay que hacer notar, sin embargo, que en el trabajo de Kreuter las muestras a estudiar eran de un determinado perfil de paciente, hombre con lesiones neoplásicas de pene pero también con infección por HIV (Kreuter et al, 2008).

Analizando los resultados obtenidos en nuestro trabajo, vemos que el marcaje de p16 aparece claramente en 30 de los 49 casos, suponiendo un 61% de los casos. Sin embargo, al analizar estos mismos datos separando las muestras asociadas y no

asociadas a presencia de HPV se observa que los porcentajes de aparición de muestras con marcaje en un grupo y en otro no poseen diferencias estadísticamente significativas, siendo de un 65% en los casos asociados a HPV y de un 46% en los casos no asociados a HPV.

En el anteriormente citado trabajo de Ferreux se proponían tres vías distintas de alteración de la ruta de control celular $p16^{INK4}$ / ciclina D / Retinoblatoma: 1) la interacción con proteínas virales, 2) la hipermetilación del promotor de p16 y 3) las diferencias de expresión del gen *BMI-1* (Ferreux et al, 2003). Esto podría explicar las diferencias de resultados en el estudio de expresión de p16 en diferentes localizaciones anatómicas y su relación con HPV. Aunque en carcinomas de cérvix sí se ha observado esta relación directa entre expresión / infección, en otros tipos de neoplasias no ha sido así, por ejemplo, en carcinomas epidermoides de la cavidad oral se ha descrito la no asociación entre la expresión de p16 y p53 con la infección por HPV (Nemes et al, 2006).

Este hecho nos lleva a pensar en que la infección del virus en diferentes localizaciones se lleva a cabo de manera diferente, pudiendo alterar los niveles de proteínas determinadas, como p16, en determinados tipos de carcinomas (cérvix) y no en otros (vulva, pene o cavidad oral).

En el estudio de la proteína p53 como marcador inmunohistoquímico relacionado con la infección por HPV observamos, al igual que en el caso de los carcinomas de vulva, que no existe correlación estadística significativa entre la presencia del virus y la expresión detectable de la proteína celular. El 86,8% del total de los casos de carcinoma de pene con presencia de HPV presentaron marcaje positivo para p53, mientras que en los casos negativos para la infección, el porcentaje de positivos fue de un 81,8%.

Como ya se ha comentado, la alteración de la expresión de p53 puede deberse en gran medida a mutaciones somáticas del gen, algo no observable mediante técnicas inmunohistoquímicas. Respecto a la comparación de estos resultados con los descritos en la literatura previa, encontramos una gran concordancia, ya que, por ejemplo, en una serie de 35 casos de verrugas genitales y 25 lesiones con papulosis bowenoide Ranki describió la no asociación entre la expresión aberrante de p53 con tipo de HPV específico alguno ni con la presencia del ADN viral (Ranki et al, 1995). Otro trabajo con datos similares a los obtenidos por nuestro grupo son los presentados por Castrén, donde analizaron la presencia de HPV y expresión de p53 en 13

pacientes con verrugas genitales o neoplasias intraepiteliales y en 4 pacientes con carcinoma epidermoide. En dicho trabajo tampoco se encontró relación entre ambos factores, con el añadido de que sí se estudiaron posibles mutaciones de p53 y en ningún caso se encontró mutación génica que respaldara una alteración en la expresión de la proteína (Castrén et al, 1998).

Con todo esto, podemos proponer la no asociación entre HPV y sobreexpresión de p53 en las muestras estudiadas en nuestro trabajo y, por lo tanto, su no utilidad como factor de diagnóstico o predictivo sobre la infección por HPV.

6. CONCLUSIONES

1. El análisis de los tipos histológicos de carcinomas de región genital externa presentes en nuestra población muestra una alta incidencia de carcinomas de tipo condilomatoso. Precisamente este tipo de carcinoma es la patología, de entre las estudiadas, que presenta la mayor tasa de detección de HPV

2. La tasa de detección de HPV en carcinomas de pene fue de 77,55%. Esta tasa es elevada, en comparación a la que se ha comunicado en la literatura, lo que atribuimos a haber utilizado una metodología novedosa, enfocada a potenciar la sensibilidad de la técnica.

3. La tasa de detección de HPV en carcinomas de vulva fue de 29,8%, valor que se encuentra dentro de los rangos de frecuencia comunicados para carcinomas infiltrantes de mujeres mayores en algunas áreas poblacionales, entre las que se encontraría la nuestra.

4. Obtuvimos una mayor sensibilidad global para la detección de HPV mediante técnica de PCR utilizando los *primers* My09/11, que los Gp5+/6+. Este hecho puede ser atribuido a que los *primers* My son *primers* de consenso degenerados que permiten la detección de HPV que hayan sufrido alguna mutación o delección en el proceso de integración.

5. La utilización paralela de *primers* My09/11 y Gp5+/6+ asegura una correcta detección de HPV, evitando los falsos negativos que se obtendrían con la utilización de sólo uno de ellos.

6. El genotipado de las muestras de pene demostró una alta incidencia de papilomavirus de tipo 16 en los carcinomas epidermoides de región genital externa de la población de estudio.

7. Los carcinomas de vulva mostraban una mayor variabilidad en cuanto a los genotipos detectados que los carcinomas de pene. Aún así, la incidencia de genotipos de alto riesgo es mayoritario, aunque con una distribución diferente a la descrita con anterioridad.

8. El gen supresor tumoral *p53* se sobreexpresa en un 85,7% del total de los casos de carcinoma de pene y en un 56,7% de los casos de carcinoma de vulva. Mientras que el gen *p16* se sobreexpresa en el 61% y en el 32% de los casos, respectivamente.

