



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

FRECUENCIA DEL PAPILOMA VIRUS HUMANO EN PACIENTES CON CÁNCER  
DE PENE EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS  
POR PCR-RFLP DURANTE 2020

**Línea de investigación:**

**Biología celular y molecular**

Trabajo académico para optar el Título de Segunda Especialidad en  
Genética y Biología Molecular

**Autor:**

Mejía Farro, Juan Roberto

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

Mayanga Herrera, Ana Lucía  
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel  
Saenz Flores, Gloria María

**Lima - Perú**

**2022**

**Referencia:**

Mejía, J. (2022). *Frecuencia del Papiloma Virus Humano en pacientes con cáncer de pene en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas por PCR-RFLP durante 2020*. [Trabajo académico de segunda especialidad, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5917>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerrectorado de  
**INVESTIGACION**

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

FRECUENCIA DEL PAPILOMA VIRUS HUMANO EN PACIENTES CON CÁNCER DE  
PENE EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS POR  
PCR-RFLP DURANTE 2020

Línea de Investigación:

Biología Celular y Molecular

Trabajo académico para optar el Título de Segunda Especialidad en Genética y Biología  
Molecular

**Autor:**

Mejía Farro, Juan Roberto

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurados:**

Mayanga Herrera, Ana Lucía  
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel  
Saenz Flores, Gloria María

Lima – Perú  
2022

A mis Padres Ricardo y Rosa:

Mi gratitud y Amor eterno

A Laura, mi compañera de toda la vida,

A Mis hijas Belen y Johanna por su apoyo y comprensión

Al Dr. Luis Meza Montoya,

Por ser el impulsor y gestor para que el presente trabajo de investigación sea una realidad

## Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Descripción del problema .....</b>	<b>9</b>
<b>I.2 Antecedentes .....</b>	<b>10</b>
<b>I.3 Objetivos .....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivo General.....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>I.4 Justificación .....</b>	<b>18</b>
<b>I.5 Impactos esperados del Trabajo Académico .....</b>	<b>19</b>
<b>II METODOLOGÍA .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1 Población de estudio.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2 Material biológico.....</b>	<b>20</b>
<b>II.3 Extracción y cuantificación de ADN.....</b>	<b>22</b>
<b>II.4 PCR.....</b>	<b>22</b>
<b>II.5 Electroforesis en gel de agarosa.....</b>	<b>23</b>
<b>II.6 Genotipificación: PCR – RFLP.....</b>	<b>24</b>
<b>II.7 Análisis estadístico de correlación.....</b>	<b>27</b>
<b>III RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>IV CONCLUSIONES .....</b>	<b>321</b>
<b>V RECOMENDACIONES .....</b>	<b>332</b>
<b>VI REFERENCIAS.....</b>	<b>343</b>
<b>VII ANEXOS .....</b>	<b>376</b>
<b>Anexo A: Imágenes de diferentes casos de muestras en estudio .....</b>	<b>376</b>
<b>Anexo B: Protocolo de extracción de ADN a partir de biopsias frescas.....</b>	<b>38</b>
<b>Anexo C: Protocolo de PCR para detección de PVH (MY09/MY11).....</b>	<b>39</b>
<b>Anexo D: Protocolo de PCR para amplificación del gen beta globina humana...40</b>	<b>40</b>
<b>Anexo E: Protocolo de PCR-RFLP con AFA I .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexo F: Protocolo de nested PCR para detección de PVH (GP5//GP6).....</b>	<b>42</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:Microfotografía del PVH .....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2:Genoma del PVH-16.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 3:Diversas manifestaciones de cáncer de pene .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4:Tumor de Pene.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 5:Tumor de Pene.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6:Ganglios inguinales.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 7:Ganglios pelvicos .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 8:Caso positivo PVH-16 .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 9:Caso positivo PVH-11 .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 10:Caso positivo PVH-31 .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 11:Caso con infección multiple a PVH-16 y PVH-31 .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 12:Caso positivo con GP5/GP6 .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 13:Tumor de pene fijado en formol .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 14:Ganglios inguinales fijados en formol .....</b>	<b>376</b>
<b>Figura 15: Tumor de pene incluido en parafina.....</b>	<b>36</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:Secuencias de primers para detección de PVH .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 2:Secuencias de primers para detección del gen Beta globina humana .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 3:Mapa de restricción para PVH .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 4:Resultados según tipos de PVH .....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 5:Resultados según tipo de muestras .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 6.Tabla cruzada cáncer de pene-tipos de PVH.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 7. Pruebas de Chi-cuadrado y de Fisher.....</b>	<b>30</b>

