

EXPRESION DE p53, KI 67, p16 Y p63 COMO FACTORES PREDICTIVOS DE METASTASIS GANGLIONAR EN
PACIENTES CON CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PENE

Universidad de Carabobo. Área de estudios de postgrado
Especialización en cirugía Oncológica



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESPECIALIZACION EN CIRUGIA ONCOLOGICA



EXPRESION DE p53, KI 67, p16 Y p63 COMO FACTORES PREDICTIVOS DE METASTASIS GANGLIONAR EN
PACIENTES CON CARCINOMA EPIDERMIOIDE DE PENE

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al grado de especialista en cirugía oncológica.

Autor: Dr. Valmy Goitia
Tutor: Dr. Humberto Pontillo

Valencia, 2015

INDICE

Introducción.....	3
Marco metodológico.....	14
Resultados.....	19
Discusión.....	32
Conclusión.....	35
Agradecimientos.....	37
Referencias.....	38

**EXPRESION DE p53, KI 67, p16 Y p63 COMO FACTORES PREDICTIVOS DE
METASTASIS GANGLIONAR EN PACIENTES CON CARCINOMA EPIDERMOIDE
DE PENE
INSTITUTO DE ONCOLOGIA “DR MIGUEL PEREZ CARREÑO”**

Autor: Dr. Valmy Goitia Tutor: Dr. Humberto Pontillo

RESUMEN

El carcinoma epidermoide de pene, está caracterizada por un crecimiento tumoral lento con frecuentes metástasis linfáticas a regiones inguinales. En la búsqueda de un factor que prediga el riesgo de metástasis a ganglios linfáticos, se determinó por inmunohistoquímica la expresión de p53, p63, p16 y Ki67 en el tumor primario y sus valores se relacionaron con la frecuencia de metástasis linfática. Se estudiaron 26 casos de carcinoma epidermoide de pene. Se prepararon las matrices de tejidos (*tissue arrays*, TMA) así como las técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados reportaron la mayor frecuencia entre los 41 a 59 años de edad, grado histológico II (46,15%), la profundidad de invasión T3 (50%), 73% de las biopsias definitivas reportaron ausencia de invasión angio-linfática, el estadio con mayor incidencia fue el III (50%), 11 casos (42%) presentaron metástasis ganglionar; por otro lado, el 75% de los grado histológico III, el 100% de los T4, el 86% de los p53 positivos presentaron metástasis ganglionar, 25 casos p63 resultaron positivos (100%), 67% de los p16 y el 50% de los casos con Ki67 <15%, presentó metástasis ganglionar positiva. El p53 en conjunto con los factores anatómo-patológicos podría ser de utilidad para establecer protocolos de tratamiento; el p16 y p63 impresiona no tener relación con las metástasis ganglionar, la inmunoexpresión débil del Ki67 impresiona podría aumentar el riesgo de metástasis ganglionar, aunque los resultados son controvertidos.

Palabras claves: carcinoma de pene, factores pronósticos, inmunohistoquímica.

**EXPRESSION OF P53, P63, P16 AND KI67 AS PREDICTIVE FACTORS NODE
METASTASIS IN PATIENTS WITH SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF PENIS
INSTITUTO DE ONCOLOGIA “DR MIGUEL PEREZ CARREÑO”**

Author: Dr. Valmy Goitia Tutor: Dr. Humberto Pontillo

ABSTRACT

Penile squamous cell carcinoma, is characterized by a slow tumor growth with frequent lymphatic metastases to inguinal regions. In finding a factor to predict the risk of lymph node metastases was determined by immunohistochemical expression of p53, p63, p16 and Ki67 in the primary tumor and values related to the frequency of lymphatic metastases. 26 cases of squamous cell carcinoma of the penis were studied. Tissue arrays (tissue arrays, TMA) and immunohistochemical techniques were prepared. The results reported most frequently between 41-59 years of age, histological grade II (46.15%), depth of invasion T3 (50%), 73% of the final biopsies reported absence of angio-lymphatic invasion, stadium was the third highest incidence (50%), 11 cases (42%) had lymph node metastasis; on the other hand, 75% of histological grade III, 100% of the T4, 86% had positive lymph node metastasis p53, p63 25 cases were positive (100%), 67% of p16, 50% cases with Ki67 <15%, had positive lymph node metastasis. The p53 in conjunction with the pathological factors may be helpful in establishing treatment protocols; p16 and p63 impresses unrelated to the lymph node metastasis , weak immune expression of Ki67 impresses could increase the risk of nodal metastases , although the results are controversial.

Keyword: penile carcinoma , prognosis factors, immunohistochemistry.

INTRODUCCION

El carcinoma epidermoide de pene (CE), se define como el proceso proliferativo y desordenado de las células epiteliales escamosas del pene¹.

El cáncer de pene es una enfermedad maligna poco frecuente; corresponde al 2% de las neoplasias del sistema genitourinario del hombre y su distribución a nivel mundial es muy variable; poco común en la mayoría de los países desarrollados, incluyendo Estados Unidos donde la tasa es menor de 1 por cada 100 mil hombres al año. En México durante el año 2003, se reportaron 346 casos, lo que representa una tasa de 0,91 por cada 100.000 hombres y 0,31% del total de las neoplasias malignas; la muerte ocurrió en 103 casos¹.

Por el contrario, en el mundo no occidental, la incidencia de cáncer de pene es mucho mayor, y puede suponer el 10-20% de las neoplasias malignas en el hombre, con una incidencia ajustada por la edad de 0,3-2/100.000 hombres en la India, de 8,3/100.000 hombres en Brasil².

En Venezuela, al igual que con muchas otras patologías de baja frecuencia, no existen datos estadísticos acerca de la incidencia y morbilidad de esta enfermedad.

El pene es un órgano recubierto por piel y la patología tumoral se desarrolla a partir de dicho epitelio, por lo tanto el 96% de los tumores son de estirpe epitelial (escamosos)³.

Los factores de riesgo más importantes son la edad, el tabaquismo, fimosis, mala higiene, Virus de Papiloma Humano (VPH), lesiones premalignas y neoplasias intraepiteliales de pene⁴.

El cáncer de pene es raro en las comunidades que practican la circuncisión en los recién nacidos o antes de la pubertad (judíos, musulmanes e ibos de Nigeria). La

circuncisión precoz reduce el riesgo de cáncer de pene en 3-5 veces; es un factor protector (44-90% de los pacientes con cáncer de pene presentan fimosis)⁵⁻⁷. La circuncisión en la edad adulta no protege frente al cáncer de pene^{6,7}.

Se presenta en hombres de aproximadamente 50 años de edad. Los antecedentes sexuales (múltiples parejas, edad joven de la primera relación sexual) y los antecedentes reconocidos del paciente de condilomas, se asocian a un aumento de riesgo. El tabaquismo también es un factor de riesgo. La Asociación Europea de Urología, excluye el esmegma como agente carcinógeno⁸.

De los cánceres del pene, el 95% de ellos son carcinomas epidermoide. Histológicamente, la lesión contiene una cantidad considerable de queratina, incremento en la actividad mitótica, hipercromatismo y núcleos elongados. Es una enfermedad de los adultos mayores, por ende es muy raro en jóvenes^{7,8}.

El melanoma maligno, las neoplasias mesenquimales y el carcinoma basocelular son mucho menos habituales. Se desconoce la frecuencia con que el CE se ve precedido de lesiones premalignas (cuerno cutáneo del pene, papulomatosis bowenoide y balanitis xerótica obliterante: liquen escleroso y atrófico)^{4,8-10}. Las neoplasias intraepiteliales de pene ó carcinoma in situ (*Ca in situ*), aumentan el riesgo de aparición de un CE hasta en un tercio de los casos, y dichas lesiones son la eritroplasia de Queyrat y/o la enfermedad de Bowen⁸.

Asimismo, pueden debutar estos pacientes con una adenopatía inguinal producto de reactividad inflamatoria o metástasis. Las adenopatías pueden ser, únicas, múltiples, libres o fijas, pueden formar conglomerados o afectar la piel; asimismo se pueden complicar con infecciones sobre-agregadas, con la presencia de necrosis, infección del

sitio tumoral y presencia de material purulento. En este caso, los pacientes pueden tener dolor local, fiebre, mal estado general, pérdida de peso y anorexia¹⁰.