9. La proteína p53 se encuentra sobreexpresada en un 86,8% de los casos de pene con HPV; en los casos de vulva positivos para HPV esta sobreexpresión es un 54,5% de los casos. Ambos valores, al compararlos con los referentes a casos negativos para HPV, resultan no significativos, es decir, no existe relación entre la sobreexpresión de este marcador y la presencia de HPV. Este hecho lo explicamos porque en el proceso de carcinogénesis *in vivo*, existen fenómenos de mutación de p53 que se pueden sobreañadir a la destrucción de p53 por E6 que se ha descrito *in vitro.*

10. La proteína p16 e encuentra sobreexpresada en un 65,8% de los casos de pene con HPV; en los casos de vulva positivos para HPV la proteína se sobreexpresa en un 45,45% de los mismos. La relación estadística de estos datos con los de casos negativos para HPV muestra la no asociación entre el marcador y la presencia de HPV.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alcaraz A, Ribal MJ, Truán D. (2002) Biología molecular del cáncer de pene. Urol Integr Invest; 7: 136-141.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res; 25: 3389-3402

Amin A, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J. (2000) Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. Virology; 272: 137-150.

Ansink AC, Heintz AP. (1993) Epidemilogy and etiology of squemous cell carcinoma of the vulva. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 48: 111-115

Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. (1990) Papillomaviruses and human cancer. Hum Pathol; 21: 686-698.

Armstrong B. et al. (1988) Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet; 1:756-758.

Bartholoma NY. (1989) Genital warts. CMNEEJ; 11: 17-24

Bártek J, Bártkova J, Vojtesek B, Stasková Z, Lukás J, Rejhtar A, Kovarík J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP. (1991) Aberrant expresión of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene; 6: 1699-1703

Begun FP, Grossman HB, Diokno AC, Sogani PC. (1984) Malignant melanoma of the penis and male uretra. J Urol; 132: 123-125.

Bernard HU. (2005) The clinical importante of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol; 32S: S1-S6.

Beyer-Finkler E, Pfister H, Girardi F. (1990) Anti-contamination primers to improve specificity of polymerase chain reaction in human papillomavirus screening. Lancet; 2: 1289-1290.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. (2001) Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. Cancer; 91: 2315-21.

Bloss JD, Liao S-Y, Wilezynski SP. (1991) Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. Hum Pathol; 22: 711-718.

Bosch PC, Forbes KA, Kollin J, Golji H, Miller JB. (1984) Secondary carcinoma of the penis. J Urol; 132: 990- 991.

Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. EMBO; 13(22): 5451-5459

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. (1999) The E7 onocprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. EMBO J; 18: 2449-2458

Buscema J, Naghashashfar Z, Sawada E, Daniel R, Woodruff JD, Shah K. (1988) The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. Obstet Gynecol; 71: 601-606.

Castellsagué X, Bosch X, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV, de San José S, Eluf-Neto J, Ngelangel CA, Chichareon, Smiyh JS, Herrero R and Franceschi S. (2002) Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. N Engl J Med; 346: 1105-1112.

Castellsagué X, de Sanjosé S, Aguado T, Louis KS, Bruni L, Muñoz J, Diaz M, irwin K, Gacic M, Beauvais O, Alero G, Ferrer E, Byrne S, Bosch FX. (2007) HPV and Cervical cancer in the World, 2007 Report. Vaccine; 25: IV-+

Castrén K, Vähäkangas K, Heikkinen E, Ranki A. (1998) Absence of p53 mutations in benign and pre-malignant male genital lesions with over-expressed p53 protein. Int J Cancer; 77: 674-678

Chan KW, Lam KY, Chan AC, Lau P, Srivastava G. (1994) Prevalence of human papilomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR. J Clin Pathol; 47: 823-826

Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. (1995) Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. J Virol; 69: 3074-3083

Cheng G, Stenlund A. (2000) Two patches of amino acids on the E2 ADN binding domine define the surface for interaction with E1. J Virol; 74: 1506-1512.

Cho NH, Kim YT, Kim JW. (2002) Alteration of the cell cycle in cervical tumor associated with Human Papillomavirus-cyclin-dependent kinase inhibitors. J Virol; 43: 722-728

Choo YC. (1982) Invasive squamous carcinoma of the vulva in young patients. Gynecol Oncol; 13: 158-164.

Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnachy S, Weinberg RA. (1992) The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. TIBS; 17: 312-315.

Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. (1999) Human Papillomavirus ADN replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human ADN polymerase alpha/ primase. J Biol Chem; 274: 2696-2705.

Copas P, Dyer M, Comas FV, Hall DJ. (1982) Spindle cell carcinoma of the vulva. Diagn Gynecol Obstet; 4: 235-241.

Corden SA, SAnt-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG. (1999) The integration of HPV-18 ADN in cervical carcinoma. Mol Pathol; 52: 275-282

Cowsert LM, Fox MC, Zon G, Mirabelli CK. (1993) *In vitro* evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: potential treatment for genital warts. Antimicrob Agents Chemother; 37: 171-177

Crum CP, Nuovo GJ. (1991) Intraepithelial Squamous Lesions of the Cervix. Genital papillomaviruses and related neoplasms. New York. Raven Press, New York. pp 106-128.

Cubilla AL, Ayala MT, Barreto JE, Bellasai JG, Nöel JC. (1996) Surface adenosquamous carcinoma of the penis. A report of three cases. Am J Surg Pathol; 20: 156-160.

Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster WD, Fair W.(1998) Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papillota virus-related penile neoplasm: areport of 20 cases. Am J Surg Pathol; 22: 755- 761.

Cubilla AL, Velazques EF, Reuter VE, Oliva E, Mihm MC Jr, Young RH. (2000) Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of “verruciform” penile tumors. Am J Surg Pathol; 24: 505-512.

Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S and Young RH. (2001) Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. Int J Surg Pathol; 9: 111-120.

Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. (1991) Analysis of the physical state of different human papilomavirus ADNs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J Virol; 65: 606-612

Das Gupta T, Grabstald H. (1965) Melanoma of the genitourinary tract. J Urol; 93: 607-614.

de Koning MN, Quint WG, Pirog EC. (2008) Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. Mod Pathol.; 21: 334-44.

de Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. (1995) The use of general primers Gp5 and Gp6 elongated at their 3´ends with at adjacent highly conserved sequences improbes human papillomavirus detection by PCR. J Gen Vir; 76: 1057-1062

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Haunsen H. (2004) Classification of papillomaviruses. Virology; 324: 17-27.