## Resumen

El cáncer de pene es una enfermedad neoplásica rara en países occidentales, y se presenta con mayor incidencia en países en desarrollo como Brasil, Colombia, Paraguay y Perú. La infección por Papiloma Virus Humano (PVH) aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pene por los genotipos 16 y 18. Mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando Cp-MY09/MY11, podemos detectar infección por PVH. A los casos detectados positivos por PVH, el producto amplificado es sometido a PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), y con una enzima de restricción AFA I, genotificamos 6 tipos de PVH: 6, 11, 16, 18, 31, y 33, siendo estos los más frecuentes a nivel mundial. En los casos que fueron detección negativa por PVH, se realizó una nested PCR usando primers internos GP5/GP6; dando una mayor sensibilidad a la metodología.

**Palabras claves.** Virus del papiloma humano, cáncer de pene, reacción en cadena de la polimerasa



## Abstract

Cancer of the penis is a rare neoplastic disease in Western countries, it occurs with a higher incidence in developing countries such as Brazil, Colombia, Paraguay and Peru. Human Papillomavirus (HPV) infection increases the risk of developing penile cancer due to genotypes 16 and 18. Using polymerase chain reaction (PCR), with CP- MY09/MY11 infection HPV detection. In cases detected positive for HPV, the amplified product is subjected to PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), and with an Afa I restriction enzyme, we genotype 6 types of HPV: 6, 11, 16, 18, 31, and 33, these being the most frequent worldwide. In cases that were negative for HPV detection, a nested PCR was performed using internal primers GP5/GP6; giving greater sensitivity to the methodology.

**Keys work:** human papilloma virus, penis cancer, polymerase chain reaction

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pene es una enfermedad neoplásica rara en países occidentales, se presenta con mayor incidencia en países en desarrollo como Brasil, Colombia, Paraguay y Perú. El cáncer de pene es hoy por hoy una entidad infrecuente que de manera alarmante ha iniciado un pico de ascenso en cuanto a su incidencia en los últimos 10 años. En la actualidad hay pocos estudios que investigan la relación de infección por PVH en los pacientes con cáncer de pene en el Perú.

### 1.1 Descripción del problema

La infección por PVH aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pene por los genotipos 16 y 18, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando primer MY09/MY11 podemos detectar infección por PVH. A los casos detectados positivos por PVH, el producto amplificado es sometido a PCR - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y con una enzima de restricción: AFA I, genotificamos 6 tipos de PVH: 6, 11, 16, 18, 31 y 33, siendo estos los más frecuentes a nivel mundial.

Su incidencia puede ser mayor en algunos países llegando hasta 10% de las neoplasias malignas en el hombre, por ejemplo, en la India presentan una incidencia de 0.7-3.0 por 100,000 habitantes, en Brasil 8.3 por 100,000 habitantes, y con mayor proporción en Uganda, con registros superiores a 12 por 100,000 habitantes. En Europa, la incidencia es de 0.1 a 0.9 por 100,000 habitantes y en los EEUU desde 0.7 hasta 0.9 por 100,000 habitantes. En algunas zonas de Asia, África y América del Sur, la incidencia es significativamente mayor en 19 por 100,000 habitantes. (Moya, 2016).

