

TRABAJO DE GRADO

***INCIDENCIA DE INFECCION POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
HOMBRES PAREJAS DE MUJERES CON LESION CERVICAL INTRAEPITELIAL
ESCAMOSA Y CANCER QUE ASISTEN A LA CONSULTA EXTERNA DE LA
CLÍNICA MATERNIDAD RAFAEL CALVO.***

PRESENTADO POR:

JUAN CARLOS VELEZ ROMAN

MEDICO ESPECIALISTA EN UROLOGIA

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento Quirúrgico

Sección de Urología



Cartagena, julio de 2010

TRABAJO DE GRADO

***INCIDENCIA DE INFECCION POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
HOMBRES PAREJAS DE MUJERES CON LESION CERVICAL INTRAEPITELIAL
ESCAMOSA Y CANCER QUE ASISTEN A LA CONSULTA EXTERNA DE LA
CLÍNICA MATERNIDAD RAFAEL CALVO.***

AUTORES:

Investigador Principal

Barbara Arroyo Salgado, MSc

Coinvestigadores

Lia Barrios Garcia MD. Patóloga

Estebana Inés Benedetti P. MD. Patóloga

José V. Osorio MD. Urólogo

Luis Alzadora MD. Urólogo

Juan Carlos Vélez MD. Estudiante de postgrado urología

Blanca De oro. MD patóloga

Gregorio Young Castro. Estudiante de Pregrado

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE MEDICINA

GRUPO DE MICROBIOLOGIA CLINICA Y AMBIENTAL



Cartagena, julio de 2010

INCIDENCIA DE INFECCION POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN HOMBRES PAREJAS DE MUJERES CON LESION ESCAMOSA INTRAEPITELIAL DEL CERVIX QUE ASISTEN A LA CONSULTA EXTERNA DE LA CLÍNICA MATERNIDAD RAFAEL CALVO.

RESUMEN

El cáncer de cérvix es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres a nivel mundial. La carcinogénesis cervical está relacionada con la infección por los serotipos de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH). La Infección por este virus, es reconocida como la infección de transmisión sexual más frecuente en los países en vía de desarrollo. Los hombres son considerados transmisores de la infección, por lo que las investigaciones en ellos tienen gran relevancia. Debido a la ausencia de lesiones, la detección de VPH ha sido un problema en este género, haciéndose necesaria la implementación de nuevas metodologías. Las técnicas utilizadas hasta hoy con este propósito han sido: PCR-RFLP, Captura Híbrida, Hibridización in situ. Dada la poca visibilidad de las lesiones, pocos son los estudios que enfocan su atención a la detección de la infección por VPH en hombres. En Colombia, hay pocos datos de prevalencia y el desarrollo de técnicas diagnósticas para detección de VPH en hombres está por implementarse. Por esto se evaluó la prevalencia de éstos virus y sus tipos en hisopados penianos, utilizando técnicas de diagnóstico molecular. Se realizó un estudio descriptivo transversal utilizando 18 casos (hombres parejas de mujeres con lesiones premalignas y malignas del cuello del útero), a cada individuo se le practicó una toma de muestra mediante hisopado amplio que comprende el glande, cuerpo del pene y surco balanoprepucial y luego se les practicó un examen físico y la peneoscopia. De las biopsias de las mujeres se obtuvo ADN en el 52%, sumado al 50% en las suspensiones celulares. La prevalencia de VPH en hombres fue 44,4% y los tipos encontrados fueron 6, 16 y 18, con 52% de infecciones por virus de alto riesgo y observándose dos coinfecciones entre los tipos 16 y 6.

Objetivo general:

- Conocer la frecuencia de infección por VPH en mujeres con lesión cervical intraepitelial escamosa, que acuden a la unidad de patología ginecológica y colposcopia de la ESE Clínica Maternidad Rafael Calvo, y sus compañeros sexuales.

Objetivos específicos:

- Detectar cambios citopáticos por VPH en las muestras de cérvix de las mujeres que acuden a la unidad de patología ginecológica y colposcopia de la ESE Clínica Rafael Calvo, remitidas por citología cérvicovaginal con Lesión intraepitelial escamosa.
- Identificar lesiones sugestivas de infección por VPH en los genitales externos de los hombres en estudio con examen físico y peneoscopia.
- Realizar estudios moleculares PCR-PVH FAST 2.0 en biopsia de cérvix y el producto del hisopado del pene para detectar infección por VPH y posterior tipificación.
- Comparar los resultados obtenidos de la mujer y su compañero con relación a la presencia de infección por VPH y serotipos.

MARCO TEÓRICO

EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

La infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) en hombres, contribuye significativamente a la infección y desarrollo de enfermedad cervical en la mujer (1, 2, 3, 4) A nivel mundial, el cáncer del cuello uterino es el segundo cáncer más frecuente en mujeres después del cáncer de mama. Anualmente se diagnostican cerca de 500.000 casos y mueren 274.000 mujeres por esta causa. Un 83% de estos casos y de estas muertes ocurren en países del tercer mundo. Para el año 2002, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), estimó 71.862 nuevos casos y 32.639 muertes por cáncer del cuello uterino en América latina y el caribe (5), región donde el cáncer de cuello uterino contribuye a más años de vida perdidos que la tuberculosis, la mortalidad materna o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) (6). En muchos países industrializados la mortalidad por cáncer cervical ha disminuido hasta 70%, sobre todo por los programas de tamización bien organizados (7). Estos programas, que se basan en la citología vaginal como prueba de tamización, han cubierto periódicamente a la mayoría de las mujeres en riesgo, y se complementan por un buen diagnóstico y tratamiento precoces de las lesiones precancerosas y por un buen control de calidad de todas las etapas. Los programas de tamización con estas características no son fáciles de organizar y son costosos. En Colombia no existen programas con tales características. Se prevé que en las actuales circunstancias, la incidencia de cáncer cervical continuará aumentando en los países del tercer mundo debido al aumento en la esperanza de vida de la población y a la ausencia de programas de tamización eficientes. Se estima para el año 2020 un aumento de casos de cáncer cervical de 51% en mujeres menores de 65 años y del 80% en mujeres mayores de 65 años, es decir que de 409.000 casos por año que ocurrieron en el 2002, se pasaría a 640.000 casos en el 2020 (8)

En Colombia, el cáncer de cuello uterino es el tipo de cáncer más frecuente entre la población femenina y constituye la segunda causa de muerte por cáncer en esta población.

En los últimos cinco años se han registrado en Colombia entre 4500 y 5000 casos nuevos y entre 2000 y 2200 muertes anuales por esta enfermedad. (9)

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El VPH es un virus pequeño, de 55 nm de diámetro, cubierto por una cápside que contiene una doble hebra de DNA circular. Su tamaño oscila entre 6800 y 8400 pb. El genoma viral está dividido en marcos de lectura abiertos (ORF open reading frames) tempranos y tardíos. Los tempranos ORF codifican 6 proteínas relacionados con la regulación de la replicación del DNA y la proliferación celular. Los ORF tardíos L1 y L2 codifican proteínas relacionadas con la producción de la cápside viral (10). L1 es el gen más conservado y es la base para la diferenciación taxonómica del VPH. Además, hay una larga región de control cuya función es poco conocida. La replicación del genoma requiere de todos los genes tempranos (11).

La proteína E1 está involucrada en el mantenimiento y replicación del genoma (12, 13). La proteína E2 es la principal transreguladora, afectando la transcripción y replicación del DNA viral (14); además, en los tipos de VPH de alto riesgo, E2 actúa principalmente como un represor del promotor de los genes E6 y E7 (15, 16) Se cree que estas proteínas trabajan juntas para mantener el genoma viral en su forma episódica dentro de la célula (17). Durante la amplificación del genoma viral, E2 se une a una región reguladora corriente arriba y forma un complejo con la DNA helicasa de E1. Este complejo de iniciación es análogo a un complejo celular similar y puede permitir la replicación del DNA en ausencia de la replicación de la célula huésped. La proteína E4 es el ORF más frecuentemente transcrito en las verrugas benignas y se expresa en niveles relativamente altos en las células escamosas diferenciadas (12) donde ocurre el empaquetamiento y ensamblaje viral. La expresión de E4 es necesaria para la producción de la proteína L2, una de las dos proteínas estructurales de la cápside. E4 además fragmenta la citoqueratina citoplasmática, causando la condensación de los tonofilamentos en la periferia celular y el aclaración citoplasmático perinuclear produciéndose la apariencia morfológica del coilocito (12).

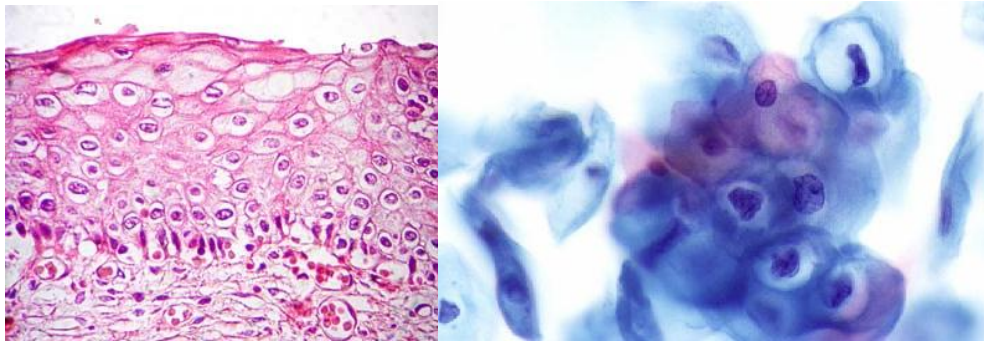


Figura 1. Coilocitos. (Atlas NCI Bethesda)

Esta fragmentación de la queratina puede facilitar la liberación de partículas virales desde las células epiteliales escamosas superficiales (18, 19). Las proteínas oncogénicas E5, E6 y E7 están involucradas en la transformación celular. E5 es una proteína pequeña que se une a varias proteínas de membrana del huésped y receptores de factores de crecimiento (12), ayuda a prevenir la apoptosis después del daño celular (20) y facilita la evasión del sistema inmune por las células infectadas (21)

Las oncoproteínas E6 y E7 estimulan la progresión del ciclo celular y se unen a los reguladores del ciclo (22), (Ver figura 2) induciendo la proliferación de las células basales infectadas para facilitar la replicación del genoma viral (23, 12). E6 se une a p53, una proteína que causa la detención de la fase G1 en respuesta a daños en el DNA (24) e induce la apoptosis en células dañadas y estimula su degradación formando un complejo con la proteína humana E6AP, una proteína ubiquitina ligasa, resultando en la ubiquitinización del p53 y la activación del sistema de proteasas dependientes de ubiquitina (25), de igual forma inactiva otras proteínas proapoptóticas incluyendo Bak (26) y Bax (27), permitiendo la progresión celular e impidiendo la muerte de las células infectadas en replicación. Por un mecanismo desconocido, E6 induce la actividad de la telomerasa lo que mantiene la longitud del telómero en las células infectadas (28).