Los factores pronósticos, son todos aquellos parámetros clínico-patológicos que nos ayuda a determinar el comportamiento biológico de una enfermedad, en este caso, el carcinoma epidermoide de pene. Los factores pronósticos, deben ser presentados en el reporte de anatomía patológica, y estos son: tipo histológico, patrón de crecimiento, grado de diferenciación, invasión linfoscavular y perineural, profundidad de invasión tumoral, márgenes de resección, y compromiso ganglionar.^{8,11-18}

Dichos factores pronósticos determinan el comportamiento tumoral, la probabilidad de metástasis regional y a distancia, el intervalo libre de enfermedad (ILE), y el índice de recaídas⁸.

Las vías de diseminación del cáncer de pene son por contigüidad, linfática y hematológica⁷. La diseminación linfática ocurre desde el prepucio a los ganglios inguinales superficiales y profundos. La diseminación desde el glante, cuerpo y uretra se dirige a los ganglios inguinales profundos e iliacos externos. La diseminación hematológica ocurre en menos del 10% de los casos. Afecta sobre todo los pulmones, hígado y hueso^{7,19}.

La muerte resulta del crecimiento local y ganglionar con colonización bacteriana, que conduce a sepsis y hemorragia⁷.

El carcinoma de pene, está asociado con ganglios inguinales palpables de un 35 a un 50 % de los pacientes en la presentación inicial, pero solo la mitad serán positivos en el examen histológico. Por otro lado, 20% de los pacientes con ganglios clínicamente negativos tendrán enfermedad metastásica subclínica¹⁵. Por lo tanto, el aumento de

tamaño moderado de ganglios linfáticos inguinales no fijos, puede no significar enfermedad metastásica; la tasa de falsos positivos ha sido reportada entre un 30 y 50%¹⁸.

Varios reportes han demostrado las ventajas terapéuticas de la linfadenectomía inmediata sobre la diferida^{16,17}. En pacientes con ganglios linfáticos no palpables, una completa estadificación quirúrgica puede ser realizada mediante la disección inguinal. Hay suficiente evidencia de que una temprana linfadenectomía en pacientes con nódulos no palpables pero positivos histológicamente, mejora significativamente la supervivencia cáncer específica^{20,21}.

La posibilidad estadística de micrometástasis puede ser estimada mediante la estratificación en grupos de riesgo; en un estudio, se reportó una supervivencia libre de enfermedad a 5 años de 93,4%, 89,7%, 30,9% y 0% para estadios ganglionares pN0 a pN3 respectivamente, y concluye, que la sobrevida es pobre en aquellos pacientes con más de 2 ganglios linfáticos metastásicos, recomendando evaluar protocolos de quimioterapia o de quimioterapia y cirugía en estos casos²⁰.

Otro estudio con 50 pacientes, demostró que no hay casos de enfermedad metastásica inguinal profunda sin infiltración de nódulos superficiales, así como tampoco enfermedad pélvica sin enfermedad inguinal, recomendando como procedimiento de elección la linfadenectomía inguinal superficial en pacientes con ganglios linfáticos clínicamente negativos y factores de alto riesgo²¹.

Los predictores patológicos de afección ganglionar pélvica son el número de ganglios inguinales afectados y la extensión extracapsular²², además la linfadenectomía pélvica puede ser practicada como un procedimiento secundario; la tasa de ganglios positivos

reportados es de 23% en casos con menos de 2 ganglios inguinales positivos y 56% con más de 3 ganglios inguinales positivos²³. Sin embargo, la linfadenectomía estándar está asociada con un 30 a 50% de incidencia de complicaciones mayores y además con un 3% de mortalidad¹⁷.

El riesgo de afectación ganglionar puede evaluarse mediante la profundidad de invasión del tumor (T) y grado histológico (G), entre otras características del tumor, siendo *Tis*: carcinoma *in situ*, *Ta*: carcinoma verrugoso no invasivo, *T1a*: invasión de tejido conjuntivo subepitelial sin invasión vascular-linfática, y no es pobremente diferenciado, *T1b*: invasión de tejido conjuntivo subepitelial con invasión vascular-linfática, ó pobremente diferenciado, *T2*: invasión de cuerpo esponjoso ó cavernoso, *T3*: invasión de la uretra y *T4*: invasión de estructuras adyacentes; *G1*: bien diferenciado, *G2*: moderadamente diferenciado y *G3*: *indiferenciado ó poco diferenciado*^{8,15}.

Existen manuales propedéuticos que buscan agrupar a los pacientes en grupos de riesgo para metástasis ganglionares, y de esta manera ofrecer un adecuado tratamiento local y regional solo en aquellos pacientes que estadísticamente se ha demostrado que lo ameritan, y que reciben un beneficio con un procedimiento que está relacionado con un alto índice de complicaciones, como lo es la linfadenectomía inguinal. Dichos grupos de riesgos están divididos de acuerdo a la profundidad de invasión y grado histológico tumoral; teniendo así:

1. Bajo riesgo: (PTis, PTa ó PT1G1); posibilidad de micrometástasis menor al 16,5%¹⁵.
2. Moderado riesgo: (PT1 a-b G2); posibilidad se ubica entre 13 y 29%^{9,15}.

3. Alto riesgo: (>PT2 ó G3); presencia de metástasis oculta varia de 68-73%^{9,15}.

La evaluación de la extensión regional se debe practicar mediante la palpación de las regiones inguinales, recordando que hasta un 50% de los ganglios palpables al momento del diagnóstico son reactivos y no metastásicos¹⁵, sin embargo, aquellas adenomegalias palpables que se presentan en pacientes de bajo o moderado riesgo para metástasis ganglionares, podrían ser evaluadas por punción aspiración con aguja fina (PAAF) con o sin guía ecográfica para establecer diagnóstico preciso, ya que aquéllos que se encuentran en el grupo de alto riesgo tienen indicación precisa de linfadenectomía con ó sin ganglios palpables por la alta posibilidad de micrometástasis^{8,15,17}.

Un diagnóstico histológico exacto y la estadificación del tumor primario y ganglios linfáticos regionales, son necesarios para adoptar una conducta terapéutica adecuada. El tumor primario y los ganglios linfáticos regionales suelen tratarse por separado. La estadificación correcta es crucial para un tratamiento preciso, en los casos de bajo riesgo, tumores *Ta*, *Tis* y *T1*, hay que considerar el tratamiento conservador, donde la glandectomía y la escisión local amplia son las cirugías estándar con mayor grado de recomendación. Aunque la cirugía conservadora mejora la calidad de vida, el riesgo de recidiva local es mayor que el observado con cirugía ablativa 27% vs 5%. La glandectomía más fimosectomía depara la tasa de recidivas más baja entre las modalidades de tratamiento conservador de las lesiones pequeñas del pene⁹. En cuanto a las categorías *T1G3*, ó *>T2*: De acuerdo con la extensión del tumor, la amputación parcial ó total y la emasculación pueden considerarse terapéuticas

estándar; en caso de falectomía total o emasculación se debe confeccionar un meato ó uretostomía perineal. Como alternativa se puede optar por un tratamiento más conservador en pacientes rigurosamente seleccionados cuyos tumores involucran menos de la mitad del glánde o para aquéllos en quienes el seguimiento puede realizarse de cerca^{8,15}.

El gen p53, es un gen supresor que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 banda 13, y codifica una proteína nuclear. La función del p53 en estado normal es la de regulación del ciclo celular ante un daño del ADN, por lo que se le ha denominado "guardián del genoma". Cuando el ADN se daña, el p53 se acumula en el núcleo, y es capaz de detener el ciclo celular en G1 (*check point*) antes que se duplique el ADN e iniciar su reparación. El p53 va a inducir la síntesis de proteínas inhibidoras de los complejos ciclina dependiente de kinasas (ciclina-CDKs), bloqueando el ciclo celular. Si se repara la lesión el ciclo continúa, pero si no se repara se induce la apoptosis de la célula mediante la expresión de genes como bax. La alteración de la proteína p53 produce inestabilidad genómica, siendo las células incapaces de evitar la proliferación o activar la apoptosis, cuando está comprometida la integridad del ADN, de manera que son capaces de acumular las mutaciones para completar la carcinogénesis²⁴.

La proteína p63, pertenece a la familia de genes supresores tumorales. Esta proteína tiene la capacidad de actuar como factor de transcripción regulando la progresión del ciclo celular, manteniendo la capacidad proliferativa, o induciendo apoptosis, en función del estímulo ambiental recibido por la célula. Se encuentra principalmente en la capa basal del epitelio escamoso estratificado y del epitelio de transición^{24,25}.