En el Perú la tasa de incidencia estandarizada por edad a nivel mundial es de 1.5 por 100,000 habitantes. (Globocan., 2018)

El cáncer de pene puede estar asociado con la infección por el virus del papiloma humano, especialmente por los genotipos 16 y 18, observándose entre 45 a 80% de los casos. (Meza, 2017). En el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), el cáncer de pene representa el 1.13 hombres/ 100,000 hombres de las neoplasias malignas urológicas, datos proporcionados por el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana - 2012 (Neoplásicas, 2014). Sin embargo, no se conoce si estos casos se deben a infecciones por PVH. Por lo tanto, el presente trabajo académico de tipo análisis plantea la siguiente pregunta ¿Cuál es la frecuencia del papiloma virus humano en pacientes con cáncer de pene en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas por PCR-RFLP durante el año 2020?

## 1.2 Antecedentes

Se estudió el PVH mediante PCR en un fragmento de la región L1 con primers de consenso (MY09/MY11), cuyo producto es de 450 pares de bases (pb) y posteriormente con RFLP. La enzima utilizada para genotipificar PVH es producida por el microorganismo *Acidophyllum facilis* (AFA I), la cual reconoce una secuencia específica: 5'GT/AC3' y 3'CA/TG5'; y la corta, según el tamaño de bandas podemos discriminar en PVH de alto o bajo riesgo. (Hans-Ulrich, 1994).

En 1999, se señaló que la elevada prevalencia de PVH en lesiones genitales a nivel mundial, motiva el estudio y correlación del PVH de alto riesgo con neoplasia de pene. Los PVH son virus epitelio-mucotrópicos, asociados a lesiones en mucosas y epitelios en humanos. Se estudiaron PVH en biopsias de pene empleando otros métodos moleculares como Dot blot, Southern blot e hibridación in situ, siendo la PCR la metodología de más alta sensibilidad. (Guerrero, 1999).

Posteriormente Rubín y sus colaboradores detectaron que, la falta de circuncisión neonatal es considerada el factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pene, por lo tanto, la

relación causal nunca fue establecida. Los resultados demostraron la asociación entre infección por PVH y desarrollo de cáncer de pene. El PVH -16 fue el tipo viral más común identificado en esta neoplasia. (Rubin, 2001).

Se indicó que el carcinoma de pene es un tumor que aparece en población adulta con un pico de incidencia alrededor de la sexta década de vida. Estos carcinomas son más frecuentes en hombres no circuncidados, pacientes con fimosis, y en varones con múltiples parejas sexuales. La infección por PVH juega un rol importante en el desarrollo de carcinoma de pene, está asociado con la expresión de las proteínas E6 y E7 que interactúan con las funciones de p53 y pRB respectivamente. Se emplearon dos diferentes juegos de primers para detectar ADN -PHV en carcinoma de pene. Los primers MY09/MY11 que amplifican un fragmento de 450 pb de la región L1 del genoma del PVH y los primers GP5/GP6 que amplifican un fragmento de 150 pb también de la región L1. (Pascual, 2007)

Se halló que la prevalencia de infección por PVH en cáncer de pene es similar a lo encontrado en cáncer de vulva. En Brasil, pocos estudios son reportados de infección por PVH y cáncer de pene. En el grupo de Mc. Cance se demostró que con el método Southern Blot se detectó el 49% para PVH, mientras que en el grupo de Bezerra se reportó una prevalencia del 30.5% de PVH en muestras de tejido parafinado usando PCR. (Scheiner, 2008)

También se demostró que PCR es todavía considerada el “Gold standard” para diagnóstico de PVH. Una variación llamada nested- PCR con primers MY09/MY11 y GP5/GP6, son métodos específicos con alta sensibilidad para detección de ADN viral, ambos primers dirigidos a la región conservada L1 del genoma de PVH, el porcentaje aumenta en un 20.3%, estos resultados sugieren que es una alternativa para la detección temprana de mujeres con alto riesgo para desarrollar cáncer cervical. (Entiasupe, 2013)