Dillner J, Meijer CJLM, Krogh von G, Horenblas S. (2000) Epidemiology of human papillomavirus infection. Scan J Urol Nephrol Suppl; 205: 194-200.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, Mclean C, Crawford L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. Nature; 352: 824-827.

Doorbar J. (2005) The papillomavirus life cycle. J Clin Virol; 32S: S7-S15.

Duggan MA, Inoue M, McGregor SE, Stuart GC, Morris S, Chang-Poon V, Schepansky A, Honore L. (1994) A paired comparison of dot blot hybridization and PCR amplification for HPV testing of cervical scrapes interpreted as CIN 1. Eur J Gynaecol Oncol; 15: 178-187.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harolw E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science; 243: 934-937

Erlich HA, Gelfald D, Sninsky JJ. (1992) Recent advances in the polymerase chain reaction. Science; 252:1643-1651.

Evans-Jones JC, Forbes-Smith PA, Hirschowitz L. (1985) Follow-up of women with cervical koilocitosis. Lancet; 1: 1445.

Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, Smith DI. (2003) Preferential integration of human papilomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. Oncogene; 22: 7233-7242

Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, Gallee MPW, Raaphorst FM, Doeberitz M, von K, Meijer CJLM, Snijders PJF. (2003) Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the $p16^{INK\ 4A}$ / cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. J Pathol; 201: 109-118.

Finge DC, Tamimi HK, Creer BE. (1985) Lymphatic spread in carcinoma of the vulva. Am J Obstet Gynecol; 152: 387-394.

Fletcher CD, Lowe D. (1984) Inflammatory fibrous histiocytoma of the penis. Histopathology; 8: 1079- 1084.

Frame MC. (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. Biochim Biophys Acta; 1602: 114-130

Fu YS, Reagan JM. (1989) Histology of the lower female genitale tract. En: Pathology of the uterine cervix vagina and vulva. 1ª Ed. Saunders Company. pp 7-18.

Goldminz D, Scott G, Klaus S. (1989) Penile basal cell carcinoma. Report of a case and review of the literature. J Am Acad Dermatol; 20: 1094- 1097.

González-Cámpora R, Nogales FF Jr, Lerma E, Navarro A, Matilla A. (1981) Lymphoma of the penis. J Urol; 126: 270-271.

Gosling JRG, Abell MR, Drolette BM, Loughrin TD. (1961) Infiltrative squamous cell (epidermoid) carcinoma of vulva. Cancer; 14: 330-343.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos M. (1991) PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. Am J Clin Pathol; 95: 117-124.

Gross GE, Barasso R. (1997) Human papilomavirus infection: a clinical atlas. Ullstein Mosby. Berlín

Harper JW. (1997) Cyclin dependent kinase inhibitors. Cancer Surv; 29: 91-107.

Hauser B, Gross G, Schneider A, Villiers E, Gissman, Wagner D. (1985) HPV 16 related bowenoid papulosis. Lancet; 2: 106.

Heideman DA, Waterboer T, Pawlita M, Delis-van Diemen P, Nindl I, Leijte JA, Bonfrer JM, Horenblas S, Meijer CJ, Snijders PJ. (2007) J Clin Oncol; 25: 4550-4556

Herdo JJO, Shafi MI, Rollason TP. (1996) Vulvar intraepithelial neoplasia: long term follow up of treated and untreated women. Br J Obstet Gynecol; 103: 446-452.

HØrding U, Junge J, Daugaard S, lundvall F, Poulsen H, Bock JE. (1994) Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. Gynecol oncol; 52: 241-6

HØrding U, Daugaard S, Junge J, Lundvall F. (1996) Human papilomavirus and multifocal genital neoplasia. Int J Gynecol Pathol; 15: 230-4

Höpfl R, Sandbichler M, Sepp N, Heim K, Müller-Holzner E, Wartusch B, daunt O, Jochmus-Kudielka I, ter Meulen J, Gissmann L, Fritsch P. (1991) Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. Lancet; 337: 373-374

Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. (1992) Human papilomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p52 in human keratinocytes. J Virol; 66: 6237-6241.

Hughes FJ, Romanos MA. (1993) E1 protein of human papillomavirus is a ADN helicase/ATPase. Nucleic Acids Res; 21: 5817-5823.

Hung-Fu Tseng, Morgenstern H, Mack T and Peters RK. (2001) Risk factors for penile cancer: Results of a population based case-control study in Los Angeles County (US). Cancer causes and control; 3: 267-277.

Innis MA, Gelfand DH. (1990) Optimization of PCRs. En: PCR Protocols. A guide to methods and applications. 1º Ed. Academic Press Inc. San Diego. pp: 3-12.

Isom HC, Wigdahl B, Howett MK. (1996) Molecular pathology of human oncogenic viruses. Celular and molecular pathogenesis. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. pp: 341-388.

Iwasaki T, Sata T, Sugase M, Sato Y, Kurata T, Suzuki K, Ohmoto H, Iwamoto S, Matsukura T. (1992) Detection of papilom antigen of human papilomavirus (HPV) in benign lesions of female genital tract using anti-HPV monoclonal antibody. J Pathol; 168: 293-300.

Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. (1990) Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol; 43:499-504.

Jacquemier J, Penault F, Durst M, Parc P, Seradour B, Meynard P, Halfon P, Hassoun J. (1990) Detection of five different human papillomavirus types in cervical lesions by in situ hybridization. Hum Pathol; 21: 911-917.

Jee SH, Wona SY, Yuna JE, Leeb JE, Park JS, Jid SS. (2004) Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a metaanalysis. Int J of Gynecol and Obst; 85: 301-308

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. (1995) Integration of human papllomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. J Virol; 69: 2989-2997.

Joyce JG, Tsung JS, Przysiecki JC, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU and Keller PM. (1999) The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans of human keratinocytes. J Biol Chem; 274: 5810-5822.

Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, Hermans J, Trimbos JB, Fleuren GJ. (1997) p53 protein overexpression is common and independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. Cancer; 80: 1228-1233

Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. (1994) Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. Lab Invest; 71: 604-11.

Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, Johansson B, Hagmar B. (1996) Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papilomavirus J Clin Microbiol; 34: 2095-2100

Kastan M, Kuerbitz SJ. (1993) Control of G1 arrest after DNA damage. Environ Health Perspect; 101 suppl 5: 55-58

Kaye V, Zhang G, Dehner LP, Fraley EE. (1990) Carcinoma *in situ* of penis. Is distinction between erythroplasia of Queyrat and Bowen´s disease relevant? Urology; 36: 479-482.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc Natl Acad Sci USA; 89: 12180-12184.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature; 380: 79-82

Krebs HB. (1989) Hitos en la investigación del papilomavirus humano. Infección genital por papilomavirus humano. Ed. Interamericana. México. pp 105-109.

Kochel HG, Monazahian M, Sievert K, Hohne M, Thomssen C, Teichmann A, Arendt P, Thomssen R. (1991) Occurrence of antibodies to L1, L2, E4 and E7 gene products of human papillomavirus types 6b, 16 and 18 among cervical cancer patients and controls. Int J Cancer; 48: 682-688

Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, Lloveras B, Evans D, Couttlée F. (2003) Internacional Proficiency Study of a Consensus L1 PCR Assay for the Detection and Typing of Human Papillomavirus ADN: Evaluation of Accuracy and Intralaboratory and Interlaboratory Agreement. J Clin Microbiol; 41: 1080-1086.

Kraus FT, Pérez-Mesa C. (1966) Verrucous carcinoma. Clinical and pathologic study of 105 cases involving oral cavity, larynx, and genitalia. Cancer; 19: 26-28.

Kreuter A, Brockmeyer NH, Weissenborn SJ, Gambichler T, Stücker M, Altmeyer P, Pfister H, Wieland U. (2008) Penile intraepithelial neoplasia is frequent in HIV-positive men with anal dysplasia. J Invest Dermatol. En prensa

Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E. (1992) Tumors of the cervix, vagina and vulva. En: Atlas of tumor pathology. 3rd series ed. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC. pp 202-203.

Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. (1993) Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. Am J Surg Pathol; 17: 133-145.

Kwok S, Higuchi R. (1989) Avoiding false positives with PCR. Nature; 339: 237-238.

Laimins LA. (1998) Regulation of trascription and replication by human papillomaviruses. In*:* Human tumor viruses. McCance DJ (ed). American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 201-223

Lee YY, Wilczynski SP, Chumakov A, Chih D, Koeffler HP. (1994) Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. Oncogene; 9: 1655-1659

Lodish H, Berk A, Zipursky S, Lawrence S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. (2002) Molecular Cell Biology. WH Freeman and Company.

Lomanto LD, Ortiz OL, Bretón CO, Gómez AI, Mesa VM. (2003) El ciclo celular. Med UNAB; 6: 21-29

Lowe FC, Lattimer DG, Metroka CE. (1989) Kaposi´s sarcoma of the penis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Urol; 142: 1475-1477.

Longworth MS, Laimins LA. (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. Microbiol Mol Biol Rev; 68: 362-372: 1078-1081

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MP, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ. Presence of high-risk human papilomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome of survival (2006) Int J Cancer; 119: 1078-1081

Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, Sliwinski W, Baay M, Wozniak I, Maj B, Lukaszuk M. (2007) Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients-A prospective study. Gynecol Oncol; 104: 721-726

Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Frisch M. (2008) Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark. Int J Cancer; 122: 2827-34.

Malek RS, Goellner JR, Smith TF, Spy MJ, Cupp MR. (1993) Human papillomavirus infection and intraepithelial, *in situ*, and invasive carcinoma of penis. Urology; 42: 159-170.

Manos M, Lee K, Grehe C, Waldman J, Kiviat N, Holmes K, Wheelhe C. (1990) Looking for human papillomavirus type 16 by PCR. Lancet; 1: 734

McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, Doll R. (1986) Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. Int J Cancer; 37: 55-59.

McKee PH, Lowe D, Haigh RJ. (1983) Penile verrucous carcinoma. Histopathology; 7: 897- 906.

McLachlin CM, Kozakewich H, Craighill M, O´Connell B, Crum CP. (1994) Histologic correlates of vulvar human papillomavirus infection in human papillomavirus infection in children and young adults. Am J Surg Pathol; 18: 728-735.

Mills SE. (2004) Stemberg´s Diagnostic Surgical Pathology. 4th Edition. Lippincot Williams. Philadelphia, USA.

Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. (2004) ADN aneuploidy and integration of human papilomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. Clin Cancer Res; 10: 3059-3063.

Münger K, Howley PM. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res; 89: 213-228

Myers G, Iu H, Calef C, Leitner T. (1996) Heterogeneity of papillomaviruses. Semin Cancer Biol; 7: 349-358

Nashmyt K. (1996) Putting the cell cycle in order. Science; 277: 2854-80.

Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. (2006) Expression of p16(INK4A), p53, and pRB proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 103: 344-352

Nishitani H, Iygerou Z. (2002) Control of DNA replication licensing in cell cycle. Genes Cells; 7: 523-534

Oh ST, Kyo S, Laimins LA. (2001) Telomerase activation by human papilomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. J Virol; 75: 5559-5566.

Osakabe M, Hayashi M, Katayama Y, Emura I, Nemoto K, Umezu H, Saitoh K, Motoyama T. (2007) Characteristics of vulvar squamous cell carcinoma in Japanese women. Pathol Int; 57: 322-327

Ouban A, Dellis J, Salup R, Morgan M. (2003) Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in penile verrucous carcinoma. Ann Clin Lab Sci; 33:101-6.

Park JS, Namkoong SE, Han SK, Nha DJ, Lee H, Kim SJ. (1993) Comparison of L1 consensus primers with E6 type specific primers for detection of human papillomaviruses in paraffin sections of cervical neoplasia. J Korean Med Sci; 8: 60-67.

Park JS, Namkoong SE, Han SK, Nha DJ, Lee H, Kim SJ. (2001) Possible etiologic heterogeneity of vulvar intraepithelial neoplasia. A correlation of pathologic characteristics with human papilomavirus detection by in situ hybridization and polymerase chain reaction. Cancer; 67: 1599-607.

Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. (2006) MYC activatin associated with the integratin of HPV ADN at the MYC locus in genital tumors. Oncogene; 25: 5985-5993.

Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA, Coleman N. (2004) Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papilomavirus type 16 in cervical keratinocytes. Cancer Res; 64: 1359-1368.

Picconi MA, Eiján AM, Distéfano AL, Pueyo S, Alonio LV, Gorostidi S, Teyssié AR, Casabé A. (2000) Human papillomavirus (HPV) ADN in penile carcinoma in Argentina: Analysis of primary tumors and lymph nodes. J Med Virol; 61: 65-69.

Pirami L, Giache V, Becciolini A. (1997) Analysis of HPV 16, 18, 31 and 35 ADN in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cerviz. J Clin Pathol; 50: 600-604

Poblet E, Alfaro L, Fernández-Segoviano P, Jiménez-Reyes J, Salido EC. (1996) Human papillomavirus-associated penile squamous cell carcinoma in HIV-patients. Am J Surg Pathol; 23: 1119-1123.

Poblet E, Pascual A, Godínez JM, Pariente-Martín M, Escario E, García-Olmo DC. (2008) Human papillomavirus-associated penile sarcomatoid carcinoma. J Cutan Pathol; 35: 559-565

Prowse DM, Ktori EN, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S. (2008) Human papillomavirus-associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. Br J Dermatol; 158: 261-265

Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho Gy, Klein RS, Burk RD. (1997) PCR detection of human papillomavirus : comparison between My09(My11 and Gp5+/Gp6+ primer systems. J Clin Microbiol; 35: 1304-1310

Ramos JZ, Pack GT. (1966) Primary embryonal rhabdomyosarcoma of the penis in 2-year-old child. J Urol; 96: 928-923.

Rando RF, Sedlacek TV, Hunt J, Jenson AB, Kurman RJ, Lancaster WD. (1986) Verrucous carcinoma of the vulva associated with an unusual type 6 human papillomavirus. Obstet Gynecol; 67: 70s-75s.

Ranki A, Lassus J, Niemi KM. (1995) Relation of p53 tumor suppressor protein expression to human papilomavirus (HPV) DNA and to cellular atypia in male genital warts and in premalignant lesions. Acta Derm Venereol; 75: 180-186.

Reeves WC, Brinton LA, García M, Brennes MM, Herrero R, Gaitán E, Tenorio F, Britton RC, Rawls WE. (1989) Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. N Eng J Med; 320: 1437-1441.

Rocco JW, Sidransky D. (2001) p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp Cell Res; 264: 42-55

Roman A., Fife KH. (1989) Human papillomaviruses: are we ready to type? Clin Microbiol Rev; 2:166-190.

Romanczuk H, Howley PM. (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:3159-3163.

Roberts S, Ashmole I, Sheehan TM, Davies AH, Gallimore PH. (1994) Human papillomavirus type 1 E4 protein is a zinc-binding protein. Virology; 202: 865-874.

Rous P, Beard JW. (1935) Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). J Exp Med; 62: 523-545

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla A, Quint WGV, Pirog EC. (2001) Detection and typing of human papillomavirus ADN in penile carcinoma. Am J Pathol; 159: 1211-1218.

Saiki RK, Gelfald DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science; 239: 487-491.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acat Sci USA; 74: 5463-5467

Santos M, Montagut C, Mellado B, García A, Ramón y Cajal S, Cardesa A, Puig-Tintoré LM, Ordi J, (2004) Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. Int J Gynecol Pathol; 23: 206-214

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. (1992) Detection of human papilomavirus in squamous neoplasm of the penis. J Urol; 147: 389-392

Schiffman MH. (1992) Validation of hybridization assays: correlation of filter in situ, dot blot and PCR with Southern blot. IARC Sci Publ; 119: 169-179

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. (1985) Structure and transcription oh human papilomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature; 314: 111-114

Shibata DK, Arnhein N, Martin WJ. (1988) Detection of human papillomavirus in paraffin embedded tissue using the polymerase chain reaction. J Exp Med; 167: 225-230.

Siadat-Pajouh M, Ayscue AH, Periasamy A, Herman B. (1994) Introduction of a fast and sensitive fluorescent in situ hybridization method for single-copy detection of human papillomavirus (HPV) genome. J Histochem Cytochem; 42: 1503-1512.

Skapa P, Zamecnik J, Hamsikova E, Salakova M, Smahelova J, Jandova K, Robova H, Rob L, Tachezy R. (2007) Human papillomavirus (HPV) profiles of vulvar lesions: possible implications for the classification of vulvar squamous cell carcinoma precursors and for the efficacy of prophylactic HPV vaccination. Am J Surg Pathol; 31:1834-1843.

Smart RH. (1984) Leiomiosarcoma of the penis. J Urol; 132: 356-357.

Smotkin D. (1989) Virología del papilomavirus humano. Infección genital por papilomavirus humano. Ed Interamericana. México. pp 117-124.

Smyth Templeton N. (1992) The polymerase chain reaction. History methods and applications. Diagn Mol Pathol; 1: 58-72.

Soto M, Arredondo F, Pedrero G, Basquero B, Zurera A, Linares R. (2003) Cáncer de pene. Una revisión de 18 casos. Actas Urol Esp; 10: 797-802.

Srodon M, Stoler MH, Baber GB, Kurman RJ (2006) The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). Am J Surg Pathol; 30: 1513-1518.

Stilwell TJ, Zincke H, Gaffey TA, Woods JE. (1988) Malignant melanoma of the penis. J Urol; 140: 72-75.

Stone KM. (1989) Aspectos epidemiológicos de la infección genital por papilomavirus humano. Infección genital por papilomavirus humano. Ed Interamericana. México. pp 111-115.