El p63, se expresa intensamente en el núcleo de células basales de epidermis, cuello uterino, vagina, urotelio, mucosa bronquial, glándulas prostáticas, y células mioepiteliales de glándulas seromucinosas; por lo que se expresa en carcinomas de células escamosas de piel, cérvix, pulmón, y en el carcinoma papilar de tiroides^{24,25}.

La expresión del ki67 está relacionada con la tasa de proliferación celular, usado con mayor frecuencia para estudio de los tumores sólidos y algunos hematológicos malignos²⁶.

Se ha demostrado la correlación entre los niveles de ki67 y el grado histopatológico de los tumores, así como con la progresión de la enfermedad. Durante la interfase, el gen puede ser detectado exclusivamente dentro del núcleo, por lo que durante la mitosis la mayoría de la proteína está ubicada en la superficie de los cromosomas. El hecho de que el ki67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G_1 , S, G_2 , y la mitosis) y ausente durante el reposo celular (G_0), hace de esta proteína un excelente marcador para determinar lo que se conoce como fracción de crecimiento de una población celular específica²⁶.

El p16 ó inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A), es una proteína supresora de tumores codificada en humanos por el gen CDKN2A¹⁻³. El p16 tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular. Las mutaciones en p16 aumentan el riesgo de desarrollar diversos cánceres, especialmente melanomas²⁶.

Este producto génico funciona como un estabilizador de la proteína supresora de tumores p53 cuando interacciona y secuestra a Mdm2, una proteína responsable de la degradación de p53⁴. A pesar de las diferencias estructurales y funcionales, las isoformas inhibidoras de CDK y el producto génico alternativo de este gen, por medio

de sus papeles como reguladores de CDK4 y p53 en la progresión del ciclo celular, comparten una funcionalidad común en el control de la fase G1 del ciclo celular. Este gen se encuentra frecuentemente mutado o deletado en una amplia variedad de tumores, y es conocido por ser un importante gen supresor de tumores²⁶.

El aumento de la expresión de p16 cuando un organismo envejece, reduce la proliferación de células madre. Esta reducción en la división y producción de células madre ejerce de protección contra el cáncer mientras incrementa los riesgos asociados con la senescencia celular^{25,26}.

Existen pocos trabajos acerca del estudio por inmunohistoquímica de expresión de factores que predigan la afectación ganglionar metastásica en pacientes con carcinoma de pene como lo son el ki67, p53, p16 y p63; el p63 ha sido ampliamente estudiado en carcinoma de cuello uterino, laringe, entre otros, mas no en carcinomas de pene. Sin embargo y a efectos de la relación con este trabajo se pueden destacar los siguientes estudios:

En junio 2013, fue publicado en *The Journal Urology* un estudio realizado por Ferrandiz Pulido C. y cols., que llevó como título “Vía de señalización mTOR en Carcinoma espinocelular de pene: sobre-expresión de mTOR, p16 y p53 se correlacionan con comportamiento agresivo del tumor”; en el Hospital Vall d'Hebron de la Universidad Autónoma de Barcelona, España; con una muestra de 67 pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pene invasor entre 1987 y 2010. Los resultados de este estudio fueron que la sobreexpresión de pmTOR, p16 y p53 se asoció significativamente con enfermedad ganglionar linfática. El p16 y p53 también se correlacionaron con mal pronóstico, incluyendo recurrencia, metástasis y muerte

enfermedad específica. El pmTOR y la expresión de p53 intensa se asoció con tumores VPH negativo y concluyeron que la activación de la vía de señalización mTOR puede contribuir a la progresión del carcinoma de células escamosas del pene y el comportamiento agresivo.

Otro estudio fue el realizado por C. Protzel, J. Knoedel, U. Zimmermann, y cols., del Departamento de Urología de *Ernst Moritz Arndt University of Greifswald*, Alemania; publicado en el 2007, titulado “Expresión del marcador de proliferación Ki67 y su correlación con el subtipos histológicos, pronóstico, presencia de metástasis, y detección de VPH en el ADN en carcinomas de pene”.; estudiaron a 28 pacientes, encontrando que en 4 de 28 pacientes presentaron una débil expresión de Ki67 (menor a 15% de núcleos positivos), sin mostrar metástasis en los ganglios linfáticos; 17 pacientes reportaron un índice Ki67 intermedio (15-60% de núcleos positivos), 8 de los cuales presentaron metástasis, y 7 siete pacientes restantes presentaron fuerte expresión de Ki67 (mayor a 60% de núcleos positivos), todos ellos con metástasis ganglionar; y concluyen que la expresión de Ki67 en carcinoma de células escamosa de pene tiene un impacto significativo en la predicción de metástasis en los ganglios linfáticos por lo que puede ayudar a identificar a los pacientes con alto riesgo de metástasis.

En julio del 2007, fue publicado en la Revista *Urology* de Estados Unidos, un estudio el cual llevó como título “Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y MIB1/Ki67, tienen valor pronóstico en el carcinoma epidermoide de pene?”, realizado por Gustavo Cardoso Guimarães, Marcos Lima de Oliveira Lea y cols.; cuyo objetivo fue el evaluar el papel del PCNA y MIB1/Ki67 para predecir la metástasis a ganglios linfáticos y la

supervivencia en el carcinoma epidermoide de pene en 125 pacientes; los resultados fueron en el análisis univariante, la baja expresión MIB-1/Ki67, la presencia de permeación linfovascular, ganglios linfáticos clínicamente positivos, profundidad del tumor mayor de 5 mm, y la infiltración de los cuerpos cavernosos se correlacionaron con metástasis en los ganglios linfáticos.

La conclusión del trabajo fue que se observó una correlación entre la expresión inmunohistoquímica de PCNA y MIB1/Ki-67, y la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos.

En el 2002, Martins A C., y cols., realizaron un trabajo que estudió la expresión de p53 y Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), en carcinoma epidermoide de pene, en 50 pacientes; y concluyen que el PCNA no tuvo valor pronóstico para la progresión de la enfermedad; por otro lado, la expresión de p53 se asoció con progresión tumoral y muerte causa específica, por lo que tal vez debería ser evaluado en la estadificación y la planificación terapéutica para los pacientes con carcinoma epidermoide de pene.

“Virus de papiloma humano (VPH) y expresión inmunohistoquímica de p16 como predictores de comportamiento en carcinoma epidermoide de pene”; evaluaron la expresión de p16 y VPH con las características clínico-patológicas y el comportamiento en pacientes con carcinoma epidermoide de pene. Los análisis de los resultados, demostraron que ni la infección por el VPH, ni la expresión de p16 predijeron significativamente la supervivencia global o la supervivencia específica del cáncer.

Los genes p16 y p63 han sido ampliamente estudiados en carcinomas de cuello uterino, laringe, entre otros; sin embargo, no se encontraron estudios del gen p63 en carcinoma epidermoide de pene.

El carcinoma epidermoide de pene, es una enfermedad agresiva, de comportamiento metastásico ganglionar incierto, debido a que el 50% de los pacientes al momento del diagnóstico presenta adenopatías clínicamente palpables, siendo el 25% negativos en el examen histológico definitivo¹⁵; por otro lado, el 20% de los pacientes con ganglios clínicamente negativos al examen físico y estudios de imágenes presentan enfermedad metastásica subclínica, describiendo la bibliografía hasta un 50% de falsos positivos al examen físico¹⁸.

De este modo, la investigación presenta relevancia desde el punto de vista de la especialidad, en vista de que intenta determinar si la expresión por inmunohistoquímica de p53, p63, p16 y Ki67, son de utilidad para predecir la probabilidad de metástasis ganglionar; y en conjunto con los factores clínicos-patológicos, podrían ayudar a la toma de decisiones acerca del vaciamiento ganglionar regional terapéutico en pacientes con enfermedad ganglionar subclínica y/o en casos de alto riesgo en los que se podría evitar el vaciamiento profiláctico, procedimiento que no está exento de morbilidad y/o mortalidad.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la expresión de p53, p63, p16 y Ki67 como factores predictivos de metástasis ganglionar.