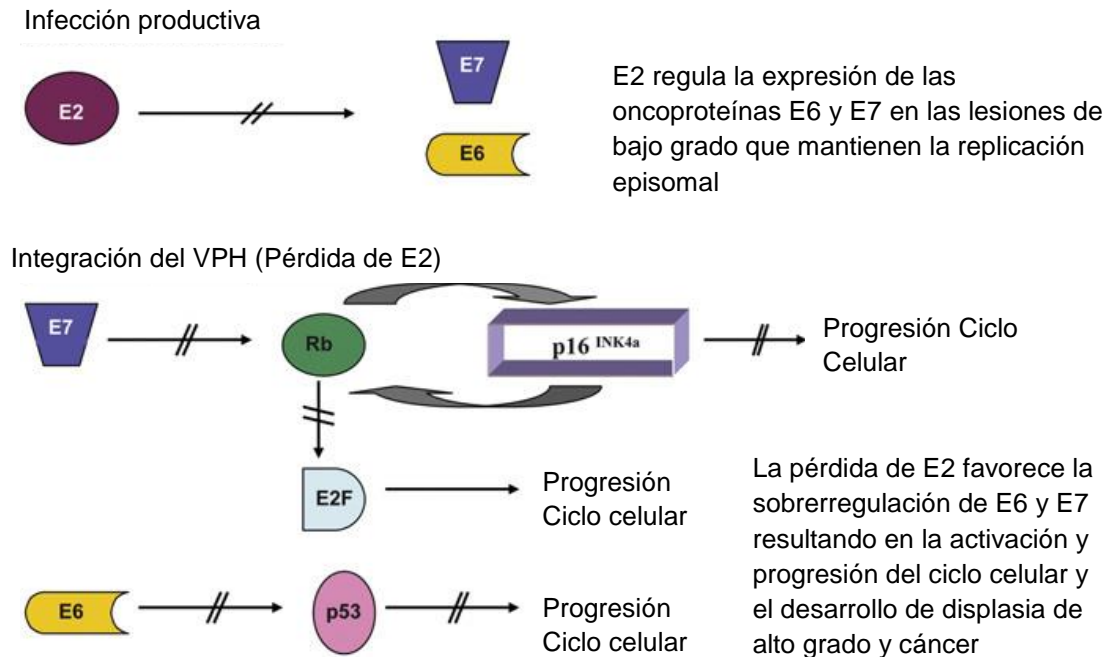


Figura 2. Regulación del efecto de las proteínas transformadoras del VPH (Tomado de Thomison J, Thomas I, Shroyer K. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Hum path 2008; 39: 154-166)

La proliferación celular es normalmente regulada en las células diferenciadas pero la proliferación celular descontrolada y las reentradas al ciclo celular son características del cáncer. Para alcanzar una adecuada replicación del DNA, las células tienen puntos reguladores de control para prevenir la iniciación de la fase S; un punto de control dependiente de ciclina-quinasa. La ciclina D actúa como un sensor de factores de crecimiento e interactúa con las cinasas dependientes de ciclina y fosforila pRb, una proteína supresora de tumores, en respuesta a señales extracelulares (29, 30). Las cinasas específicas dependientes de ciclina D, CDK4 y CDK6, son inhibidas por un grupo de proteínas conocidas como INK4, incluyendo p16INK4a (34). El envejecimiento celular ocurre en respuesta a un incremento en esos inhibidores y al acortamiento de los telómeros (31, 32, 33). pRb hipofosforilado previene normalmente la entrada de las células a la fase S por activación de reguladores transcripcionales conocidos como E2F, los cuales activan

genes importantes para el inicio de la fase S (24) Si el pRb es fosforilado se libera E2F y la célula entra irreversiblemente en fase S e inicia su replicación (24) E7 tiene una estructura y función similar a la ciclina D1, regula la proliferación celular a través de la inactivación de la vía de pRb y la unión a otras proteínas de proliferación, incluyendo p21 y p27 (34)

La infección por el VPH se inicia por la penetración de viriones a las células madre multipotenciales de la capa basal, través de lesiones en el epitelio de superficie (35, 36) Varios estudios sugieren que la unión inicial del virus a la célula huésped es dependiente de heparán sulfato (37, 38). La internalización de los viriones es un proceso lento de endocitosis de vesículas envueltas en clathrina (39, 40), la desvoltura y liberación de los viriones puede resultar por la ruptura de las uniones disulfuro dentro del capsómero (41) El DNA es transportado al núcleo para transcripción y replicación, donde se mantiene en forma episómica. La infección resulta en lesiones subclínicas microscópicas y latencia viral relacionada con la evasión de los mecanismos de vigilancia inmune. La supresión del sistema inmune del huésped puede permitir la reactivación de una infección latente o la reinfección desde un sitio activo, produciéndose lesiones (42, 43)

Hasta hoy se han identificado más de cien tipos de VPH según sus diferencias en la secuencia de DNA (44), de ellos, alrededor de 40 pueden infectar la región anogenital. De acuerdo con el riesgo oncogénico, se clasifican en tipos de alto y bajo riesgo. Los tipos clásicos de alto riesgo son el 16 y 18. Los tipos clásicos de bajo riesgo son el 6 y 11 (45, 23, 12)

En resumen, el VPH es un virus epiteliotrópico e infecta principalmente las células epiteliales escamosas más que columnares, cuboidales o transicionales. La infección en hombres puede ser inaparente o expresarse como carcinoma de células escamosas. Se ha propuesto que los cánceres relacionados con infección por VPH en genitales externos, tienen las siguientes características: 1. se originan en las células escamosas, 2. DNA del virus en el núcleo de las células tumorales con expresión de oncogenes virales, 3. se localizan en sitios anatómicos con exposición directa al virus, 4. estímulo para el desarrollo de anticuerpos séricos para las proteínas E6 y E7 del VPH, 5. asociación con comportamiento sexual y 6. Tasas mayores de las esperadas en pacientes inmunosuprimidos y en aquellos con anteriores neoplasias relacionadas con VPH (46).

INFECCIÓN POR VPH Y LESIÓN INTRAEPITELIAL ESCAMOSA EN MUJERES

El fenotipo microscópico de la Lesión Intraepitelial Escamosa (LIE) o Neoplasia intraepitelial Cervical (NIC) refleja un fino balance entre factores que promueven o aceleran el desarrollo de una enfermedad más avanzada y de factores que reducen o desaceleran su progresión. Los ingredientes críticos son el genotipo del VPH y la respuesta inmune del paciente. La severidad de LIE o NIC se expresa por su grado microscópico, lo cual hace parte del informe de patología e influye en el tratamiento del paciente (Figura 3) que se entiende según la regresión, persistencia y progresión de los diferentes grados de NIC (Tabla 1) (47)

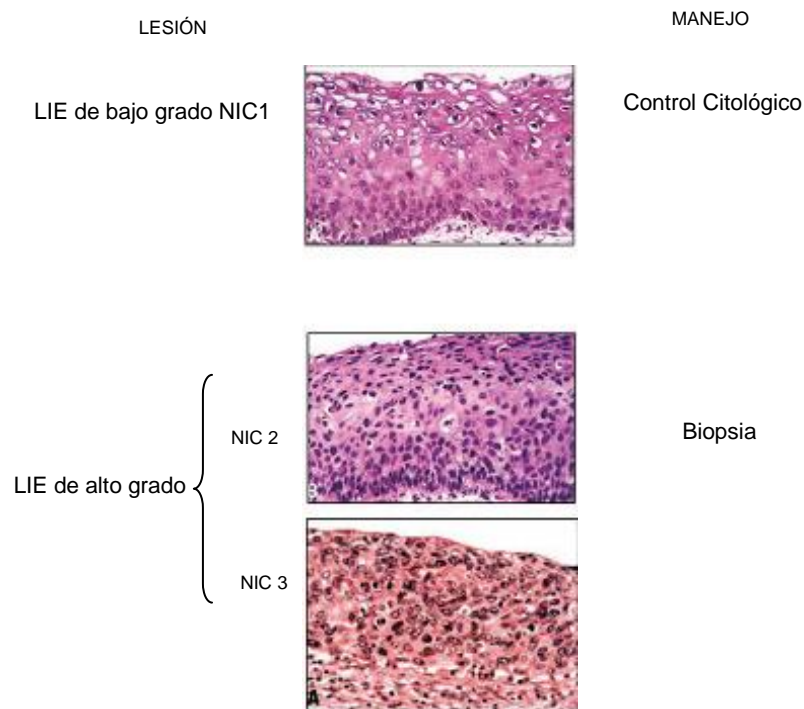


Figura 3. El tratamiento de las Lesiones Intraepiteliales Escamosas (LIE) depende del grado histológico (Bajo grado= NIC1. Alto grado= NIC2 o NIC3)(J. Clin. Pathol. 2006;59;1017-1028)

Tabla 1. Tasas de regresión, persistencia y progresión de los diferentes grados de NIC				
	Regresión (%)	Persistencia (%)	Progresión a Carcinoma in situ(%)	Progresión a carcinoma invasor
NIC1	57	32	11	1
NIC2	44	35	22	5
NIC3	32	< 56	-	12
(47)				

INFECCIÓN POR VPH Y CÁNCER EN HOMBRES

Los estudios iniciales de las infecciones por VPH en genitales masculinos se basaron en la inspección visual de lesiones epiteliales acetoblancas (figura 4. pápulas, espículas, lesiones epiteliales blanquecinas o grisáceas), con o sin lentes de aumento, como un marcador diagnóstico de infección por VPH. Existen otras condiciones benignas de la piel genital que se asocian con ese tipo de lesiones, resultado en una pobre especificidad de la peneoscopia para detectar VPH en los genitales masculinos (48).