Así mismo, se cataloga al hombre como el vector silencioso del virus, ya que a pesar de jugar un papel importante en la transmisión del PVH, solo 1% de ellos experimenta algún signo o síntoma clínico. Las proteínas E6 y E7 son las encargadas de immortalizar a la célula hospedera y del proceso carcinogénico, siendo notoria la frecuencia del tipo viral 16, prevalente en todo el mundo. Se evidencia que, a mayor edad, disminuye la prevalencia de infección por PVH, esto debido a la “limpieza” que realiza el sistema inmune y que elimina sistemáticamente los tipos virales, así como a las células infectadas. El PVH es resistente al calor y a la desecación, por tanto, la infección mediante vías no sexuales, como a través del intercambio de ropa es posible. Además, este virus se encuentra en toda la zona genital incluyendo escroto, labios mayores, cuerpo del pene, glande, etc., en consecuencia, el uso de condón no prevendría totalmente la infección por PVH. Por muchos años la infección de PVH en el hombre fue considerada como un problema menor y de escasa relevancia catalogándolo como el vector silencioso del virus. Sin embargo, aquellos individuos positivos solamente para PVH-X -sin determinar- fueron considerados como infectados por un único genotipo. En los últimos años se ha demostrado que la infección por PVH en el hombre puede causarle diversas patologías, así como también en sus parejas sexuales. (Silva, 2013).

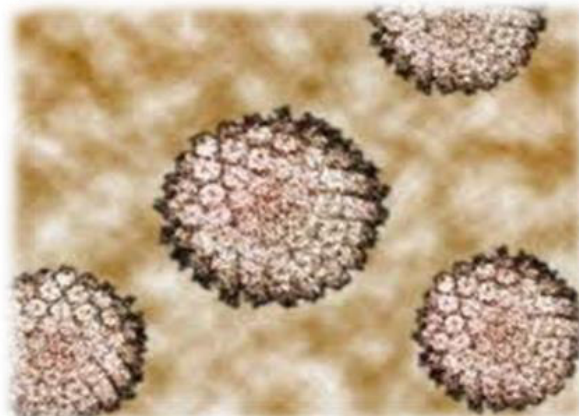
Astudillo y sus colaboradores estimaron que el PVH es la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente a nivel mundial, afectando a hombre y mujeres por igual. El empleo de pruebas moleculares es importante para el diagnóstico temprano de cáncer cervical. Estos métodos moleculares se basan en la amplificación del genoma de PVH por medio de PCR, utilizada por su gran sensibilidad y especificidad, capaz de detectar entre 10 y 200 copias de genoma viral, para luego utilizar otro método que permita diferenciar, ya sea PVH de alto o bajo riesgo. En la actualidad, más de 200 tipos de PVH han sido identificados, los cuales tienen tropismo por el epitelio y la mucosa de la región ano-genital. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido a los PVH- 16 y PVH -18 como agentes cancerígenos para los

humanos. El PVH pertenece a la familia Papillomaviridae, posee un ADN circular de doble hebra con 8,000 pb, no posee envoltura, su cápside icosaédrica está compuesta por 72 capsómeros, el genoma del PVH contiene ocho marcos de lectura abierta (ORF), su ADN se divide en tres regiones: una región control (LCR), una región temprana E (early) y una región tardía L (late). (Astudillo, 2014)

Otros investigadores señalaron que el PVH está implicado en un número de enfermedades malignas, incluyendo cáncer de pene, ano y oro-faringe. La prevalencia de PVH es alta en mujeres sexualmente activas, entre los 18 a 24 años y luego disminuye hasta la mitad de la edad, después permanece estable por el resto de la vida, mientras que la prevalencia de PVH en hombres sugiere que las mujeres tienen repuesta inmune con una fuerte protección a PVH a la conversión seropositiva. Una posible explicación para esta diferencia es que cuando el epitelio queratinizado es infectado con PVH, esta es menos apropiada para inducir respuesta inmune que en el epitelio mucoso (este tipo de tejido es comúnmente infectado en mujeres). La infección por PVH-16 tiene larga duración y es eliminado en un promedio de 12 meses. Se estima que entre 60% a 100% de lesiones de pene son positivo a la presencia de ADN-PVH. Esta enfermedad afecta comúnmente a hombres de 50 a 70 años. El cáncer de pene invasivo es raro y cuenta con menos de 0.5% de todos los canceres en hombre a nivel mundial. (Flaherty, 2014)