Objetivos Específicos

1. Determinar la frecuencia de carcinoma epidermoide de pene.
2. Clasificar la frecuencia de carcinomas epidermoides de pene según los factores clínico-patológicos (edad, grado histológico, profundidad de invasión tumoral, invasión angiolinfática y estadio).
3. Verificar la frecuencia de metástasis a ganglios linfáticos.
4. Determinar la expresión de p53, p63, p16 y Ki67, en la biopsia del tumor primario.
5. Relacionar los resultados de expresión de p53, p63, p16 y Ki67, con la incidencia de metástasis a ganglios linfáticos.

MARCO METODOLÓGICO

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, retrospectivo, en pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pene tratado en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”, en el periodo comprendido desde enero del 2000 hasta agosto 2013, conforme a la disponibilidad de las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos, en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto.

Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide invasor de pene tratados en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”.
2. Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.
3. Disponibilidad de las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos, en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto.

Criterios de exclusión

Todo paciente que no cumpla con los criterios de inclusión.

Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó en pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de pene y en seguimiento en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia (Venezuela). Se analizaron las variables clínico-patológicas recogidas (edad, profundidad de invasión tumoral, invasión angiolinfática, grado histológico, metástasis linfática y el estadio), la expresión por inmunohistoquímica de 4

genes (p53, p63, p16 y Ki67) y se relacionaron los resultados de la expresión genética con la frecuencia de metástasis ganglionar.

Desde enero del año 2000 hasta agosto 2013 se trataron en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia (Venezuela) 66 pacientes con carcinoma epidermoide de pene. De éstos, fueron seleccionados para el estudio los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. Se seleccionaron inicialmente 28 pacientes. Tras realizar las matrices de tejidos, se descartaron 2 casos, por no presentar suficiente tejido tumoral para el estudio; quedando la serie constituida definitivamente por un total de 26 casos.

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética y de la Comisión de Investigación del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”.

De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina, para más adelante tomar muestra del tumor y preparar las matrices de tejido, lo cual fue realizado en el servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”.

Las matrices de tejidos (*tissue arrays*, TMA) así como las técnicas de inmunohistoquímica, fueron realizadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte, y en el Centro de Investigaciones Medicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC) de Valencia, Estado Carabobo. Para realizar los TMA se prepararon los bloques receptores o bloques únicamente de parafina, de un tamaño aproximado de 5x4 cms. La serie completa de

bloques donantes se dividió en grupos de 4 bloques. En cada tumor se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido (donante). Se estableció el orden de estos bloques en una plantilla que sirvió después para su lectura en el microscopio.

El procedimiento consta de dos agujas de distintos calibre con las que se realiza el troquelado de los bloques. Con la aguja de mayor calibre se extrae un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes. Con la aguja de menor calibre se obtiene el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que se introduce en el bloque receptor. Para asegurar la zona elegida a estudio se realiza un duplicado de la plantilla en el mismo bloque, obteniéndose así dos cilindros de 1 mm de diámetro de cada caso (Figura 1).

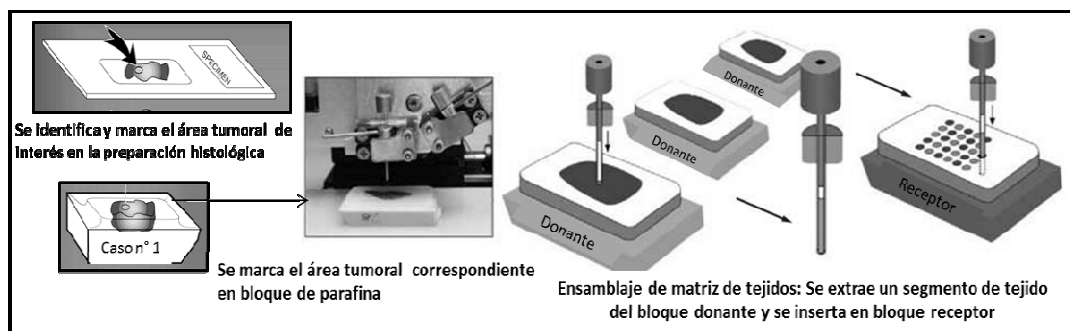


Figura 1. Representación esquemática de la construcción de matrices de tejidos.

Una vez terminado el proceso de troquelado, se introdujo el nuevo bloque en la estufa a una temperatura de 45° durante 5 minutos, para que la parafina de los cilindros y del bloque receptor se amolde y la superficie se alise.

Los cortes de los bloques se realizaron de 4 μ m en un micrótopo de rotación (Microm HM350S) en cristales tratados para evitar el desprendimiento de los cortes y se introdujeron durante 30 minutos a 65° en estufa para secarlos. Inicialmente se construyeron 2 bloques (1 con 17 casos y uno con 11 casos) y luego se construyó uno adicional con casos sin celularidad neoplásica representativa en las dos muestras obtenidas previamente del caso. Dos casos tuvieron que ser desechados por no presentar suficiente tejido tumoral, por lo que finalmente se analizaron 26 tumores de los 28 casos inicialmente incluidos en el estudio.

Cada cilindro de los TMA fue analizado en dos ocasiones y los datos recogidos se anotaron en tablas diseñadas para tal fin. Se consideró como valor definitivo el promedio de las observaciones.

En este sentido, para la mayoría de los marcadores se consideró positivo cualquier tipo de inmunoexpresión, refiriendo el resultado como positivo o negativo a efectos del análisis estadístico. Para la cuantificación de Ki67 (índice de proliferación), se tomaron cuatro microfotografías de cada caso, dos de cada cilindro, en un microscopio Zeiss Axiostar plus, con cámara Canon incorporada y conectada a ordenador con el programa Axiovision.

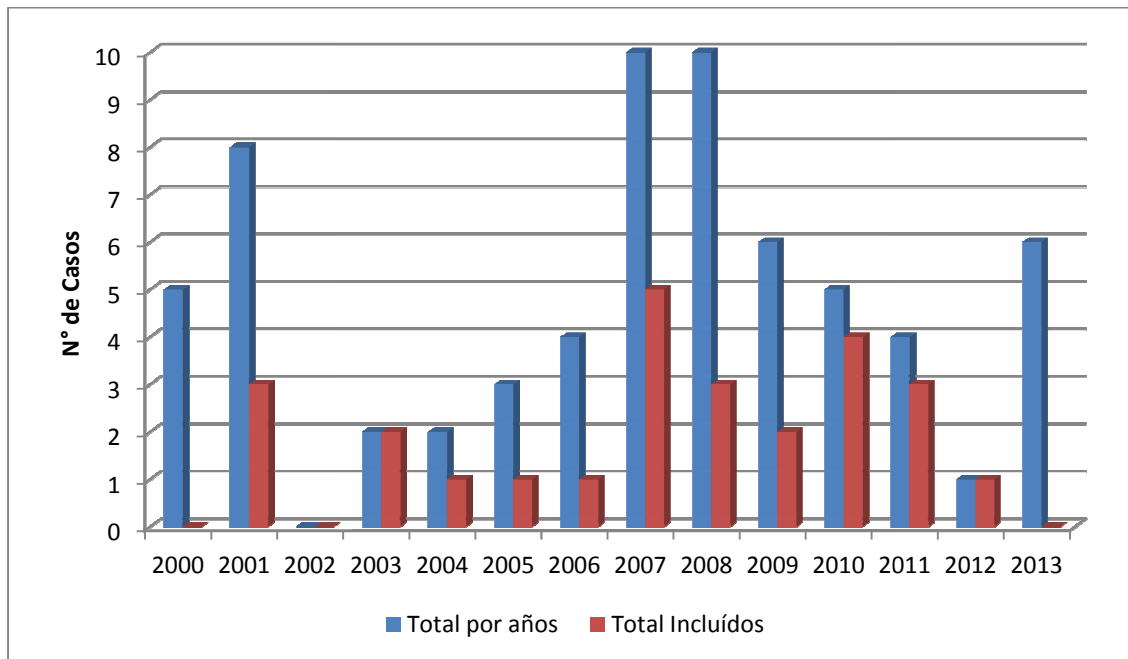
Luego se contaron los núcleos positivos y negativos en cada imagen utilizando el programa Bronce, elaborado por el ingeniero Víctor Barrios de la Universidad de Carabobo. Finalmente se sumaron las cifras de los cuatro contajes y se obtuvo el índice de proliferación como promedio del porcentaje de positividad para cada caso.