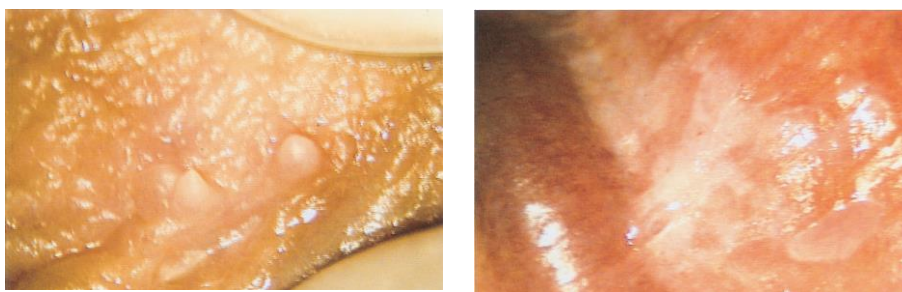


Figura 4. Lesiones en pene. Izquierda: pápulas. Derecha: Lesión plana acetoblanca

Las verrugas genitales (figura 5) tienen una prevalencia anual estimada de 1% en la población sexualmente activa con edades entre 15 y 49 años en los Estados Unidos (49). Aunque la presencia de úlceras no se asocia con mortalidad, estas lesiones se relacionan con síntomas como ardor, sangrado y dolor (50).



Figura. 5 Condilomas en pene

Más del 90% de las verrugas genitales se relacionan con los tipos de VPH 6 y 11 considerados de bajo riesgo (48). Mujeres con historia de verrugas genitales tienen un riesgo incrementado de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer que se explica por la coexistencia de otros tipos oncogénicos (51).

Cáncer de Pene

El cáncer de pene (figura 6) corresponde a menos del 0.5% de todos los cánceres en hombres. La mayor incidencia de este cáncer se presenta en países Latinoamericanos tales como Brasil, Perú y Colombia donde la incidencia es de 1.5 a 3.7 por 100.000 hombres (52). La correlación geográfica entre la incidencia de cáncer cervical y de pene y la concordancia de estos dos cánceres en parejas casadas soporta la hipótesis de una etiología común (53) El DNA del VPH se detecta en el 40 – 50% de todos los cánceres de pene y los estudios serológicos han confirmado la presencia de los serotipos 16 y 18 (54)



Figura 6. Carcinoma de células escamosas del pene

La presencia del DNA viral es más alta en las neoplasias intraepiteliales del pene (PIN 1, 2 y 3) en el tipo histológico basaloide, oscila entre una 75 a 80% disminuyendo a un 30 – 60% en el carcinoma invasor de células escamosas. La mayoría de los carcinomas de pene son de células escamosas y se ha demostrado que muchos de ellos son negativos para la presencia de DNA de VPH. La positividad para el DNA viral se relaciona fuertemente con cánceres de tipo histológico basaloide o verrugoso (47%), puramente basaloide (75%) y se relaciona débilmente con el tipo de células escamosas grandes queratinizante (11%) (54). El serotipo 16 es el más frecuentemente asociado con estas lesiones. (55)

Cáncer Anal

El VPH infecta todos los sitios anogenitales y tiene un papel importante en el desarrollo de cánceres en esta localización. La incidencia de esta lesión maligna es más alta entre hombres homosexuales y entre pacientes infectados por el VIH y mujeres (8). Una alta tasa de cáncer anal relacionado con VPH entre hombres homosexuales no es inesperada, debido a que el ano comparte con el cérvix la presencia de una zona de transformación susceptible a la infección por este virus (56)

Similar al cáncer de cérvix, la mayoría de los carcinomas invasores del ano (65%) son de tipo escamoso y se originan de lesiones premalignas (AIN Neoplasia Intraepitelial Anal. Figura7). El VPH ha sido detectado en el 80% o más de las lesiones cancerosas y el serotipo 16 es el más frecuentemente encontrado.

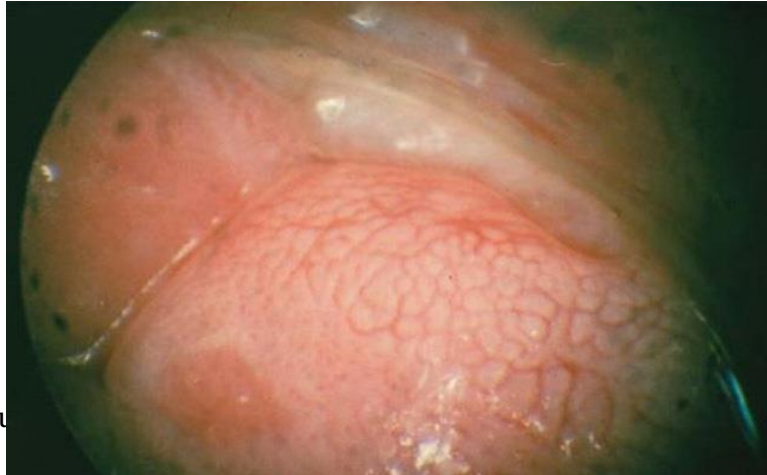


Figura 7

Como consecuencia de su transmisión sexual, la infección por VPH constituye una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente, pues en general la mayoría de las mujeres y de los hombres sexualmente activos han estado expuestos a estos virus en algún momento de su vida, lo que tiene una gran importancia sobre todo si se considera la asociación que existe entre la infección por algunos VPH y la aparición de carcinomas genitales (57)

Estudios de infección por VPH en parejas heterosexuales han mostrado que el comportamiento sexual del hombre y el estado de la infección por VPH están relacionados con el riesgo de que su compañera desarrolle lesiones precancerosas y cáncer cervical (1, 2, 3, 4, 58, 59, 60) La alta prevalencia e incidencia de la infección genital por VPH en hombres, está asociada con lesiones en ano y pene (61, 62, 63) y con cáncer del canal anal y pene (64, 65, 66, 67, 68, 69, 70)

La prevalencia e incidencia de la infección por VPH es alta en hombres. En un reporte de Dunne et al., en el cual se hizo una revisión sistemática de la literatura, la prevalencia de VPH en hombres oscila entre 1.8 – 72.9% (71)

Estudios recientes de prevalencia que evaluaron espectro completo de tipos de VPH en diversas poblaciones masculinas, incluyendo los compañeros sexuales estables de mujeres VPH positivas (72), pacientes de clínicas de enfermedades de transmisión sexual (73), estudiantes universitarios (74) y hombres de la comunidad (75, 76), encontraron prevalencias del 16.5% al 51.5%, dependiendo del sitio anatómico evaluado para detectar la infección por VPH.

Se cree que la naturaleza asintomática de la infección por VPH en hombres, es la responsable de la transmisión sostenida a sus compañeras sexuales y por consiguiente la perpetuación de la infección en una población determinada. La alta prevalencia de la infección por VPH en mujeres junto con la ausencia de lesiones visibles en el pene en sus compañeros, llevó a diversos grupos de investigación a buscar métodos de diagnóstico más sensibles y específicos (72). Según las recomendaciones de las guías de enfermedades de transmisión sexual, cada compañero de una mujer infectada debe ser examinado para identificar, tratar y prevenir la perpetuación de la enfermedad (77). A pesar de las recomendaciones, las investigaciones acerca de la presencia de HPV en hombres, compañeros de mujeres infectadas no han tenido consenso. (78, 79, 72, 80). La detección de lesiones acetoblancas en los genitales masculinos ha ocasionado muchas biopsias innecesarias. El examen citológico del pene también tiene poca utilidad diagnóstica (59, 79). Desafortunadamente, la identificación de la presencia de VPH en hombres es más difícil que en mujeres, debido a una menor área de mucosa escamosa no queratinizada en los genitales masculinos en comparación con los genitales femeninos (81). Las lesiones acetoblancas como las definieron Wikstrom y cols., (82) son evaluadas usando un método de magnificación óptica llamado peneoscopia. Estudios recientes han demostrado que aún realizado por profesionales expertos, el método tiene baja especificidad en la detección de lesiones de alto grado asociadas con VPH, llevando a biopsias innecesarias (78, 83).

La detección genital de VPH tanto en hombres como en mujeres se hace actualmente con métodos de amplificación de señal, tales como la captura híbrida o PCR que tienen una alta

sensibilidad y especificidad (84). Los mejores sitios para obtener muestras en hombres, teniendo en cuenta la conveniencia, la calidad y la detección del DNA del VPH, parece ser el glande, corona, prepucio y cuerpo del pene. Es posible que tomar muestra de múltiples sitios sea lo mejor. El muestreo de estos sitios parece tener varias ventajas: muestras adecuadas y obtención sencilla e indolora. Las muestras del escroto son adecuadas pero en muchos estudios no se obtuvo DNA viral. EL prepucio cuando está presente, es posiblemente el mejor sitio, individual, para la detección del DNA de VPH (71).

Se han usado diferentes métodos para la obtención de la muestra. Los que han demostrado conseguir muestras adecuadas y mejor reproducibilidad son: a. frotar la piel genital y después hacer un barrido con un escobillón y recolectar las células exfoliadas en un medio de transporte estándar (85) b. muestrear directamente el epitelio genital con un escobillón humedecido en solución salina y recolección en un medio de transporte estándar (75)

Vacunas contra la infección por VPH

El hecho que el agente etiológico de casi el 100% de los cánceres de cérvix sea la infección por VPH, sugiere que la protección contra la infección, previene el desarrollo de esta enfermedad. Muchas de las proteínas codificadas por el VPH no son lo suficientemente antigénicas para inducir una adecuada respuesta antigénica del huésped, aunque la vacunación con proteínas estructurales virales induce una inmunidad efectiva en modelos animales y humanos (86, 87, 88)

Usando proteínas recombinantes o purificadas, incluyendo combinaciones de L1 y L2, numerosos estudios han demostrado inducción de respuesta humoral y celular, así como respuesta T citotóxica (89, 90). La gran variedad de tipos virales es muy importante en el desarrollo de estrategias efectivas de vacunación. Sin embargo, sólo unos pocos tipos de VPH como el 16, 18, 31 y 45, son responsables del 80% de los casos de cáncer cervical y son los blancos de las actuales vacunas (12).

Hay evidencia que señala reactividad cruzada de los anticuerpos frente a diversos tipos de virus. Se han observado que pacientes con anticuerpos persistentes tipo IgG frente a proteínas del VPH16, han presentado una reducción del 50% en infecciones por VPH de cualquier tipo (91). Actualmente existen dos vacunas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration), la tetravalente Gardasil® (Merck and Co, INC) que contiene VLPs (“virus like-particles) de dos genotipos de alto riesgo (16 y 18) y de dos genotipos de bajo riesgo (6 y 11) y la bivalente Cervarix® (GlaxoSmithKline) que contiene VLPs de los VPH de alto riesgo 16 y 18.

Recientes estudios con la vacuna de Merck han mostrado buena eficacia en prevenir enfermedades asociadas con los tipos virales específicos 6, 11, 16 y 18. Un meta-análisis de fase 4 encontró una eficacia de aproximadamente 98% en la prevención de la Neoplasia intraepitelial Cervical 2/3 y una eficacia del 100% en la prevención del adenocarcinoma cervical in situ (92). Estos estudios fueron realizados en pacientes sin infección por VPH ni citología vaginal anormal. Cuando se incluyó la exposición previa a VPH, especialmente los tipos incluidos en la vacuna, la eficacia disminuyó (93).