## Figura 1

### *Microfotografía del PVH*



Se evaluó la prevalencia de ADN-PVH y su correlación entre peneoscopia con pruebas aceto-blanca con el resultado de PCR para el diagnóstico de PVH. Se estudiaron 75 muestras de pacientes, con un promedio de edad de 32.5 años. El estudio de PCR para PVH fue positivo en el 84% de los casos, la infección por PVH fue más frecuente y la tasa de infección encontrada por PCR fue mayor a la expresada por la prueba acetoblanca, por lo que muchos tienen infección subclínica. (Alvarez, 2014)

En Europa (Djajadiningrat, 2014) encontró que la incidencia de cáncer de pene va en aumento, esto sugirió la explicación debido a cambios en las prácticas sexuales y a una mayor exposición de hombres con PVH de alto riesgo. Se evaluó por PCR con primer GP5/GP6 encontrándose que PVH -16 fue el tipo viral más predominante. La presencia de PVH de alto riesgo en cáncer de pene confiere una ventaja de supervivencia.

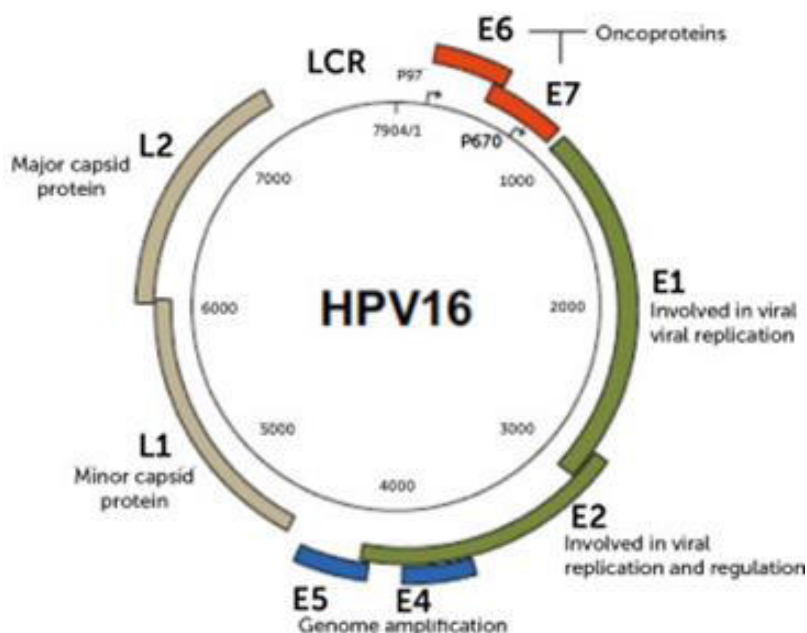
Otros estudios demostraron que, en el cáncer de cérvix, la carcinogénesis involucra a PVH de alto riesgo, cuya infección produce enfermedad de transmisión sexual más frecuente en países subdesarrollados. Los hombres participan en su trasmisión, sin embargo, la detección es difícil debido a ausencia de lesiones siendo escasos los estudios que enfocan su atención en este aspecto. Esto conduce a que en la mayoría de los casos los hombres sean portadores

subclínicos, con lesiones que solo se evidencian mediante peneoscopia, posterior a la aplicación de ácido acético, como lesiones aceto-blancas, las cuales han sido asociadas a infección por PVH. En la mayoría de los casos, el hombre no manifiesta lesiones clínicas ni subclínicas asociadas a PVH, la infección podría ser transitoria con probabilidades de que en el momento del muestreo no exista evidencia de presencia del virus debido a que la infección pudo ser eliminada. (Benedetti, 2015)

En Sudamérica, específicamente en el Perú, el Dr. Sullcahuaman y sus colaboradores desarrollaron diversos métodos de tamizaje para infección por PVH, donde el estudio molecular mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), permitió detectar hasta una molécula de ADN de PVH en 100,000 células, por lo que es considerada la técnica más sensible para detección de PVH. (Sullcahuaman, 2015)