El índice de proliferación (Ki67) se interpretó de igual manera como fue interpretado en el trabajo de C. Protzel, J. Knoedel, U. Zimmermann, y cols., descrito anteriormente :

1. Débil: porcentaje de núcleos positivos de las células tumorales $<15\%$.
2. Moderado: porcentaje de núcleos positivos de las células tumorales $>15\%$ y $<60\%$.
3. Fuerte: porcentaje de núcleos positivos de las células tumorales $>60\%$.

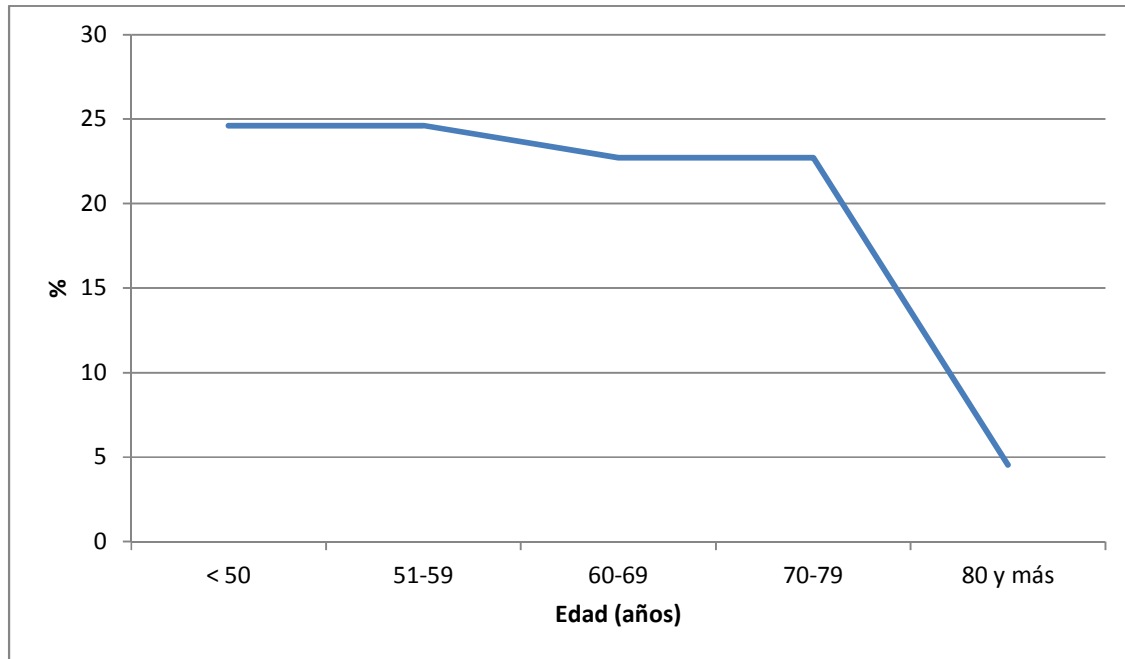
RESULTADOS

Gráfico 1. Distribución según total casuística de pacientes con carcinoma epidermoide de pene



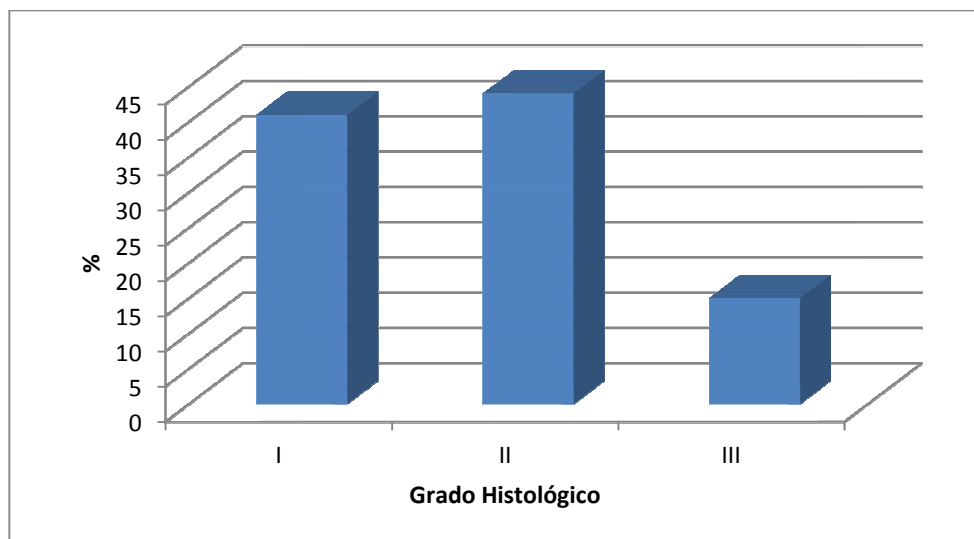
Se identificaron un total de 66 pacientes, de los cuales 26 cumplieron con los criterios de inclusión. Los años con mayor frecuencia de casos fue 2007 y 2008 con 10 casos cada uno.

Gráfico 2. Distribución según edad de pacientes



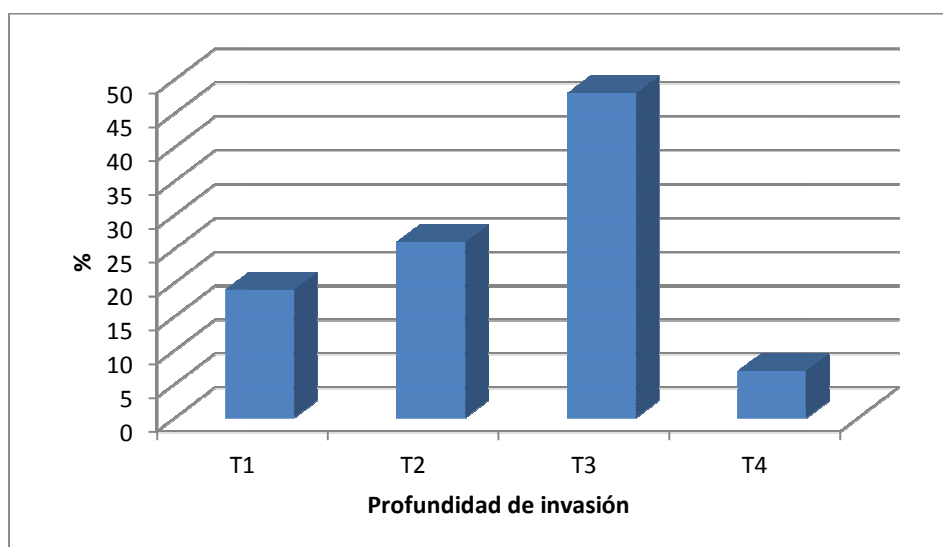
El rango de edad de los pacientes en total fue de 38 a 81 años; el mayor número de casos se presentó entre la década de 41-50^a y 51-59^a, con 16 casos cada uno (24,61%).

Gráfico 3. Distribución según grado histológico



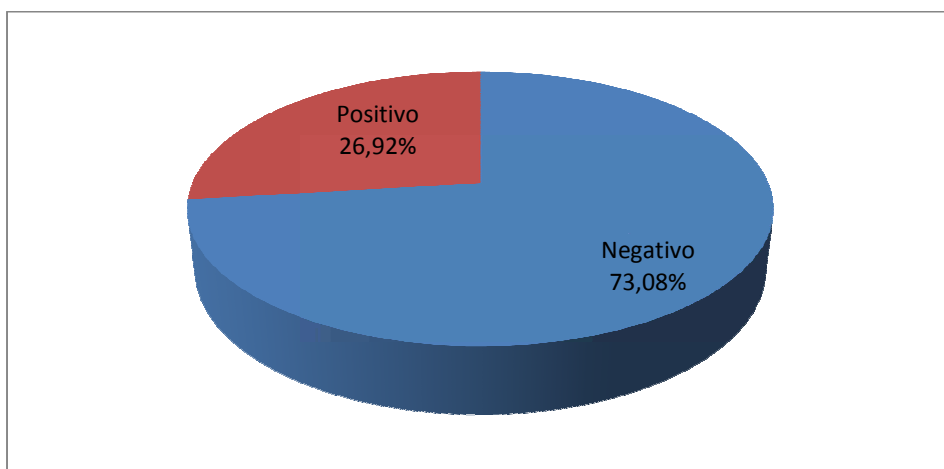
En el siguiente grafico en relación al grado histológico, se observa que de los 26 casos en total, el 46,15% (12 casos) correspondieron al grado histológico II.