Las recientes recomendaciones del Comité Asesor en Prácticas de Inmunización del Centro de Control y prevención de Enfermedades (CDC) sugiere que todas las mujeres reciban vacunación de rutina entre los 11 y 12 años de edad (94, 95) Actualmente se llevan a cabo ensayos fase 3 para evaluar la eficacia de la vacuna en mujeres de 26 a 45 años y en hombres de 17 a 26 años. Ninguna vacuna está actualmente disponible o aprobada para hombres. Actualmente no hay vacunas terapéuticas aprobadas y no existe evidencia clara de que alguna proteína pudiera ejercer este efecto (90). Estudios recientes con VLPs E7/L1 han demostrado algún efecto terapéutico en modelos animales (36); se están realizando varios ensayos en humanos y se ha observado seguridad para estas vacunas aunque con menor eficacia (90). Aunque algunas pacientes con NIC presentaron regresión de las lesiones, no fue más de lo que se esperaba sin la vacunación (96) y ningún paciente con cáncer de cérvix mostró regresión (97, 98)

Aunque el desarrollo de las vacunas contra el VPH es promisorio para la reducción de la mortalidad por esta enfermedad y sus desafortunadas consecuencias sobre la población

humana, no sustituye las pruebas de tamizaje y el tratamiento de las lesiones. Para que las estrategias de vacunación muestren óptimos resultados, necesitan implementarse en mujeres jóvenes (y quizá en hombres) antes del inicio de la actividad sexual. Datos existentes sugieren que la vacuna no brinda protección frente a los tipos virales con exposición previa. Entonces, una alta proporción de la población general continuará requiriendo pruebas de tamizaje para cáncer de cérvix y tratamiento para las neoplasias inducidas por VPH. Es probable que la vacuna no reemplace completamente otras estrategias de prevención.

Por lo anteriormente expuesto, es necesario conocer el comportamiento de esta infección en nuestro medio, para poder diseñar estrategias de promoción y prevención que permitan reducir la morbimortalidad por cáncer de cérvix.

El presente estudio incluyó compañeros sexuales estables de mujeres con lesión escamosa intraepitelial cervical. El estudio se centró en conocer la incidencia de la infección por VPH estos hombres mediante la detección de DNA viral, en muestras de cepillado del pene, así como la relación entre los virus encontrados en mujeres con lesión escamosa intraepitelial cervical.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio transversal, no intervencionista, evaluó la presencia de DNA del VPH en 18 hombres, compañeros sexuales estables de mujeres con diagnóstico histopatológico de lesión escamosa intraepitelial cervical de alto o bajo grado.

Criterio de inclusión

Para la realización de este estudio fueron seleccionados hombres parejas sexuales de mujeres que asisten a la consulta externa de colposcopia de la Clínica de Maternidad Rafael Calvo, con citología anormal, a las que posteriormente les fue realizado diagnóstico

colposcópico e histológico de LIE, durante el periodo comprendido entre marzo y octubre del 2008.

Éstos fueron contactados telefónicamente e informados para hacer parte del estudio, luego de ser orientados acerca del objetivo del trabajo, se les solicitó la firma del consentimiento informado (Anexo 3). Posteriormente les fue aplicada una encuesta tomando en cuenta los factores de riesgo asociados a posibles infecciones por VPH, tales como edad, número de compañeras sexuales, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, tabaquismo, nivel socioeconómico entre otras (Anexo 5).

Fueron incluidos 18 casos pareados (mujeres con sus parejas sexuales). A las mujeres se les aplicó un instrumento de recolección de información (Anexo 4) con previo consentimiento informado (Anexo 2) y se les realizaron estudios colposcopicos, histológicos e inmunohistoquímicos que confirmaron la presencia de LIE en el cuello uterino. Mientras que a los hombres se les realizaron análisis peneoscopicos, obteniendo muestras según los protocolos descritos por Giuiliano (48) y Flores (98). Las muestras fueron tomadas por él Urólogo, realizando frotis con hisopo estéril humedecido en solución salina 0,9%, en diferentes zonas tales como cuerpo del pene, glande y haciendo énfasis en el surco balanoprepucial, siendo esta la zona de mayor recuperación de ADN de VPH para análisis moleculares.



Figura 8. a. Obtención de muestras en surco balanoprepucial b. Almacenamiento en solución salina 0.9%. Clínica Maternidad Rafael Calvo.2008.

Las muestras obtenidas fueron almacenadas y conservadas en tubos de ensayo sellados a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio de investigación.

Estudios de Peneoscopia. Con el fin de evidenciar la presencia de lesiones macroscópicas se realizó peneoscopia. En resumen, se realizó exploración de los genitales con un peneoscopio (Morrel UMZ 7S CB modelo FQ 150), previa aplicación de ácido acético al 3%, seguido de un lapso de 3-5 minutos con la inspección con una magnificación de 7.5 a 30 aumentos en busca de lesiones acetoreactivas, inflamatorias ó acetoreactivas puntiformes, sugestivas de infección por VPH ó neoplasia intraepitelial peneana (79). (Figura 9).



Figura 9. Peneoscopia en hombres compañeros de mujeres con lesión cervical intraepitelial escamosa de la Clínica a Maternidad Rafael Calvo 2008, con Peneoscopio Morrel UMZ 7S CB modelo FQ 150.

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN de los hisopados peneanos que hicieron parte del trabajo fue utilizado un Kit Comercial (Genómica), que incluye el VPH fast 2.0, y un protocolo de extracción y purificación de ADN (Nucleospin Tissue). (Figura 4). Estos procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de la casa fabricante.

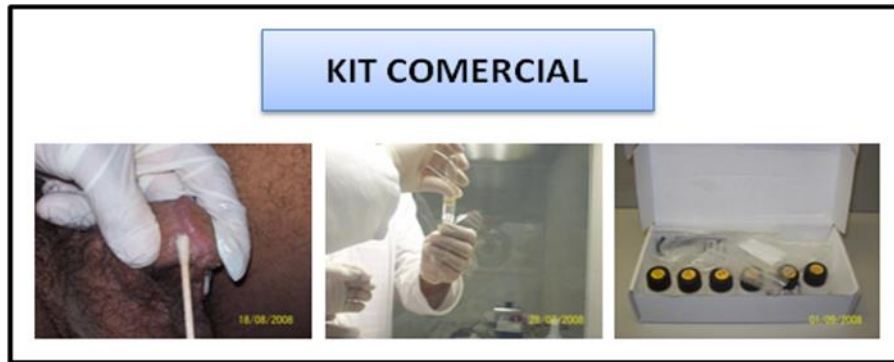


Figura 10. Metodología de la extracción de ADN de frotis peneano por Kit comercial.

Amplificación por PCR

La PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit VPH fast 2.0 (Genómica) el cual ha sido diseñado para la detección y tipado del VPH en muestras clínicas mediante amplificación por PCR y posterior digestión del producto amplificado con enzimas de restricción.

Con el Kit VPH Fast 2.0, la detección de VPH se realiza amplificando una región de unos 450 pb del ADN del virus que es muy similar entre los distintos tipos de VPH. Esta región es la denominada L1 del marco abierto de lectura (ORF) del genoma del virus. A pesar de que esta secuencia es común a los distintos tipos de VPH presenta pequeñas variaciones entre unos tipos y otros.

Seguendo el procedimiento del Kit se tomó 5 μ l de ADN que fue agregado a los tubos de PCR que vienen preparados en el Kit. La secuencia de los cebadores que amplifican el segmento del genoma del virus no son especificados. Las condiciones de la PCR son de acuerdo al manual del Kit y se observan en la tabla 1. La amplificación se realizó en el termociclador Geneamp PCR system 2004. El producto amplificado se observó en gel de agarosa al 2%, tomando 10 μ l del producto + 2 μ l de buffer de carga. El marcador de peso

molecular utilizado fue Roche Diagnostics Cat No. 113366045001(preparado por cortes de ADN pUCBM21 con endonucleasa de restricción HpaII, Dra I y Hind III). Las condiciones de corrida electroforética fueron 80 Voltios por 40 minutos.

El Kit VPH Fast 2.0 contiene dos controles internos en el tubo de reacción donde se analiza la muestra. Por un lado, la amplificación de ADN del paciente presente en la muestra sirve como control del ADN de la muestra porque en los tubos de reacción van incluidos una pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 892 pb del gen humano CFTR. Por otro lado, todos los tubos de reacción del Kit también contienen un plásmido modificado que sirve como control de la reacción de amplificación. Este control interno se amplifica con los mismos cebadores que el gen CFTR humano, pero el tamaño del amplificado es distinto (1202 pb). Los dos controles internos se amplifican simultáneamente junto con el VPH en un único tubo de reacción. (Genómica. Manual VPH FAST 2.0. 2004).

De manera que al amplificar el ADN extraído a partir de una muestra clínica podemos encontrarnos estas bandas de amplificado:

- Banda de unos 450 pb (variable según el tipo de VPH): corresponde a la amplificación del VPH presente en la muestra.
- Banda de 892 pb: corresponde a la amplificación del ADN del paciente (control del ADN de la muestra).
- Banda de 1202 pb: corresponde a la amplificación del plásmido (control de la reacción de amplificación).

Tabla 2. Condiciones de PCR según VPH fast 2.0 (genómica).

1 ciclo	95° C 9 min
45 ciclos	94° C 1 min 55° C 1 min 72° C 1 min
1 ciclo	72° C 9 min
20°C continuo hasta la recogida de tubos (opcional)	

Tipificación del VPH

La tipificación se realizó con el Kit VPH fast 2.0 siguiendo las instrucciones de la casa fabricante. Una forma útil de tipar los virus es localizar pequeñas variaciones características de cada tipo.

Para localizar estas pequeñas variaciones de secuencia y, por tanto, para tipar los diferentes VPH, se digiere el ADN amplificado anteriormente con las enzimas de restricción Rsa I y Rsa II (enzimas 1 y 2) incluidas en el Kit. (Genómica. Manual VPH FAST 2.0. 2004).

Teniendo en cuenta las instrucciones de la casa fabricante se tomó 40 µl de cada muestra positiva para VPH (ver ítem anterior) y se distribuyó en dos tubos, para digerir con enzima 1 y en otro tubo con la mezcla de enzimas 1 y 2. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 2 horas teniendo en cuenta las condiciones de digestión que suministra el Kit, luego de este tiempo se centrifugó durante 1 minuto. (Figura 7). Para identificar los genotipos de VPH se siguieron las tablas de restricción del Kit que muestran los patrones de banda según el tipo de VPH. (Genómica. Manual VPH FAST 2.0. 2004).