**Figura 2**

*Genoma del PVH -16*



También se señala que el cáncer de pene es una enfermedad devastadora, con diagnóstico tardío, provocando alteraciones en la imagen corporal y autoestima, afectando



funciones sexuales y urinarios que comprometen la calidad de vida. Como tratamiento se usan los rayos X para eliminar células cancerosas. Si el tumor es pequeño, este tratamiento se puede emplear en lugar de la cirugía. También puede usarse la cirugía para tratar ganglios linfáticos cercanos o para ayudar a tratar los síntomas de cánceres más avanzados. Los efectos secundarios más comunes de la radiación son los cambios en la piel donde fue administrada, ardor al orinar, hinchazón del pene, fibrosis, etc. (Sánchez, 2016)

Otros estudios indicaron que en la actualidad la PCR es el método más sensible para la detección del PVH, por lo que existen diferentes protocolos para detectar genotipos de PVH, que utilizan partidores genéricos que reconocen secuencias específicas del genoma viral. Entre ellos destaca el uso de los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6; y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP). La mayoría de laboratorios han incorporado la amplificación de un control interno, por ejemplo, el gen de la beta globina que se utiliza en cada ensayo de PCR como un indicador para detectar la inhibición potencial y/o integridad de la muestra. (Li, 2016)

En el 2016, Aranda demostró que el tumor de pene es un cáncer epidermoide raro y poco frecuente, entre los factores de riesgo consideran fimosis, higiene deficiente y tabaquismo. Así mismo la infección por PVH en hombres puede conducir al desarrollo de condiloma acuminado ano-genital, cáncer de pene, ano y buco-faríngeo. La mayoría de las infecciones por PVH en los hombres son asintomáticas y no se manifiestan, en algunos casos su detección solo es posible cuando se utilizan técnicas de diagnóstico molecular; siendo la duración de la infección por PVH en los hombres más corta que en las mujeres, lo cual sugiere la eliminación del virus más eficaz, con lapsos de resolución de un año. En consecuencia, se considera que el PVH 16 de alto riesgo, es el que se detecta con mayor frecuencia. Se ha documentado que en las infecciones por PVH de reciente detección, el cuerpo del pene es el lugar donde se encuentra la mayor cantidad de ADN viral. Los PVH de alto riesgo 16 y 18 se asocian a enfermedad

neoplásica, en tanto que los tipos 6 y 11 están relacionados con el desarrollo de verrugas (Aranda, 2016).

Se hallaron que los tipos PVH-16 y PVH- 18 son los genotipos más frecuentes asociados a cáncer cervical, vulva, de pene y ano. Hay dos ciclos para la replicación viral: la infección lítica, donde el virus llega a las células parabasales con capacidad de replicación, se introduce en el citoplasma y luego al núcleo. Y la infección lisogénica, donde se ve afectado el genoma celular, en el caso de PVH 16 y 18. Al alcanzar el núcleo celular, el virus se integra al genoma de la célula huésped con los oncogenes E6 y E7, se expresan genes virales provocando de 20-100 copias extra-cromosómicas de ADN viral/célula, permaneciendo estable a través del curso de la infección. En el hombre se ha utilizado esta técnica de PCR y sus variaciones, ésta permite detectar hasta 3,9 copias de ADN viral al comienzo de la reacción. (Vásquez, 2017)

En el INEN, el Dr. Meza concluyó que, el cáncer de pene puede estar asociado con la infección por PVH16 y 18 observándose entre un 45 a 80% de los casos, también por fimosis, mala higiene personal, múltiples parejas sexuales, tabaco, infección por VIH-SIDA. Siendo el compromiso ganglionar el factor pronóstico de sobrevida más importante para el paciente, esto obliga a realizar cirugías de resección ganglionar a nivel inguinal y/o pélvico. (Meza, 2017)

### Figura 3

*Diversas manifestaciones de cáncer de pene*



### **1.3 Objetivos**

#### **Objetivo General**

- Estimar la frecuencia de infección por PVH, en pacientes con cáncer de pene en el INEN mediante PCR-RFLP durante el 2020.