Stork P. (1990) Handout for lectures on the PCR. En: Curso largo de Biología Molecular. Sevilla. XV Congreso Nacional de la S.E.A.P. pp 63-131.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. (1993) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. J Virol; 67: 4521-4532

Suchankova A, Ritterova L, Krcmar M, Krchnak V, Vagner J, Jochmus I, Gissmann L, Kanka J, Vonka V. (1991) Comparison of ELISA and western blotting for human papillomavirus type 16 E7 antibody determination. J Gen Virol; 72: 2577-2581

Sutton BC, Allen RA, Moore WE, Dunn ST. (2008) Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. Mod Pathol; 21:345-54

Tan TM, Gloss B, Bernard HU, Ting RC. (1994) Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. J Gen Virol; 75: 2663-2670.

Thorner LK, Lim DA, Botchan MR. (1993) ADN-binding domain of bovine paipillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. J Virol; 67:6000-6014

Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I. (2003) The role of TP53 in cervical carcinogenesis. Hum Mutat; 21: 307-312.

Toki T, Kurman Rj, Park JS, Kessis T, Daniel RW, Shah KV. (1991) Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. Int J Gynecol Pathol; 10: 107-125

Turek LP. (1994) The structure, function and regulation of papilomavirus gene in infection and cervical cancer. Adv Viral Res; 44: 305-356

van Beurden M, ten Kate FW, Tjong AHSP, de Craen AJ, van der Vange N, Lammes FB, ter Scheqqet J. (1998) Human papilomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. Int J Gynecol Pathol; 17: 12-16

van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Wallboomers JM. (1990) Rapid detection of human papilomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. J Clin Microbiol; 28: 2739-2743

van der Avoort IA, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JM, de Hullu JA, de Wilde PC, Bulten J, Melchers WJ, Massuger LF. (2006) Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. Int J Gynecol Pathol; 25: 22-29

Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. (2001) Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papilomavirus Type 16 E6 oncoprotein. J Virol; 75: 4467-4472

Villa LL and Lopes A. (1986) HPV ADN sequences in penile carcinomas in Brazil. Int J Cancer; 37: 853-855.

Wentzensen N, VInokurova S, von Knebel, Doeberitz M. (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papilomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res; 64: 3878-3884

Wieland U, Jurk S, Weissenborn S, Krieg T, Pfister H, Ritzkowsky A. (2000) Erytroplasia of Queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papilomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma *in situ*. J Invest Dermatol; 115: 396-401.

Williams JJ, Mouradian JA, Hagopian M, Gray GF. (1979) Hemangioendothelial sarcoma of penis. Cancer; 44: 1146- 1149.

Xiong Y, Kuppuswamy D, Li Y, Livanos E, Hixon M, White M, Beach D, TIsty TD. (1996) Alteration of cell cycle kinase complexes in human papillomavirus E6- and E7-expressing fibroblasts precedes neoplastic transformation. J Virol; 70: 999-1008

You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. (2004) Interaction of the bovine papilomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. Cell; 117: 349-60

Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P. (1995) Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papilomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. J Virol; 69: 6389-6399.

Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH. (1994) Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV ADN requires an intact L2 N-terminal sequence. J Virol; 68: 619-625.

zur Hausen H. (1996) Papillomavirus infection a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta; 1288: F55-F78.

zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer; 2: 342-350

ICTVdB Management (2006). 00.099. Papillomaviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond C. (Ed), Columbia University. New York, USA

8. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Árbol filogenético que representa los tipos conocidos de papilomavirus y su relación	6
Figura 2.	Lesiones típicas de verrugas plantares producidas por HPV 1	8
Figura 3.	Lesiones de verrugas virales de tipo común producidas por HPV 2	8
Figura 4.	Carcinoma de cérvix en el que HPV 16 juega un papel fundamental	8
Figura 5.	Esquema del genoma circular de HPV 16	10
Figura 6.	Esquema del ciclo celular	17
Figura 7.	Ciclo vital vírico y producción de proteínas virales asociadas a la maduración del epitelio escamoso	19
Figura 8.	Estructura de la proteína p53, representación mostrando los 5 dominios de que se compone	20
Figura 9.	Esquema representando la interacción p16-pRb	21
Figura 10.	Rutas de control del ciclo celular e interacciones con las proteínas virales E6 y E7	22
Figura 11.	Esquema de la integración de HPV en el ADN del hospedador	23
Figura 12.	Coilocitos de citoplasma claro en células epiteliales de frotis vaginal	25
Figura 13.	Detección de partículas virales mediante hibridación *in situ*.	30
Figura 14.	Esquema de los tipos histológicos de carcinoma verruciforme	48
Figura 15.	Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN después de amplificación mediante PCR usando el set de *primers* Gp5+/6+	65
Figura 16.	Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN después de amplificación mediante PCR usando el set de *primers* My09/11	66
Figura 17.	Representación gráfica mediante software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) de la secuencia obtenida mediante amplificación por PCR	67
Figura 18.	Ejemplo de búsqueda en base de datos BLAST	67
Figura 19.	Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de pene	74
Figura 20.	Caso de carcinoma *in situ*	75
Figura 21.	Caso típico de carcinoma de pene de tipo común	76
Figura 22.	Carcinoma de tipo común con intensa atipia celular	76

Figura 23. Carcinoma condilomatoso 77

Figura 24. Carcinoma condilomatoso con atipia coilocítica 77

Figura 25. Zona infiltrante de carcinoma carcinomatoso 78

Figura 26. Carcinoma verrucoso 78

Figura 27. Carcinoma papilar 79

Figura 28. Carcinoma sarcomatoide 80

Figura 29. Nidos de carcinoma en componente sarcomatoide 80

Figura 30. Componente sarcomatoide típicamente fusocelular 80

Figura 31. Tinción inmunohistoquímica con vimentina 81

Figura 32. Tinción inmunohistoquímica con citoqueratina AE1-AE3 81

Figura 33. Nidos infiltrantes en carcinoma basaloide de pene 81

Figura 34. Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de vulva 82

Figura 35. Caso de carcinoma *in situ* de vulva 83

Figura 36. Caso de carcinoma de vulva de tipo común 84

Figura 37. Carcinoma de vulva de tipo común 84

Figura 38. Carcinoma condilomatoso de vulva con atipia citológica 85

Figura 39. Carcinoma de vulva de tipo basaloide 86

Figura 40. Carcinoma basocelular de vulva 86

Figura 41. Genotipo de los 49 casos positivos de carcinoma de pene 89

Figura 42. Genotipo de los 11 casos positivos de carcinoma de vulva 89

Figura 43. Caso moderadamente positivo de carcinoma de pene 90

Figura 44. Caso moderadamente positivo de carcinoma de pene 91

Figura 45. Caso intensamente positivo de carcinoma de pene 91

Figura 46. Carcinoma epidermoide de pene moderadamente positivo para p16 92

Figura 47. Carcinoma epidermoide de pene intensamente positivo para p16 93

Figura 48. Carcinoma epidermoide de pene intensamente positivo para p16 93

Figura 49. Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en carcinomas de pene 94