Para la visualización de los productos de la digestión se tomaron 15 µl de muestra + 3 µl de buffer de carga que fueron depositados en un gel de agarosa 2.5% con marcador de peso

molecular Roche Diagnostic. Las condiciones de corrida fueron 80 Voltios por 120 minutos.

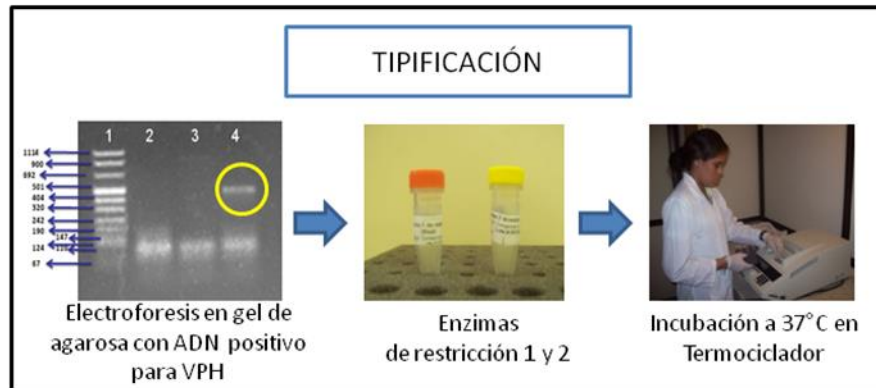


Figura 11. Proceso de tipificación utilizando VPH Fast 2.0 del producto amplificado por digestión con enzimas de restricción (enzima 1 y enzima 2).

Desparafinización

Para la desparafinización se utilizó Xilol frío (de grado analítico). Fueron tomados dos cortes de 5µm y 10µm de cada bloque de tejido parafinado, que fueron embebidos en xilol 100% durante 5 minutos y posterior a esto se llevó a centrifugación a 12000 rpm descartando el sobrenadante. El procedimiento se repitió hasta remover completamente la parafina. Luego se le agregó 1 ml de etanol 96% frío, mezclando por vortex durante 5 segundos y centrifugación a 12000 rpm por 5 minutos (100). Igualmente se repitió el procedimiento con etanol al 70% y al 50% frío.

El Método de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico utilizado para suspensiones celulares y tejidos parafinados se realizó según el protocolo del manual de laboratorio (101). Una vez desparafinado el tejido se le agregó 500 µl de buffer de digestión (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 0.1M pH 8.0, SDS 0.5%) con Proteinasa K (20mg/ml). Se incubó durante 60 minutos a 55°C, agitándose cada 5 minutos. La Proteinasa K fue inactivada a 100°C por 10 minutos, posteriormente fue centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, al cual le fue agregado igual volumen de PCI, se mezcló por inversión 4 veces y fue centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos, recuperando la fase acuosa. La precipitación se realizó agregando 1/10 del volumen en Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 2

volúmenes en etanol puro (96%) con una incubación durante 30 minutos a -20°C . Luego de la incubación se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizó el lavado con etanol 70% frío y centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, dejando secar el pellet a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 30 μl de agua desionizada y almacenado a 4°C . (Figura 12).

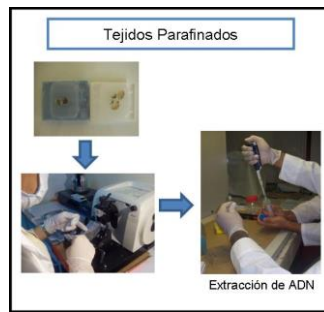


Figura 12. Extracción de ADN de tejidos parafinados por el método PCI.

En cuanto a la extracción del ADN de suspensiones celulares por este método se tuvieron en cuenta varios pasos del procedimiento establecido en el mismo, iniciando con la dispersión de las células mediante vortex en un tiempo de 2 minutos, las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf y centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos descartando el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 50 μl de Proteinasa K y 50 μl de Buffer de Lisis (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 0.1M pH 8.0, SDS 0.5%). Con una incubación a 37°C por 45 minutos agitándose cada 5 minutos. Se inactivó la proteinasa K a 100°C por 10 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos recuperando el sobrenadante, al cual le fue agregado igual volumen de PCI (Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico), se mezcló por inversión 4 veces y centrifugación a 14000 rpm durante cinco minutos recuperando la fase acuosa. La precipitación fue realizada agregando 1/10 del volumen en Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes en etanol puro con una incubación de 30 minutos a -20°C . Luego de la incubación se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizó el lavado con etanol 70% frío y centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, dejando secar el pellet a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 30 μl agua desionizada y almacenado a 4°C .

Electroforesis en gel de agarosa

La visualización del ADN extraído se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa 1% y se realizó la corrida en cámara a 80 V durante 30 minutos.

RESULTADOS

1. Prevalencia de VPH en hombres: 44.4%
2. La edad promedio en los hombres infectados de este estudio fue de $\bar{X} = 31.3$ años.
3. El 55,6% de las mujeres con LIE, que fueron parte de los casos de estudio tenían un rango de edad entre 21 y 45 años. El resto se distribuye entre 15 - 20 años que se presentaron en el 11,1% de los casos y 16.7% corresponden a mujeres con un rango de edad entre 46- 55 años.
4. En el 50% de los hombres con ADN de VPH, sus mujeres casos poseían lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE AG), contrastado con la otra mitad de los casos, que presentaron lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE BG).

5. El 25% de mujeres con sospecha colposcópica de LIE de alto grado, tenían parejas con lesiones acetoblanas en la peneoscopia. Además, en el 50% de las mujeres con sospecha colposcópica de LIE de bajo grado tenían parejas con lesiones acetoblanas en la peneoscopia. (Tabla 3)

Tabla 3. Interpretación de los resultados de colposcopia Vs. peneoscopia de los hombres parejas de mujeres con citología anormal de la Maternidad Rafael calvo en el 2008.

COLPOSCOPIA	PENEOSCOPIA				
	SIN LESIONES	%	CON LESIONES	%	Total
LIE AG	3	75,0	1	25,0	4
LIE BG	7	50,0	7	50,0	14
Total	10	55,5	8	44,4	18

6. Mediante la metodología de VPH fast 2.0 fue posible la detección del ADN del virus en el 50% de los casos que habían presentado lesión acetoblanca ó acetoreactiva provocada posiblemente por la infección con el virus. Corroborando que este análisis permite al Urólogo detectar anomalías en el epitelio genital externo como consecuencia de una infección causada por algún tipo de microorganismo. Sin embargo muchas de las lesiones acetoblanas detectadas en los hombres de estudio es posible que no sean consecuencia de la infección por el VPH (106).

Tabla 4. Interpretación de resultados de los hombres con presencia de infección por VPH, parejas de mujeres con LIE que asisten a la Clínica Maternidad Rafael Calvo en el 2008.

	Lesión acetoreactiva (peneoscopia)

ADN VPH-H	No	%	Si	%	Total
No	6	60,0%	4	50,0%	10
Si	4	40,0%	4	50,0%	8
Total general	10	100,0%	8	100,0%	18

7. Los tipos de VPH más frecuentes en este estudio fueron el 16, seguido del tipo 18, los cuales son los genotipos responsables de la mayoría de las lesiones cervicales de alto grado y observándose coinfecciones entre los tipos 16 y 6.

8. En las mujeres, las lesiones cervicales se han diagnosticado por estudio histopatológico, encontrando en los casos que hacen parte del presente estudio una relación importante entre el tipo de LIE en la mujer y el tipo de virus presente en sus respectivas parejas. De tal manera que los diagnósticos coinciden en el 88% de los casos (7 casos de 8) Tabla 5

Tabla 5. Relación entre el tipo de VPH encontrado en los hombres parejas de mujeres con lesión diagnosticada.

Tipo de VPH en hombre	Tipo de lesión en mujer
16	LIE AG
16 + 6	LIE AG
6	LIE BG
16	LIE BG
6	LIE BG
18	LIE AG
6	LIE BG
16	LIE AG

9. El 88,9% de las mujeres reportaron gestación, de éstas 27,4% han tenido entre dos y tres hijos, acompañado de multíparas con un 11,1% (hasta 7 hijos). El 66.7% afirman no haber sufrido de abortos. El método de planificación más común de las mujeres de este estudio fueron los quirúrgicos, cerca del 33.3% se han hecho salpingectomía. Los anticonceptivos

orales fueron utilizados por el 11.1% de las mujeres, mientras que el 33.3% no utiliza ningún método de planificación sexual. Este comportamiento puede explicarse por el alto porcentaje (83,3%) con nivel socioeconómico bajo, sumado al bajo nivel educativo. Un 55,6% de las mujeres ha tenido más de una pareja sexual, y 83,3% afirma que sus relaciones sexuales con su pareja son de tipo genital-genital. Tabla 6.

Tabla 6. Interpretación de resultados de los factores de riesgo asociados a una infección por VPH en las mujeres con citología anormal que asisten a la Clínica Maternidad Rafael Calvo en el 2008.

Nivel socioeconómico	No	%
Bajo (estrato 1 y 2)	15	83,3
Medio (estrato 3 y 4)	3	16,7
Paridad	No	%
Ningún parto	3	16,7
Solo un parto	2	11,1
Mas de un parto	13	72,3
Método de planificación	No	%
Salpingectomía	6	33,3
Anticonceptivos	2	11,1
Desconectada	1	5,6
Dispositivo	1	5,6
Preservativo	1	5,6

Ritmo	1	5,6
No planifica	6	33,3
	No	%
Número de parejas sexuales		
Sólo un compañero sexual	8	44,4
Más de un compañero sexual	10	55,6
	No	%
Tipo de relación sexual practicada		
Genital –genital	15	83,3
Genital -genital, oral-genital	2	11,1
Genital -genital, oral-genital, anal-genital	1	5,6

DISCUSIÓN

En este estudio la presencia de infección por VPH en los hombres fue de 44,4%, semejante a los estimativos generales de infección por VPH entre 16% y 45% referenciados por Reina (102). En otras investigaciones, la prevalencia de VPH en hombres fue de 1.3% - 72.9% en los estudios donde se evaluaron múltiples sitios o muestras; 15 (56%) de esos estudios reportaron una prevalencia global $\geq 20\%$. La prevalencia de infección por VPH es variable al interior de las diferentes poblaciones y entre las poblaciones. (71)

Tomando como referencia la dificultad de establecer el diagnóstico de infección en hombres, y debido a que poco se conoce sobre la prevalencia e historia natural de la infección entre hombres (61, 102) principalmente debido a la dificultad en la obtención de las muestras adecuadas para la detección de ADN es importante realizar estudios con casuísticas mayores que aporten conocimiento a la historia natural del VPH en este género.