#### **Objetivos Específicos**

- Determinar si existe una correlación significativa entre la presencia de cáncer de pene e infección por PVH en nuestros pacientes urológicos.
- Determinar los genotipos de PVH involucrados en esta neoplasia maligna.

### **1.4 Justificación**

Por muchos años la infección por PVH en el hombre fue considerada como un problema menor y de escasa relevancia catalogándolo como el vector silencioso de este virus; en vista que la mortalidad por cáncer cervical se ha incrementado en los últimos años -según el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2012, es que se hace necesario realizar más estudios moleculares que permitan confirmar la correlación entre la infección por PVH y cáncer de pene en nuestro medio. Por ser el INEN el centro referencial especializado donde los pacientes oncológicos llegan de todo el país, puede considerarse éste, como una muestra significativa referente del Perú. Actualmente en el país, se cuenta con pocos estudios de investigación realizados sobre este tema. Se espera que, con los resultados del presente trabajo de investigación se enriquezcan más los conocimientos sobre el cáncer de pene y su relación con PVH, así como también en el tratamiento oportuno para nuestros pacientes.

## **1.5 Impactos esperados del Trabajo Académico**

El diagnóstico de cáncer de pene es clínico y la biopsia es necesariamente antes de ofrecer un tratamiento definitivo. Mediante la prueba molecular como la PCR, por su alta sensibilidad, y especificidad, podemos detectar y genotipificar el PVH en este tipo de neoplasia maligna urológica. El cáncer de pene puede ser controlado hasta en el 80% de los casos cuando la lesión está confinada en el pene, pero tiene un pobre pronóstico una vez que se desarrollan las metástasis a nivel inguinal o pélvico. Uno de los mejores métodos para reducir la infección por PVH es la vacunación. En el 2009 la OMS, aprobó la vacuna tetravalente para varones de 9-13 años y consta de dos dosis, y en el año 2016 la vacuna nonavalente en el grupo de 14-37 años y consta de tres dosis. Aunque la asociación con PVH sugiere que, el uso de inmunoterapia representa una terapia promisoriosa.

## II METODOLOGÍA

### 2.1 Población de estudio.

Nuestra población de estudio fueron 62 pacientes con diagnóstico de cáncer de pene ingresado al Departamento de Urología del INEN. El rango de edad fue de 30-80 años, con un promedio de 55 años.

### 2.2 Material biológico.

El tipo de muestra fueron biopsias de tumor de pene de los pacientes con diagnóstico clínico de cáncer de pene, así como ganglios pélvicos o inguinales que estuvieron comprometidos por la neoplasia. Las muestras fueron recolectadas en crio-viales y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

**Figura 4**

*Tumor de pene*



**Figura 5***Tumor de pene***Figura 6***Ganglios inguinales***Figura 7***Ganglios pélvicos*

### 2.3 Extracción y cuantificación de ADN.

Se realizó la extracción de ADN de las biopsias y ganglios según el protocolo del kit, mediante un sistema de columnas (High pure-Roche), posteriormente se continuó con la cuantificación para conocer la concentración del ADN extraído, mediante fluorometría por Qubit (Invitrogen), estos procedimientos se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del INEN. Los ADN extraídos fueron almacenados en su criobox respectivo a -20°C (ver protocolo de extracción de ADN a partir de biopsia).

### 2.4 PCR.

Se realizó la PCR convencional, empleando primers consenso MY09/MY11 del gen L1 común de todos los PVH, como también primer del gen de la beta globina humana, que nos sirve para ver la integridad del ADN y la viabilidad de los reactivos de PCR. Se realizaron 2 Master Mix (CP-PVH y Gen de Beta globina humana) (Ver protocolo de PCR) y se le adicionó el ADN correspondiente para cada uno de los casos. Se corrieron juntos con las muestras, un control positivo a PVH y un blanco. Se colocaron todos los tubos de reacción en el termociclador, en el programa de amplificación establecida, con un tiempo aproximado de 1 hora con 30 minutos (ver programa de amplificación)