Gráfico 4. Distribución según la profundidad de invasión



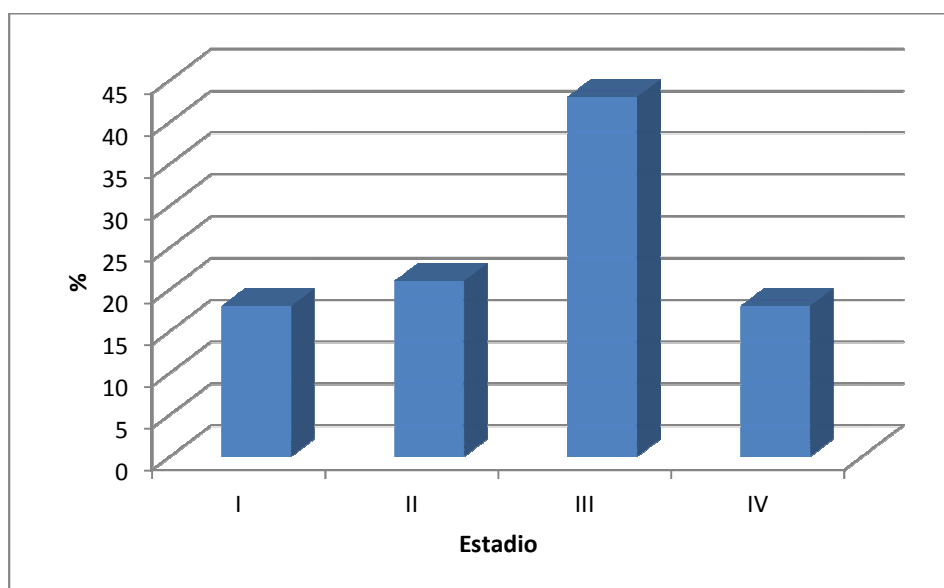
Atendiendo a los resultados del gráfico anterior en relación a la profundidad de invasión tumoral según el TNM de la AJCC, la mayor frecuencia de casos se presentaron con tumores T3 con 13 (50%), seguidos del T2 con 7 casos (26,92%).

Gráfico 5. Distribución según frecuencia de invasión angiolinfática



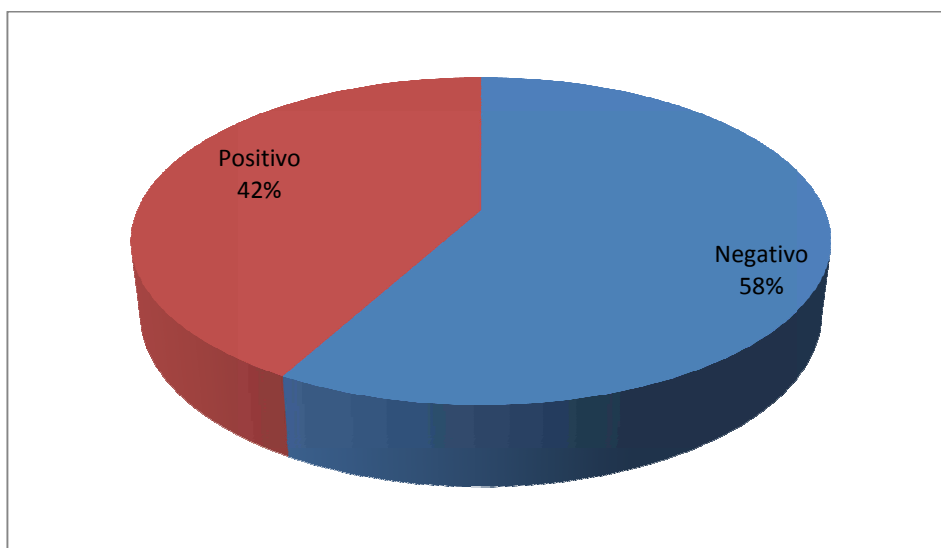
Atendiendo a los resultados del gráfico anterior, se observa que en el mayor número de los casos 19 (73,08%) la biopsia definitiva reportó la ausencia de invasión angiolinfática.

Gráfico 6. Distribución según estadio



En cuanto al estadio, se observa que el de mayor frecuencia fue el III con 13 casos (50%).

Gráfico 7. Distribución según frecuencia de metástasis ganglionar



Atendiendo a los resultados del gráfico anterior, se evidencia que en el 42% (11 casos), se confirmó la presencia de metástasis ganglionar.

Cuadro 1. Relación del grado histológico y metástasis a ganglios linfáticos.

Grado Histológico	METASTASIS A GANGLIOS					
	POSITIVA		NEGATIVA		T O T A L	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
I	2	20	8	80	10	100
II	7	58	5	42	12	100
III	3	75	1	25	4	100
TOTAL	12	46	14	54	26	100.0

Chi²: 4.80 p: 0.09.

Atendiendo a los resultados del cuadro anterior, se observa como 2 de los 10 casos (20%) con grado histológico I, 7 de los 12 casos grado histológico II (58%) y 3 de 4 casos con grado histológico III (75%) presentaron metástasis ganglionar positiva.

Cuadro 2. Relación de la profundidad de invasión del tumor (T) y la metástasis a ganglios linfáticos.

Invasión	METASTASIS A GANGLIOS					
	POSITIVA		NEGATIVA		T O T A L	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
T1	0	0.0	4	100	4	100
T2	3	43.0	4	57.0	7	100
T3	7	53.0	6	47.0	13	100
T4	2	100.0	0	0.0	2	100
TOTAL	12		14		26	100.0
Chi²: 6.10 p: 0.10						

En cuanto a la relación de la profundidad de invasión del tumor (T según TNM) y la metástasis ganglionar, los hallazgos más relevantes fueron que el 100% de los casos T1 (4) no presentó metástasis ganglionar, y el 100% de los T4 (2 casos) presentaron metástasis ganglionar.

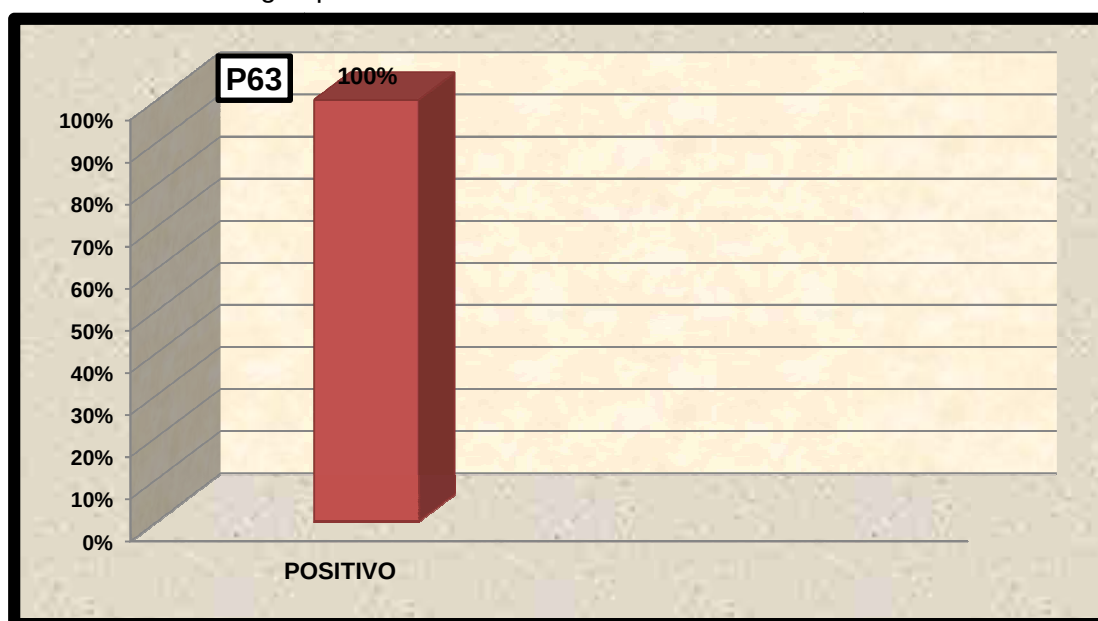
Cuadro 3. Relación de los resultados de p53 con la incidencia de metástasis a ganglios linfáticos.

p53	METASTASIS A GANGLIOS				T O T A L	
	POSITIVA		NEGATIVA			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativo	6	33	12	67	18	100
Positivo	6	86	1	14	7	100
TOTAL	12		13		25	

Chi²: 6.45 p: 0.04 (s) * 1 p53 CAIDO.