La edad promedio en los hombres infectados de este estudio fue de $\bar{X} = 31.3$ años, muy cercano a la distribución de edad de hombres infectados con el VPH donde es común el rango de edad de 16 a 35 años. (103)

Un hallazgo significativo en este estudio fue encontrar en el 50% de los hombres con ADN de VPH, que sus mujeres casos poseían lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE AG), contrastado con la otra mitad de los casos, que presentaron lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE BG), cabe anotar que estos diagnósticos fueron realizados mediante biopsia, que en la actualidad es considerada la prueba “Gold Estándar”. (104, 105).

El 25% de mujeres con sospecha colposcópica de LIE de alto grado, tenían parejas con lesiones acetoblancas en la peneoscopia. Además, en el 50% de las mujeres con sospecha colposcópica de LIE de bajo grado tenían parejas con lesiones acetoblancas en la peneoscopia.

Las mujeres con LIE de alto grado probablemente tienen un mayor tiempo evolutivo de la enfermedad, con respecto a las lesiones de bajo grado. Este mayor tiempo podría favorecer la curación del hombre compañero de mujeres con lesiones de alto grado.

Estas técnicas ayudan a identificar anomalías en el epitelio que no son visibles macroscópicamente, como las lesiones acetoreactivas (acetoblancas) cuando se aplica ácido acético al 3%, permitiendo asociarlas probablemente a una infección por VPH, es decir que no suelen utilizarse como diagnóstico definitivo de una lesión. Tanto la peneoscopia como la colposcopia son técnicas similares adaptadas para la observación aumentada de zonas genitales de interés en hombres y mujeres respectivamente. (61, 71).

Se pudo identificar una lesión acetoreactiva en el 25% de los hombres que eran pareja de mujeres que tenían LIE AG, y el otro 75% equivale a hombres sin lesión que viven con parejas que presentan lesiones de AG (61).

Mediante la metodología de VPH fast 2.0 fue posible la detección del ADN del virus en el 50% de los casos que habían presentado lesión acetoblanca ó acetoreactiva provocada

posiblemente por la infección con el virus. Corroborando que este análisis permite al Urólogo detectar anomalías en el epitelio genital externo como consecuencia de una infección causada por algún tipo de microorganismo. Sin embargo muchas de las lesiones acetoblancas detectadas en los hombres de estudio es posible que no sean consecuencia de la infección por el VPH (106).

Los hombres a lo largo de la vida padecen infecciones clínicas y subclínicas. Se detectaron cuatro casos, sin ningún tipo de lesión con aislamiento del ADN de VPH, lo que hace suponer la participación de estos como vectores asintomáticos del virus, ya que lo pueden albergar frecuentemente en algún sitio anatómico de su aparato genital, escroto y/o región perianal. (63, 71, 108). En la mayoría de los casos el hombre no manifiesta lesiones clínicas ni subclínicas asociadas a VPH. La infección podría ser transitoria, y es posible que en el momento del muestreo no se evidencie la presencia del virus debido a que la infección pudo ser curada o reprimida (80). No obstante, la inmunidad juega un papel importante en el control de la infección, provocando la regresión de las lesiones microscópicas por infección por VPH en 33% en los primeros seis meses. (107). También podría ser factible que en los hisopados penianos se encuentren muy pocas células ya que la higiene diaria masculina de los genitales, inmediatamente antes de la consulta puede dar lugar a una pérdida de células y por tanto de cantidad de muestra suficiente (61).

Los métodos de muestreo son variables entre los estudios. Muchos métodos utilizan el frote o rotación de un escobillón o citocepillo, seco o húmedo en el epitelio genital. Un estudio que evaluó 3 técnicas diferentes (10 hombres por cada método) encontró que con el uso de un escobillón humedecido con solución salina después de haber frotado el sitio con papel “emery”, se obtenían muestras de mejor calidad que las obtenidas sólo con el escobillón o citocepillo (85).

Un estudio encontró que con la autorecolección se obtuvo una mayor cantidad de muestras adecuadas que las recolectadas por médicos (74).

Es común en hombres infectados la no aparición de síntomas, sin embargo están implicados en la diseminación del virus entre sus parejas sexuales. Por la presencia activa viral en el surco balanoprepucial, sitio considerado, en el estado de portador del VPH. No obstante, en

la literatura se ha implicado en el desarrollo de lesiones premalignas o de cáncer de cérvix al VPH, pero en hombres hasta la fecha es muy raro (107). La prevalencia de VPH varía de acuerdo al muestreo, métodos de procesamiento y sitio anatómico o tipo de muestra. Doce estudios compararon la detección de VPH en sitios o muestras individuales (71). Varios estudios evaluaron el glande, corona, prepucio o cuerpo del pene. 8 estudios muestrearon la corona y/o glande con una prevalencia del 6.5% - 50%. Tres estudios evaluaron el cuerpo del pene con una prevalencia de 5.6% - 51.5%. Cuatro estudios muestrearon el prepucio con una prevalencia del 24% - 50%. La prevalencia de infección por VPH fue del 7.1% - 46.2% en cinco estudios donde se muestreó el escroto. Siete estudios evaluaron la uretra distal (1 - 3 cm) y la prevalencia fue de 8.7% - 50%. Los pocos estudios que evaluaron el área perianal, ano o recto, encontraron una prevalencia del 0% - 32.8% (74)

El semen fue evaluado en dos estudios que compararon múltiples muestras y sitios anatómicos (109, 110) y en 7 estudios que evaluaron el semen como única muestra (111, 112, 113, 114, 115, 116, 117); se encontró VPH en 2.2% - 41.3% de los hombres evaluados y en más del 82.9% de las muestras.

Algunos estudios que evaluaron la orina, reportaron una prevalencia de VPH de < 7% (118, 119, 120, 109, 85, 110)

Las muestras obtenidas del prepucio, cuerpo, glande, corona y escroto fueron las que tuvieron DNA de mejor calidad; 70% - 98.5% fueron positivos para B-globina

Es por esto que los sitios anatómicos de preferencia para la obtención de la muestra para el análisis molecular en los hombres son: glande, corona, surco balanoprepucial y cuerpo del pene porque son los más convenientes y adecuados para detectar ADN de VPH, por lo que realizando mezclas de muestras de diferentes sitios se obtienen resultados más óptimos en la detección de ADN de VPH (61).

Aún cuando hay investigadores que señalan que la prevalencia de la infección por VPH en hombres es menos definida, principalmente debido a la dificultad en la obtención de las muestras adecuadas para la detección de ADN (121). La prevalencia en este estudio fue 44,4% y los tipos encontrados fueron 6, 16 y 18, con 62,5% de infecciones por virus de alto riesgo y observándose coinfecciones entre los tipos 16 y 6.

Los tipos de VPH más frecuentes en este estudio fueron el 16, seguido del tipo 18, los cuales son los genotipos responsables de la mayoría de las lesiones cervicales de alto grado. Los tipos más comunes de VPH anogenital detectados en los hombres, varían de acuerdo al estudio pero fueron similares a los que se detectan frecuentemente en mujeres. El tipo 16 fue el más común; sin embargo, otros tipos fueron reportados (tipo 6, 11, 18, 31, 33, 42, 52, 53, 54, 59 y 84) (122) la infección por varios tipos fue frecuente en hombres. En un estudio el 51.1% de los hombres con VPH, tenían infección por múltiples tipos.

En las mujeres estos tipos de lesiones se han diagnosticado por estudio histopatológico, encontrando en los casos que hacen parte del presente estudio una relación importante entre el tipo de LIE en la mujer y el tipo de virus presente en sus respectivas parejas. De tal manera que los diagnósticos coinciden en el 88% de los casos (7 casos de 8). Sin embargo, se conoce que los VPH de alto riesgo antes de progresar a displasia maligna, primero originan lesiones de bajo grado, ó puede que se trate de una regresión (105). Este argumento puede explicar el dato señalado en la tabla donde parece no haber una relación entre la lesión y el tipo de VPH. Estos datos sugieren ampliar el número de casuísticas que permitan conocer aún más el comportamiento natural del virus en las parejas. Pocos estudios han evaluado la infección por VPH en hombres y en sus compañeras sexuales. Un estudio reciente de cohorte – transversal de parejas heterosexuales encontró que el 37% de las parejas estaban infectadas con el mismo tipo de VPH. Un hallazgo importante es que la carga viral fue menor en las muestras obtenidas del pene que las obtenidas del cérvix. Altas cargas virales de VPH 16 estaban asociadas con una infección con el mismo virus en su compañero (123). Otro estudio que evaluó infección por VPH con detección de DNA o peneoscopia encontró que el 76% de los compañeros sexuales de mujeres con VPH, tenían el ADN del virus; este estudio no evaluó la concordancia en el tipo de virus (72)

Un estudio de 50 parejas encontró que la concordancia entre los tipos de VPH entre parejas sexuales es más común que lo esperado por oportunidad ($p= 0.1$) (124)

Otro estudio encontró que sólo el 22.7% de las parejas tenían el mismo tipo de VPH en muestras de genitales (125)

Este estudio permite la visualización de la problemática del VPH tanto en mujeres como en hombres, señalando que en el futuro se deberían implementar las metodologías

peneoscópicas y molecular en los hombres a fin de contribuir a la detección temprana de lesiones y presencia del ADN viral compatibles con el VPH y la disminución de las altas tasas de transmisión viral. Así como también se pretende la concientización de los hombres y su educación en el compromiso para la disminución de la morbimortalidad por cáncer de cérvix. Es importante mirar la relación que existe hoy en día entre el VPH y el cáncer, y contextualizarlo no sólo asociado al sistema genital sino también relacionado con el cáncer anal y pene. De ahí la necesidad de prevenir la transmisión de este virus y tratarlo a tiempo. Al analizar los datos de las mujeres que participaron en este estudio, se encontró que la edad promedio de las mujeres con LIE fue de $\bar{X} = 31.9$ años, dato que concuerda de manera significativa con alta prevalencia de infección por VPH en edades jóvenes y mayores y reportadas por otros autores (126, 127)

El 55,6% de las mujeres con LIE, que fueron parte de los casos de estudio tenían un rango de edad entre 21 y 45 años comparado con lo reportado por Carrillo (128) y Lazcano (129). El resto se distribuye entre 15 - 20 años que se presentaron en el 11,1% de los casos y 16.7% corresponden a mujeres con un rango de edad entre 46- 55 años en las cuales la presencia de infección por VPH se puede presentar en la reactivación de infecciones latentes (pero todavía no se demuestra estado de latencia para el VPH) o puede representar nuevas infecciones. (126). Sumado a los reportes de Muñoz (131) acerca de algunos estudios en los que se ha observado mujeres con un segundo pico después de la quinta década, que suele ser muy común en la mayoría de los países latinoamericanos.