Figura 50. Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en carcinomas de vulva 95

Figura 51. Distribución de la población estudiada por edades y sexo 97

Figura 52. Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de pene por pacientes 98

Figura 53. Distribución de los tipos histológicos en carcinoma de vulva por pacientes 99

Figura 54. Genotipos en los 38 pacientes positivos de carcinoma de pene 101

Figura 55. Genotipos en las 11 pacientes positivas de carcinoma de vulva 102

Figura 56. Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en pacientes con carcinoma de pene 103

Figura 57. Representación gráfica de los porcentajes de positividad de marcadores inmunohistoquímicos en pacientes con carcinoma de vulva 104

9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Genotipos de HPV y lesiones producidas en humanos	7
Tabla 2.	Clasificación histológica de los carcinomas peneanos y vulvares	59
Tabla 3.	*Primers* específicos para HPV que se han utilizado y secuencias	63
Tabla 4.	*Primers* específicos para hemoglobina que se han utilizado y secuencias	63
Tabla 5.	Condiciones de amplificación por PCR de genoma viral	64
Tabla 6.	Condiciones de amplificación por PCR de β globina humana	65
Tabla 7.	Tipos histológicos de carcinoma de pene encontrados en la serie	74
Tabla 8.	Tipos histológicos de carcinoma de vulva encontrados en la serie	82
Tabla 9.	Porcentajes de positividades con la técnica de PCR en carcinomas de pene	87
Tabla 10.	Porcentajes de positividades con la técnica de PCR en carcinomas de vulva	87
Tabla 11.	Genotipos detectados en carcinomas de pene y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos	88
Tabla 12.	Genotipos detectados en carcinomas de vulva y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos	89
Tabla 13.	Número de muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentajes de expresión sobre el total de carcinomas de pene	94
Tabla 14.	Número de muestras positivas para marcador estudiado y porcentajes de expresión sobre el total de carcinomas de vulva	95
Tabla 15.	Tipos histológicos de carcinoma de pene encontrados en el estudio por pacientes	97
Tabla 16.	Tipos histológicos de carcinoma de vulva encontrados en el estudio por pacientes	98

Tabla 17.	Porcentajes de positividad con la técnica de PCR en pacientes con carcinoma de pene	100
Tabla 18.	Porcentajes de positividad con la técnica de PCR en pacientes con carcinoma de vulva	100
Tabla 19.	Genotipos detectados en pacientes con carcinoma de pene y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos	100
Tabla 20.	Genotipos detectados en pacientes con carcinoma de vulva y porcentaje sobre el total que representa cada uno de ellos	101
Tabla 21.	Número de pacientes con muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentajes de expresión sobre el total de carcinomas de pene	102
Tabla 22.	Número de pacientes con muestras positivas para cada marcador estudiado y porcentajes de expresión sobre el total de carcinomas de vulva	103
Tabla 23.	Tabla de incidencia de HPV en carcinoma de vulva según análisis bibliográfico. En la columna de autores se reseña sólo el primer autor	106
Tabla 24.	Tabla de incidencia de HPV en carcinoma de vulva según análisis bibliográfico. En la columna de autores se reseña sólo el primer autor	111
Tabla 25.	*Primers* específicos para HPV que se han utilizado y secuencias	114
Tabla 26.	Incidencia de subtipos histológicos de carcinoma de pene en la literatura previa y en el presente trabajo, y su relación con la infección por HPV	117
Tabla 27.	Incidencia de subtipos histológicos de carcinoma de vulva en la literatura previa y en el presente trabajo, y su relación con la infección por HPV	118

10. ANEXOS

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Análisis estadísticos de los resultados inmunohistoquímicos en muestras de carcinoma de pene

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p16	65	100,0%	0	,0%	65	100,0%

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p53	65	100,0%	0	,0%	65	100,0%

Tabla de contingencia HPV * p16

		p16		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	8	10	18
	POSITIVO	20	27	47
Total		28	37	65

Tabla de contingencia HPV * p53

		p53		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	3	15	18
	POSITIVO	8	39	47
Total		11	54	65

Pruebas de chi-cuadrado
HPV * p16

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,019(b)	1	,890		
Corrección por continuidad(a)	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitudes	,019	1	,890		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,554
Asociación lineal por lineal	,019	1	,891		
N de casos válidos	65				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 7,75.

HPV * p53

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,001(b)	1	,973		
Corrección por continuidad(a)	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitudes	,001	1	,973		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,643
Asociación lineal por lineal	,001	1	,973		
N de casos válidos	65				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,05.

Correlaciones

		HPV	p16
HPV	Correlación de Pearson	1	,017
	Sig. (bilateral)		,893
	N	65	65
p16	Correlación de Pearson	,017	1
	Sig. (bilateral)	,893	
	N	65	65

		HPV	p53
HPV	Correlación de Pearson	1	-,004
	Sig. (bilateral)		,973
	N	65	65
p53	Correlación de Pearson	-,004	1
	Sig. (bilateral)	,973	
	N	65	65

Correlaciones no paramétricas

			HPV	p16
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	,017
		Sig. (bilateral)	.	,893
		N	65	65
	p16	Coeficiente de correlación	,017	1,000
		Sig. (bilateral)	,893	.
		N	65	65

			HPV	p53
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	-,004
		Sig. (bilateral)	.	,973
		N	65	65
	p53	Coeficiente de correlación	-,004	1,000
		Sig. (bilateral)	,973	.
		N	65	65

Análisis estadísticos de los resultados inmunohistoquímicos en pacientes con carcinoma de pene

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p16	49	100,0%	0	,0%	49	100,0%

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p53	49	100,0%	0	,0%	49	100,0%

Tabla de contingencia HPV * p16

		p16		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	5	6	11
	POSITIVO	15	23	38
Total		20	29	49

Tabla de contingencia HPV * p53

		p53		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	1	10	11
	POSITIVO	7	31	38
Total		8	41	49

Pruebas de chi-cuadrado
HPV * p16

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,126(b)	1	,722		
Corrección por continuidad(a)	,000	1	,994		
Razón de verosimilitudes	,125	1	,723		
Estadístico exacto de Fisher				,740	,492
Asociación lineal por lineal	,124	1	,725		
N de casos válidos	49				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,49.