En el siguiente cuadro se puede ver como el total de casos que presentaron p53 positivo fue de 7, de los cuales 6 (86%) presentó metástasis ganglionar, mientras que el total de casos p53 negativos fue 18, de los cuales 12 (67%) no presentaron metástasis ganglionar.

Grafico 8. Distribución según p63



Atendiendo a los resultados del gráfico anterior en relación al p63, se observa que 25 casos resultaron positivos (100%).

Cuadro 4. Relación de los resultados de p16 con la frecuencia de metástasis a ganglios linfáticos.

p16	METASTASIS A GANGLIOS					
	POSITIVA		NEGATIVA		T O T A L	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativo	8	42	11	58	19	100
Positivo	4	67	2	33	6	100
TOTAL	12		13		25	

Chi²: 1.10 p: 0.29 *1 P16 CAIDO.

En cuanto a los resultados del cuadro anterior, se observa que el total de casos p16 positivo fue 6, de los cuales 4 (67%) presentó metástasis ganglionar, mientras que el total de casos p16 negativo fue 19; 8 de ellos (42%) con metástasis ganglionar.

Cuadro 5. Relación de Ki67 con la frecuencia de metástasis a ganglios linfáticos.

Ki67	METASTASIS A GANGLIOS					
	POSITIVA		NEGATIVA		T O T A L	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 15%	7	50	7	50	14	100
15-60%	4	36	7	64	11	100
>60%	0	0	0	0	0	0
TOTAL	11		14		25	
Chi²: 1.07 p: 0.30. *1 Ki67 CAIDO						

En cuanto a los resultados del cuadro anterior en relación al Ki67, los 14 casos con Ki67 <15%, 50% (7) presentó metástasis ganglionar positiva, mientras que el total de casos Ki67>15 y <60% fue de 11, de los cuales 4 (36%) mostraron metástasis ganglionar positiva, no se presentaron casos con Ki67 mayor a 60%.

DISCUSIÓN

La realización de este trabajo permitió conocer la alta incidencia de pacientes con carcinoma epidermoide de pene que acuden a la institución, siendo este un centro de referencia a nivel centro-occidental, teniendo un total de 66 casos en 13 años. Lamentablemente no se cuenta con estadísticas actualizadas a nivel regional y nacional, que permitan tener un conocimiento más amplio y exacto de la incidencia y morbi-mortalidad en el país; en Norteamérica y Europa se describe una incidencia de 1/100.000¹, siendo más frecuente en países en vías de desarrollo, llegando a ser hasta de 8,3/100.000 en Brasil².

El carcinoma epidermoide de pene se presenta en hombres de aproximadamente 50 años de edad⁸. En base a la distribución de pacientes según grupo etario en este estudio, se observó una mayor frecuencia entre los 41 a 59 años; y el rango de edad fue de los 38 a 81 años, con una edad media de 59 años.

Protzel, C., y cols.; en su estudio en el 2007, en un grupo de pacientes similar al nuestro, tuvo una edad media de 69,4 años con un rango entre los 35 y 89 años²⁶.

En el 2004, fue publicada en la revista peruana de urología, un trabajo realizado por Pow-San M. y cols.; titulado: Carcinoma epidermoide de pene: Estudio retrospectivo en pacientes sometidos a disección ilioinguinocrural bilateral; trabajo realizado entre junio de 1953 hasta julio 2001 y que contó con 170 pacientes, siendo el T con mayor frecuencia encontrado el T2 en 86 casos (54%), T3 en 25 casos (16%), T1 con 27 casos (17%) y por último el T4; 100 casos (63%) fueron clasificados como bien diferenciados; 45 (28%), moderadamente diferenciados; y 8 (5%) tumores no pudieron ser clasificados de acuerdo al grado; 68 pacientes no presentaron adenopatía palpable y de 91 pacientes con ganglios palpables, 66 (72%) tuvieron metástasis ganglionar²⁸.

En el año 2009 fue publicado un trabajo realizado por Di Capua Sacoto C., y cols.; en Valencia, España, titulado "cáncer de pene. Nuestra experiencia en 15 años", y en la cual estudiaron un total de 47 casos encontrando que la mayoría de los pacientes presentaron un estadio clínico localizado: T1N0M0 23%, T2N0M0 27%²⁹.

Según la bibliografía¹⁹, aproximadamente 50% de los casos de carcinoma epidermoide son bien diferenciados ó Grado 1, 30% de ellos son moderadamente diferenciados o Grado 2 y 20% son pobremente diferenciados, indiferenciados o Grado 3.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de los factores anatómo-patológicos, se puede evidenciar como el 46,15% (12 casos) correspondieron al grado histológico II, la profundidad de invasión (T) con mayor frecuencia fue el T3 con 13 casos (50%), 73,08% la biopsia definitiva reportó ausencia de invasión angiolinfática, el 42% (11 casos) confirmó la presencia de metástasis ganglionar y el estadio con mayor frecuencia fue el III con 13 casos (50%). Cuando se compara este estudio, con los reportados por otros autores^{19,28,29}, se evidencia la mayor frecuencia de tumores localmente avanzados que acuden a nuestro centro, estadios mayores, similar porcentaje de tumores bien y/o moderadamente diferenciados, y menor frecuencia de metástasis ganglionar.

Expresión de p53, p63, p16 y ki67 con la frecuencia de metástasis a ganglios linfáticos.

En cuanto a los resultados de expresión de p53 y frecuencia de metástasis ganglionar, se determinó que el 86% de los p53 positivos presentó metástasis ganglionar, mientras que el 67% de los casos p53 negativos no presentaron metástasis ganglionar; correspondiéndose con los resultados y conclusiones reportados en los trabajos de Ferrandiz Pulido C., y cols³⁰ donde sus resultados les permitió asociar la sobreexpresión del p53 con enfermedad ganglionar linfática, mal pronóstico, aumento de la recurrencia/metástasis y muerte enfermedad específica. En otro estudio en los cuales obtuvieron resultados muy similares proponen que tal vez el p53 debería ser evaluado en la estadificación y la planificación terapéutica para los pacientes con carcinoma epidermoide de pene³¹.

En cuanto al p63 y p16 impresiona no tener relación con el riesgo de metástasis ganglionar, y los mismos no pudieron ser comparados con estudios similares ya que no fue posible encontrar antecedentes bibliográficos publicados, sin embargo, existen trabajos donde se determina la relación del p16 con la presencia de VPH de alto riesgo, y el p63 en carcinoma de cuello uterino.

Romus I., y cols.; en su trabajo en el 2013, no encuentra relación de la expresión del p63 en mujeres con carcinoma de cuello uterino, con la edad, ni con el estadio³².

Tang DH.; y cols.; encontraron que la sobreexpresión del p16 está asociado con el VPH de alto riesgo, pero no encontraron relación con el estadio, grado histológico, invasión angiolinfática, ni metástasis a ganglios linfáticos³³.

Varios autores^{26,27}, aseguran que la expresión de Ki67 en carcinoma de células escamosas de pene, tiene un impacto significativo en la predicción de metástasis a ganglios linfáticos, por lo que puede ayudar a identificar a los pacientes con alto riesgo de metástasis.

Sin embargo, en nuestro trabajo se observa que del total de casos estudiados, 14 casos presentaron Ki67 con inmunexpresión débil (<15%), de los cuales 7 (50%) presentó metástasis ganglionar positiva, mientras que los casos con inmunexpresión moderada (>15 y <60%) fue de 11, de los cuales 4 (36%) mostraron metástasis ganglionar positiva, no se presentaron casos con Ki67 mayor a 60%; estos resultados al igual que el trabajo de Gustavo Cardoso Guimarães, Marcos Lima de Oliveira Lea, parece demostrar que la baja expresión de este marcador pudiese estar relacionado con el riesgo a producir metástasis ganglionar³⁴.

CONCLUSIONES

1. Se encontró un universo de 66 pacientes en 13 años en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”.

2. La frecuencia de carcinoma de pene aumenta a partir de los 40 años; y los parámetros anatómo-patológicos siguen siendo los factores pronósticos más importantes. Con respecto al estadio, la mayoría de los casos que acuden a este centro son casos avanzados, estadios III y IV superando estos el 65% de los casos en total.