En la mayoría de las mujeres con VPH, la infección se produce antes de los 25 años; sólo persisten el 10% de las infecciones a los 35 años ya que en condiciones de inmunidad habituales son eliminadas (103). Considerándose estos casos de mayor relevancia en la práctica, debido a que las mujeres serían propensas a desarrollar procesos neoplásicos del área genital y probablemente tener parejas portadoras del virus a más temprana edad.

El 88,9%, reportan gestación, de éstas 27,4% han tenido entre dos y tres hijos, acompañado de múltiparas con un 11,1% (hasta 7 hijos). El 66.7% afirman no haber sufrido de abortos. Aun cuando la multiparidad ha sido asociada consistentemente con un mayor riesgo de

neoplasia cervical debido al debilitamiento o trastorno que sufre la zona de transformación del epitelio endocervical, la cual es considerada la zona de mayor afinidad para albergar el virus. (130). El método de planificación más común de las mujeres de este estudio fueron los quirúrgicos, cerca del 33.3% se han hecho salpingectomía, esto obedece a que la gran mayoría tenía satisfecha su paridad, dato que fue corroborado en lo expuesto por Arroyo (131). Los anticonceptivos orales fueron utilizados por el 11.1% de las mujeres, mientras que el 33.3% no utiliza ningún método de planificación sexual. Este comportamiento puede explicarse por el alto porcentaje (83,3%) con nivel socioeconómico bajo, sumado al bajo nivel educativo. Estos factores reducen la adquisición y/o conocimiento de los beneficios de los métodos de planificación disponibles (131). Un 55,6% de las mujeres ha tenido más de una pareja sexual, y 83,3% afirma que sus relaciones sexuales con su pareja son de tipo genital-genital estos resultados son significativos pero deberían implementarse muestreos más representativos con un número mayor de mujeres con LIE a fin de sacar mejores conclusiones.

Los ocho (8) casos ADN positivos para VPH detectados fueron llevados a tipificación mediante la digestión con enzimas de restricción: Rsa I (enzima 1) y Rsa II (enzima 2) con el objetivo de identificar los tipos de VPH en las muestras. A pesar de que se amplifica una región conservada del genoma viral, existen pequeñas variaciones en esta secuencia que han ayudado a la identificación de diferentes tipos de VPH. Dándonos como resultado la presencia de VPH de alto riesgo en 62,5% (132) y sumado a esto encontramos la presencia de dos coinfecciones entre los tipos 16 y 6. (Figura 14 y 15). El tipo 6 también fue encontrado en una proporción importante de 62,5%.

Los métodos de muestreo son variables entre los estudios. Muchos métodos utilizan el frote o rotación de un escobillón o citocepillo, seco o húmedo en el epitelio genital. Un estudio que evaluó 3 técnicas diferentes (10 hombres por cada método) encontró que con el uso de un escobillón humedecido con solución salina después de haber frotado el sitio con papel “emery”, se obtenían muestras de mejor calidad que las obtenidos sólo con el escobillón o citocepillo. (73)

Un estudio encontró que con la autorecolección se obtuvo una mayor cantidad de muestras adecuadas que las recolectadas por médicos (74)

Para algunos autores, el tamizaje para la infección por VPH no es recomendado en hombres por muchas razones: la infección es muy común, no hay pruebas disponibles aprobadas por la FDA y el hallazgo de infección no indica un incremento en el riesgo de enfermedad o cáncer en el hombre o en su compañera sexual; además, no hay terapias para erradicar la infección (71). La evaluación y el tratamiento de los compañeros sexuales de mujeres con infección clínica o subclínica (verrugas genitales o citología cervicovaginal anormal) no se sabe si tenga beneficios (133, 134)

CONCLUSIONES

- La infección por VPH es común en hombres sexualmente activos y puede detectarse en varios tipos de muestras y diversos métodos.
- Muchos estudios en hombres encontraron prevalencias tan altas como las reportadas en los estudios de mujeres.
- Nuestro trabajo identificó una prevalencia de infección por VPH en hombres del 44.4%.
- El muestreo de varios sitios del pene nos permitió obtener muestras adecuadas para la búsqueda del DNA viral.
- 50% de los hombres con ADN del VPH tienen compañeras con LIE de alto grado

- El VPH tipo 16, serotipo de alto riesgo, fue el más prevalente en los hombres evaluados. Esta infección se asoció con lesiones de alto grado en las compañeras sexuales.
- El 25% de mujeres con reporte en colposcopia de LIEAG, tienen parejas que a la peneoscopia mostraron lesión acetorreactiva.
- El 50% de las mujeres con reporte de colposcopia de LIEBG, eran casos de hombres con lesiones acetorreactivas por peneoscopia.
- El mayor tiempo evolutivo de las LIE de alto grado, podría favorecer la curación del compañero sexual y explicaría una parte de portadores asintomáticos como también el menor número lesiones acetoblancas en la peneoscopia.

BIBLIOGRAFIA

1. Agarwal SS, Sehgal A, Sardana S, Kumar A, Luthra UK. Role of male behavior in cervical carcinogenesis among women with one lifetime sexual partner. *Cancer* **1993**; 72:1666–9.
2. Buckley JD, Harris RW, Doll R, Vessey MP, Williams PT. Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet* **1981**; 2:1010 – 5.
3. Thomas DB, Ray RM, Pardthaisong T, et al. Prostitution, condom use, and invasive squamous cell cervical cancer in Thailand. *Am J Epidemiol* **1996**; 143:779–86.
4. Zunzunegui MV, King MC, Coria CF, Charlet J. Male influences on cervical cancer risk. *Am J Epidemiol* **1986**; 123:302–7.)

5. Ferlay J, Bray F, Pisan P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002.: Cancer incidente, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base N°5, version 2.0. Lyon: IARCPress; 2004
6. Yang BH, Bray Fi, Parkin DM, Sellors JW, Zhang ZF. Cervical cancer as a priority for prevention in different World regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer*, 2004; 109: 418-24.
7. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: 63-70.
8. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: 11-25.
9. Ministerio de la Protección Social Colombia. (2004). El cáncer. Aspectos básicos sobre su prevención, diagnóstico y tratamiento.
10. Bonds L, Baker P, Gup CJ, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of Cdc6 in squamous and glandular neoplasia of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1163-8)
11. Thomison J, Thomas I, Shroyer K. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum path* 2008; 39: 154-166)
12. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:16-28.
13. Stoler MH. The virology of cervical neoplasia: an HPV-associated malignancy. *Cancer J* 2003;9:360-7.

14. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 1998;17:146-53.
15. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 1987;6: 3745-53.
16. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 1987;6:3391-7.
17. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 2002;24:275-90
18. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-7.
19. Wang Q, Griffin H, Southern S, et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 2004;78:821-33.
20. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV irradiation-induced apoptosis. *J Virol* 2002;76:220-31
21. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 2005;113:276-83.

22. Munger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:7888-98.
23. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32 (Suppl 1):S7-S15.
24. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7.
25. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75:495-505.
26. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998;17:2943-54.
27. Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3850-5.
28. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998;396:84-8.
29. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993;73:499-511.
30. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487-97.
31. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13742-7.

32. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10114-8.
33. Loughran O, Clark LJ, Bond J, et al. Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. *Oncogene* 1997;14:1955-64.
34. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *GenesDev* 1997;11:2090-100.
35. Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003;207:251-4.
36. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
37. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001;75:1565-70.
38. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999;274:5810-22.
39. Culp TD, Christensen ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 2004;319:152-61.
40. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307:1-11.

41. Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virology* 1998;72:2160-7.
42. Forslund O, Antonsson A, Higgins G, et al. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of candidate human papilloma virus type 92. *Virology* 2003;312:255-60.
43. Forslund O, Ly H, Reid C, Higgins G. A broad spectrum of human papillomavirus types is present in the skin of Australian patients with non-melanoma skin cancers and solar keratosis. *Br J Dermatol* 2003; 149:64-73.
44. Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., Doorn, L.J. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S43–S51)
45. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
46. Gillinson ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; (31): 57 -65)
47. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186–92.
48. Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions *Vaccine* 26S (2008) K17–K28).
49. Koutsky LA, Galloway DA, Colmes K. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1988; 10: 122-63.
50. Maw RD, Reitano M, Roy M. An international survey of patients with genital warts: perceptions regarding treatment and impact of lifestyle. *Int J STD AIDS* 1998; 9(10):571-8).

51. Friis S, Kjaer SK, Frisch M, Mellekjær L, Olsen JH. Cervical Intraepithelial Neoplasia, anogenital cancer, and other cancer types in women after hospitalizations for condylomata acuminata. *J Infect Dis* 1997; 175 (8): 743-8).
52. IARC. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publications No.160. Lyon: IARC, 2007.
53. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile cancer. *J Am Acad Dermatol* 2006;54(3):369–91)
54. IARC. Human Papillomavirus. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risk to humans. Vol. 90. Lyon: IARC Press, 2007.
55. Cupp MR, Malek RS, Goellner JR, et al. The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis. *J Urol* 2005;154:1024–9
56. Daling JR, Weiss NS, Hislop TG, et al. Sexual practices, sexually transmitted disease, and the incidence of cancer anal. *N Engl J Med* 1987;317: 973-977)
57. Gravitt PE. Diagnosis and Management of Oncogenic Cervical Human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19:439-458)
58. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst* **1996**; 88:1060 –7.
59. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* **2002**; 346:1105–12. 7.
60. Shah KV. Human papillomaviruses and anogenital cancers. *N Engl J Med* **1997**; 337:1386–8.

61. Bleeker MC, Hogewoning CJ, Van Den Brule AJ, et al. Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Am Acad Dermatol* **2002**; 47:351–7.
62. Bleeker MC, Hogewoning CJ, Voorhorst FJ, et al. HPV-associated flat penile lesions in men of a non-STD hospital population: less frequent and smaller in size than in male sexual partners of women with CIN. *Int J Cancer* **2005**; 113:36–41.
63. Critchlow CW, Surawicz CM, Holmes KK, et al. Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men: influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. *AIDS* **1995**; 9:1255–62.
64. Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst* **1993**; 85:19 – 24.
65. Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, et al. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* **2008**; 122:132–7.
66. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* **2004**; 101:270–80. 14.
67. Frisch M, Fenger C, van den Brule AJ, et al. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* **1999**; 59:753–7.
68. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, et al. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res* **1998**; 58:3839–44.