HPV * p53

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,544(b)	1	,461		
Corrección por continuidad(a)	,075	1	,784		
Razón de verosimilitudes	,606	1	,436		
Estadístico exacto de Fisher				,663	,416
Asociación lineal por lineal	,533	1	,466		
N de casos válidos	49				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,80.

Correlaciones

		HPV	p16
HPV	Correlación de Pearson	1	,051
	Sig. (bilateral)		,729
	N	49	49
p16	Correlación de Pearson	,051	1
	Sig. (bilateral)	,729	
	N	49	49

		HPV	p53
HPV	Correlación de Pearson	1	-,105
	Sig. (bilateral)		,471
	N	49	49
p53	Correlación de Pearson	-,105	1
	Sig. (bilateral)	,471	
	N	49	49

Correlaciones no paramétricas

			HPV	p16
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	,051
		Sig. (bilateral)	.	,729
		N	49	49
	p16	Coeficiente de correlación	,051	1,000
		Sig. (bilateral)	,729	.
		N	49	49

			HPV	p53
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	-,105
		Sig. (bilateral)	.	,471
		N	49	49
	p53	Coeficiente de correlación	-,105	1,000
		Sig. (bilateral)	,471	.
		N	49	49

Análisis estadísticos de los resultados inmunohistoquímicos en muestras de carcinoma de vulva

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p16	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p53	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%

Tabla de contingencia HPV * p16

		p16		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	24	8	32
	POSITIVO	5	5	10
Total		29	13	42

Tabla de contingencia HPV * p53

		p53		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	9	23	32
	POSITIVO	5	5	10
Total		14	28	42

Pruebas de chi-cuadrado
HPV * p16

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,228(b)	1	,136		
Corrección por continuidad(a)	1,212	1	,271		
Razón de verosimilitudes	2,120	1	,145		
Estadístico exacto de Fisher				,238	,136
Asociación lineal por lineal	2,175	1	,140		
N de casos válidos	42				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,10.

HPV * p53

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,641(b)	1	,200		
Corrección por continuidad(a)	,804	1	,370		
Razón de verosimilitudes	1,580	1	,209		
Estadístico exacto de Fisher				,259	,184
Asociación lineal por lineal	1,602	1	,206		
N de casos válidos	42				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,33.

Correlaciones

		HPV	p16
HPV	Correlación de Pearson	1	,230
	Sig. (bilateral)		,142
	N	42	42
p16	Correlación de Pearson	,230	1
	Sig. (bilateral)	,142	
	N	42	42

		HPV	p53
HPV	Correlación de Pearson	1	-,198
	Sig. (bilateral)		,210
	N	42	42
p53	Correlación de Pearson	-,198	1
	Sig. (bilateral)	,210	
	N	42	42

Correlaciones no paramétricas

			HPV	p16
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	,230
		Sig. (bilateral)	.	,142
		N	42	42
	p16	Coeficiente de correlación	,230	1,000
		Sig. (bilateral)	,142	.
		N	42	42

			HPV	p53
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	-,198
		Sig. (bilateral)	.	,210
		N	42	42
	p53	Coeficiente de correlación	-,198	1,000
		Sig. (bilateral)	,210	.
		N	42	42

Análisis estadísticos de los resultados inmunohistoquímicos en pacientes con carcinoma de vulva

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p16	37	100,0%	0	,0%	37	100,0%

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HPV * p53	37	100,0%	0	,0%	37	100,0%

Tabla de contingencia HPV * p16

		p16		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	19	7	26
	POSITIVO	6	5	11
Total		25	12	37

Tabla de contingencia HPV * p53

		p53		
		NEGATIVO	POSITIVO	Total
HPV	NEGATIVO	9	17	26
	POSITIVO	5	6	11
Total		14	23	37

Pruebas de chi-cuadrado
HPV * p16

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,211(b)	1	,271		
Corrección por continuidad(a)	,513	1	,474		
Razón de verosimilitudes	1,179	1	,278		
Estadístico exacto de Fisher				,443	,235
Asociación lineal por lineal	1,179	1	,278		
N de casos válidos	37				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,57.

.

HPV * p53

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,386(b)	1	,534		
Corrección por continuidad(a)	,063	1	,802		
Razón de verosimilitudes	,382	1	,537		
Estadístico exacto de Fisher				,713	,397
Asociación lineal por lineal	,376	1	,540		
N de casos válidos	37				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.
b 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,16.

Correlaciones

		HPV	p16
HPV	Correlación de Pearson	1	,181
	Sig. (bilateral)		,284
	N	37	37
p16	Correlación de Pearson	,181	1
	Sig. (bilateral)	,284	
	N	37	37

		HPV	p53
HPV	Correlación de Pearson	1	-,102
	Sig. (bilateral)		,547
	N	37	37
p53	Correlación de Pearson	-,102	1
	Sig. (bilateral)	,547	
	N	37	37

Correlaciones no paramétricas

			HPV	p16
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	,181
		Sig. (bilateral)	.	,284
		N	37	37
	p16	Coeficiente de correlación	,181	1,000
		Sig. (bilateral)	,284	.
		N	37	37

			HPV	p53
Rho de Spearman	HPV	Coeficiente de correlación	1,000	-,102
		Sig. (bilateral)	.	,547
		N	37	37
	p53	Coeficiente de correlación	-,102	1,000
		Sig. (bilateral)	,547	.
		N	37	37