3. El porcentaje de pacientes con metástasis a ganglios linfáticos que acuden a este centro oncológico de referencia es alto, mayor al 40% de los casos en total, evidenciando así, la necesidad de realizar un estudio/diagnóstico preciso acerca de la enfermedad ganglionar inguino-pelvica y permita realizar tratamiento adecuado, en el momento adecuado.

4. Al determinar la expresión de p53, p63, p16 y Ki67, en la biopsia del tumor primario en pacientes con carcinoma epidermoide de pene, se llegó a la conclusión que la utilidad de los mismos para esta patología puede ser muy variable de acuerdo al parámetro a investigar, y amerita la realización de estudios con mayor cantidad de casos y tiempo de investigación que permita ampliar estos conocimientos.

5. Al correlacionar los resultados de la expresión de p53, p63, p16 y Ki67 con la frecuencia de metástasis a ganglios linfáticos, se observó que el p53 es el factor con mayor utilidad pronóstica para el riesgo de metástasis ganglionar en el cáncer de pene; aportando su positividad hasta un 86% de probabilidad de presentar enfermedad en región inguino-pelvica y su negatividad demostró hasta un 67% de posibilidad de que la enfermedad este confinada al órgano, y este, en conjunto con los factores anatómo-patológicos podrían ser utilizados para establecer protocolos de tratamiento. Con respecto al Ki67, impresiona que una baja expresión está relacionada con mayor frecuencia de metástasis a ganglios linfáticos; sin embargo, los resultados son controvertidos, con respecto a otros estudios y amerita estudios más amplios con mayores números de casos; el p63 y p16 demostraron no tener utilidad en este trabajo

como factor pronóstico para determinar el riesgo de enfermedad ganglionar metastásica.

Agradecimientos

Ante todo a Dios, por darme las herramientas para permitirme cumplir cada una de las metas propuestas.

A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional; Papa este trabajo y título es para ti.

A mi esposa Marian por ser más que mi pareja, mi mano derecha, cómplice, amiga y fuerza para poder seguir adelante en los momentos difíciles.

A los pacientes del Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño, a pesar de sus pesares, sin ellos no estaríamos aquí.

Al personal del servicio de anatomía patológica de la Institución, en especial a Lisbeth por su grandiosa ayuda.

Un agradecimiento especial al Dr. Aldo Reigosa y Dr. Eduardo Caleiras, (CIMBUC y servicio de anatomía patológica del Hospital Metropolitano del Norte), por toda la orientación y colaboración prestada, sin ellos este trabajo hubiese sido imposible de realizar.

Al tutor de este trabajo, Dr. Humberto Pontillo, por sus innumerables orientaciones.

A mis compañeros de postgrado, adjuntos y demás personal del hospital, por estos 3 años de convivencia, trabajo y aprendizaje.

REFERENCIAS

1. American Cancer Society. Cáncer facts and figures 2010 disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>
2. Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, Giuliano AR. Cancer. Urol Oncol 2007 25:361-367.
3. Gregoire L, Cubilla AL, Reuter V, Haas GP, Lancaster WD. Preferential asociation of human papillomavirus with high grade histological variants of penile invasive squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1995; 87:1705-1709.
4. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Krieger JN. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. Int J Cancer 2005; 116:606-616.
5. Jackson SM. The treatment of carcinoma of the penis. Br J Surg 1966; 53:33.
6. Koenen M, McCurdy S. Circumcision and the risk of cancer of the penis: a lifeable analysis. Am J Dis Child 1980; 134:484.
7. Granados M, Herrera A, Manual de Oncología, 4ta edición, Cáncer de Pene, 62:873-880.
8. Pizzocaro G, Algaba F, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, Watkin N, Horenblas S. Guía clínica sobre el cáncer de pene. Asociación Europea de Urología disponible en: <http://www.aeu.es/UserFiles/files/05-guia%20clinica%20cancer%20pene.pdf>
9. Van Howe RS, Hodges FM. The carcinogenicity of smegma: debunking a myth. Eur Acad Dermatol Venereol 2006; 20:1046-1054.
10. Nordenvall C, Chang ET, Adami HO, Ye W. Cancer risk among patients with condylomata acuminata. Int J Cancer 2006; 119:888-893.
11. Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, Chechile G, Algaba F, Palou J. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. Eur Urol 1997; 32:442-447.
12. Agrawal A, Pai D, Ananthakrishnan N. The histological extent of the local spread of carcinoma of the penis and its therapeutic implications. BJU Int 2000; 85:299-301.
13. Cubilla AL. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. World J Urol 2009; 27:169-177.
14. Chaux A, Reuter V, Lezcano G, Velasquez EF, Torras J, Cubilla AL, Comparison of morphologic features and outcome of resected recurrent and non recurrent squamous cell carcinoma of the penis. A study of 81 cases. Am J Surg Pathol 2009; 33:1299-1306.

15. Solsona E, Algaba F, Horenblas S, Asociación Europea de Urología 2004; 46(1):1-8 disponible en: <http://www.aeu.es/UserFiles/files/05-guia%20clinica%20cancer%20pene.pdf>
16. Lopes A, Hidalgo G, Kowalski L. Prognostic factor in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputations and lymphadenectomy. J Urol 1996; 156:1637-1642
17. Pizzocaro G, Guarneri A. Lymph node dissections in squamous cell carcinoma of the penis, Journal of Andrological Sciences 2009. 16:7-12.
18. Scardino E, Villa G, Bonomo G, Magnetic resonance imaging combined with artificial erection for local staging of penile cancer. Urology 2004; 63:1158-1162.
19. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology 6th edition, Section 34.5, 1062:68
20. Marconnet L, Rigaud J, Bouchot O, Long-term followup of penile carcinoma with high risk for lymph node invasion treated with inguinal lymphadenectomy. J Urol 2010; 183:2227-2232
21. Pompeo A. Extended lymphadenectomy in penile cancer. Can J Urol 2005; 12:30-36.
22. Lont A, Kroon B, Galle M. Pelvic lymph node dissections for penile carcinoma: extent of inguinal lymph node involvement and survival. J Urol 2007; 177:947-952.
23. Ornellas A, Seixas A, Marota A, Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. J Urol 1994; 151:1244-1250.
24. Biocancer research journal Gen p53 2012 disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/597/32-gen-p53>
25. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown Journal of cellular physiology 2000; 182:311-322.
26. HGNC:HGNC:1787 Entrez Gene: CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A 2015 disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029>
27. C. Protzel J, Knoedel U, Zimmermann C, Woenckhaus M, Poetsch and J Giebel. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. Histol Histopathol 2007; 22:1197-1204
28. Pow-Sang M, Benavente V, Morante CM, Meza LF, Destéfano V. Carcinoma epidermoide de pene: Estudio retrospectivo en pacientes sometidos a disección ilioinguinocrural bilateral. Revista Peruana de Urología 2004; 14:12-15
29. Di Capua SC, Sátor LM, Gonzalo Morales SG, Alba AB, José L. Pontones JL, Jiménez JF. Cancer of the penis. Our experience in 15 years. Actas Urol Esp 2009; 33:143-148
30. Ferrandiz PC, Masferrer E, Toll A, Hernandez LJ, Mojal S, Pujol RM, Ramon Y Cajal S, de Torres I, Garcia PV. mTOR Signaling Pathway in Penile Squamous Cell Carcinoma: pmTOR

and p63 Over Expression Correlate with Aggressive Tumor Behavior. J Urol 2013; 6:2288-2295

31. Martins AC, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci S. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. J Urol 2002; 1:89-92

32. Romus I, Triningsih FE, Mangunsudirdjo S, Harijadi A. Clinicopathology significance of p53 and p63 expression in Indonesian cervical squamous cell carcinomas. Asian Pac J Cancer Prev. 2013; 12:7737-7741.

33. Tang DH, Clark PE, Giannico G, Hameed O, Chang SS, Gellert LL. 25 *Lack of P16ink4a over expression in penile squamous cell carcinoma is associated with recurrence after lymph node dissection* en su trabajo. J Urol 2015; 2:519-525

34. Guimarães GC, Leal ML, Campos RS, Zequi SC, Fonseca FP, Cunha IW, Soares FA, Lopes A. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? Urology 2007; 1:137-142