69. Kiviat NB, Critchlow CW, Holmes KK, et al. Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS* **1993**; 7:43–9.
70. Piketty C, Darragh TM, Da Costa M, et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Ann Intern Med* **2003**; 138:453–9.
71. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. *J Infect Dis* **2006**; 194:1044 – 57.
72. Nicolau SM, Camargo CG, Stavale JN, et al. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. *Urology* **2005**; 65:251–5.
73. Weaver BA, Feng Q, Holmes KK, et al. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis* **2004**; 189:677– 85.)
74. Hernandez BY, McDuffie K, Goodman MT, et al. Comparison of physician- and self-collected genital specimens for detection of human papillomavirus in men. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:513–7.
75. Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, et al. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J Infect Dis* **2007**; 196:1146 –52.
76. Nielson CM, Flores R, Harris RB, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**; 16:1107–14.

77. Von Krogh G, Lacey CJN, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV-associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Inf* 2000;76:162.)
78. Teixeira JC, Derchain SFM, Teixeira LC, Santos CC, Panetta K, Zeferino LC. Avaliac,ãõ do Parceiro Sexual e Risco de Recidivas em Mulheres Tratadas por Lesõ'es Genitais Induzidas por Papilomaví'rus Humano (HPV). *RBGO* 2002;24:315–20.
79. Leyva-Lo'pez AG, Aranda-Flores CE, Conde-Gonzá'lez C, Lazcano- Ponce EC. La baja utilidad de la determinacio'n del ADN del VPH en la regio'n distal de la uretra masculina. *Salud Publica Mex* 2003;45(Suppl. 5):S589–93.
80. Rosenblatt C, Lucon AM, Pereyra EA, Pinotti JA, Arap S, Ruiz CA. HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;84:156–61.
81. Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Østerlind A, Meijer CJLM, van den Brule AJC. Risk factors for genital HPV-DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sex Transm Infect* 2002;78:215–8..
82. Wikstrom A, Hedblad MA, Johansson B, et al. Acetic acid test in evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: a comparative study on penoscopy, histopathology, virology and scanning electron microscopy findings. *Genitourin Med* 1992;68:90–9.
83. Kumar B, Gupta S. The acetowhite test in genital human papillomavirus infection in men: what does it add? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:27–9.
84. Partidge J, Koutsky L. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:21–31

85. Weaver BA, FENA Q, Colmes KK, et al. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis* 2004; 189(4): 677-85)
86. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995;69: 3959-63.
87. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 11553-7.
88. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185:251-7.
89. World Health Organization. State of the art of new vaccines research and development. Initiative for Vaccine Research Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2003. http://www.who.int/vaccine_research/documents/en/stateofart_excler.pdf..
90. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 International Papillomavirus Conference. *J Clin Pathol* 2001;54:163-75.)
91. Ho GY, Studentsov Y, Hall CB, et al. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus like particles. *J Infect Dis* 2002;186:737-42.

92. Ault KA. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet* 2007;369:1861-8.
93. Sawaya GF, Smith-McCune K. HPV vaccination—more answers, more questions. *N Engl J Med* 2007;356:1991-3.
94. CDC's Advisory Committee recommends human papillomavirus virus vaccination. [http://www.co.gila.az.us/DepartmentFiles/Health/Nursing/HPVVaccineRecommended](http://www.co.gila.az.us/DepartmentFiles/Health/Nursing/HPVVaccineRecommended.pdf) pdf.
95. Zimmerman RK. HPV vaccine and its recommendations, 2007. *J Fam Pract* 2007;56:S1-S5.
96. Wakabayashi MT, Da Silva DM, Potkul RK, Kast WM. Comparison of human papillomavirus type 16 L1 chimeric virus-like particles versus L1/L2 chimeric virus-like particles in tumor prevention. *Intervirology* 2002;45:300-7. y ningún paciente con cáncer de cérvix mostró regresión
97. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine* 2001;19:2549-56.
98. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996; 347:1523-7.
99. FLORES, Roberto., *et al.* Reliability of sample collection and laboratory testing detection in men 2008. *Journal of Virological methods*. Vol 144 pp 136-143.
100. ARCE, J., *et al.* Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. 2007. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*. Vol 1(Nº1); pp 10-19.

101. SAMBROOK, J., *et al.* Manniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2da edición, Nueva York (NY) Cold Spring Harbor, 1989. Vol 2; pp 9-16.
102. REINA, Julio., *et al.* El estado del arte en las infecciones producidas por el virus del papiloma humano. 2008. Colombia Médica. Vol 39 (N°2) pp 189-195.
103. GÓMEZ, E., *et al.* Infección por Papilomavirus en el hombre. Estado actual. 2005. *Actas Urológicas Españolas*. Vol 29(N°4). Madrid. pp 365-362.
104. RODRIGUEZ, Esperanza., *et al.* Validez de tres métodos utilizados para la detección incipiente del cáncer cervicouterino 2008. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. Vol 46 (N°3); pp 267-272.
105. PEREZ, Eduardo., *et al.* Detección y seguimiento con inspección visual del cerviz para la prevención del cáncer cervicouterino en las zonas rurales de México. 2005. *Salud pública de México*. Vol 47(N°1); pp 39-48.
106. AMPIÉ, Juan. Comportamiento clínico epidemiológico del cáncer de pene en pacientes del servicio de urología del HEALF HEODRA. Universidad Autónoma de Nicaragua, Facultad de Medicina. 2005.
107. GUZMÁN, José., *et al.* Virus del Papiloma humano en el hombre. Responsabilidad compartida. 2005. *Revista Mexicana de Urología*. Vol 65(N°6). México. pp 431-438.
108. FLORES, Roberto., *et al.* Reliability of sample collection and laboratory testing detection in men 2008. *Journal of Virological methods*. Vol 144 pp 136-143.
109. Rintala MAM, Poïllanen PP, Nikkanen VP, Gre´nman SE, Syrja¨nen SM. Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens. *J Infect Dis* **2002**; 185:1664–7.

110. Astori G, Pipan C, Muffato G, Botta GA. Detection of HPV-DNA in semen, urine and urethral samples by dot blot and PCR. *New Microbiol* **1995**; 18:143–9)
111. Aynaud O, Poveda JD, Huynh B, Guillemotonia A, Barrasso R. Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. *Int J STD AIDS* **2002**; 13:547–50.
112. Green J, Monteiro E, Bolton VN, Sanders P, Gibson PE. Detection of human papillomavirus DNA by PCR in semen from patients with and without penile warts. *Genitourin Med* **1991**; 67:207–10.
113. Inoue M, Nakazawa A, Fujita M, Tanizawa O. Human papillomavirus (HPV) type 16 in semen of partners of women with HPV infection. *Lancet* **1992**; 339:1114–5.
114. Kyo S, Inoue M, Koyama M, et al. Detection of high-risk human papillomavirus in the cervix and semen of sex partners. *J Infect Dis* **1994**; 170:682–5.
115. Lai YM, Lee JF, Huang HY, et al. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril* **1997**; 67:1152–5.
116. Olatunbosun O, Deneer H, Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol* **2001**; 97:357–60.
117. Tanaka H, Karube A, Kodama H, Fukuda J, Tanaka T. Mass screening for human papillomavirus type 16 infection in infertile couples. *J Reprod Med* **2000**; 45:907–11.
118. Fife KH, Coplan PM, Jansen KU, et al. Poor sensitivity of polymerase chain reaction assays of genital skin swabs and urine to detect HPV 6 and 11 DNA in men. *Sex Transm Dis* **2003**; 30:246–8.

119. Forslund O, Hansson BG, Rymark P, Bjerre B. Human papillomavirus DNA in urine samples compared with that in simultaneously collected urethra and cervix samples. *J Clin Microbiol* **1993**; 31:1975–9.
120. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, et al. High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican males: comparative study of penile-urethral swabs and urine samples. *Sex Transm Dis* **2001**; 28: 277–80.
121. MUÑOZ, Nubia, et al. HPV in the etiology of human cancer. 2006. *Science Direct*. Vaccine 24S3 S3/1–S3/10. USA. 10pp.
122. Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, et al. Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* 2003; 187: 1064 -70. mujeres.
123. Bleeker MCG, Hogewoning CJA, Berkhof J, et al. Concordance of specific human papillomavirus types in sex partners is more prevalent than would be expected by chance and is associated with increased viral loads. *Clin Infect Dis* **2005**; 41:612–20.
124. Koutsky LA, Kuypers J, et al. Genital human papillomavirus infection among male and female sex partners: prevalence and typespecific concordance. *J Infect Dis* **1995**; 171:429–32.)
125. Hippelainen MI, Yliskoski M, Syrjanen S, et al. Low concordance of genital human papillomavirus (HPV) lesions and viral types in HPVinfected women and their male sexual partners. *Sex Transm Dis* **1994**; 21:76–82.)
- 126.** SIERRA, Carlos H., *et al.* *Papilomavirus* y Factores asociados a Neoplasia Intraepitelial Cervical de Alto Grado en Cauca. 2006. Colombia.Rev. salud pública. Sup. Vol 8 (1):pp 47-58.

127. MUÑOZ, N., *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. 2003. *N Engl J Med*; Vol 348: pp 518-
128. CARRILLO, Adela., *et al.* Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. 2004. *Salud pública de México*. Vol 2; pp 9-16.
129. LAZCANO, Ponce., *et al.* Epidemiology of HPV infection among mexican with normal cervical citology. *International Journal Cancer*; 2001. Vol 91; pp412-420.
130. CONSUEGRA, Claudia, *et al.* El virus del papiloma humano (PVH), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. 2004. *Salud Uninorte Barranquilla* Vol 19. Colombia. p 3-13.
131. ARROYO, Bárbara., *et al.* Congreso de infecciones vaginales en pacientes con lesiones premalignas y malignas del cuello uterino, que asisten a la consulta de colposcopia de la maternidad rafael calvo en cartagena de indias 2007-2008.
132. SUÁREZ, A., *et al.* Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del Papiloma humano en muestras genitales. 2006. *Sociedad Española De Quimioterapia*. Vol. 19(Nº2); Madrid, España.
133. Krebs HB, Helmkamp BF. Does the treatment of genital condylomata in men decrease the treatment failure rate of cervical dysplasia in the female sexual partner? *Obstet Gynecol* **1990**; 76:660–3.
134. Krebs HB, Helmkamp BF. Treatment failure of genital condylomata acuminata in women: role of the male sexual partner. *Am J Obstet Gynecol* **1991**; 165:337–40.