**Tabla 1**

*Secuencia de primers para detección de PVH*

<b>Primers</b>	<b>Secuencia (5´-3´)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<b>MY11</b>	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	450
<b>MY09</b>	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	
<b>GP5</b>	TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC	150
<b>GP6</b>	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA	

M=A + C  
 R= A + G  
 W=A+ T  
 Y= C + T

**Tabla 2**

*Secuencia de primers para detección del gen de la beta globina humana*

<b>Primers</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<b>PCO4</b>	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	268
<b>GH20</b>	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	

Programa de amplificación: (en el termociclador)

94°C por 5 minutos  
 94°C por 30 segundos  
 56°C por 35 segundos  
 68°C por 35 segundos  
 68°C por 5 minutos  
 4°C tiempo indeterminado

} 35 ciclos

Tiempo aproximado de corrida: 1 hora y 32 minutos.

## 2.5 Electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó mediante un sistema de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3%, la siembra de los productos amplificados con loading buffer (buffer de carga) en los respectivos pocillos junto con el ladder (marcador de peso molecular). Se corrió por 30 minutos a 100 voltios y se coloreó con sybersafe por 10 minutos, se visualizó en el transiluminador UV. Se tomaron las impresiones fotográficas con una cámara digital y se analizaron los resultados. Si observamos una banda de 268 pb nos indica presencia del gen de la beta globina humana y la buena calidad del ADN. Si observamos una banda de 450 pb nos indica presencia de PVH en el control positivo, en el blanco no debe observarse ninguna banda. Si el paciente tiene infección



por PVH, tiene que observarse una banda igual al del control positivo, es decir una banda de 450 pb, indicándonos detección positiva a infección por PVH.

## 2.6 Genotipificación: PCR – RFLP.

Una vez detectados nuestros casos con PVH, se realizó la genotipificación mediante una endonucleasa de restricción (AFAI), donde podemos identificar 6 genotipos: 2 PVH de bajo riesgo (PVH-6 y 11) y 4 PVH de alto riesgo (PVH-16, 18, 31 y 33). Se incubó el producto amplificado de las muestras junto con el control positivo y con la endonucleasa de restricción en baño seco por 3 horas a 37°C. (ver protocolo con enzima de restricción). Se realizó un gel de agarosa al 3% y se corrió por el sistema de electroforesis horizontal. Se coloreó y visualizó por el transiluminador UV. Se tomaron las impresiones fotográficas y por discriminación de bandas podemos definir si es un PVH de alto o bajo riesgo. (ver tabla de Mapa de restricción).

**Tabla 3**

*Mapa de restricción para PVH*

<b>Tipos PVH</b>	<b>PVH-6</b>	<b>PVH-11</b>	<b>PVH-16</b>	<b>PVH-18</b>	<b>PVH-31</b>	<b>PVH-33</b>
<b>Punto de corte (pb)</b>	160	216	310	135	381	236

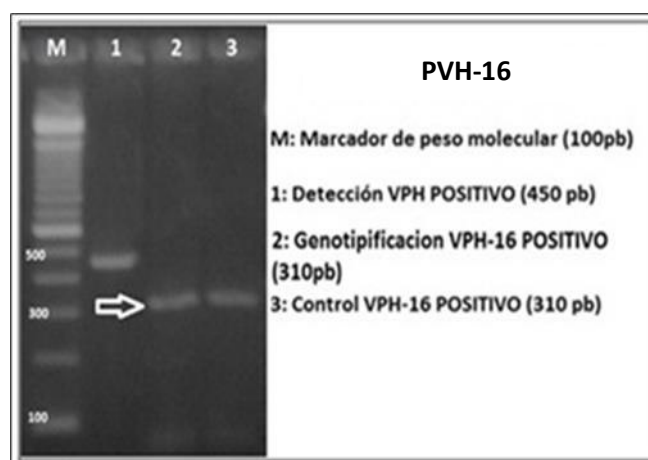
En los casos con resultados negativo a detección por PVH, se realizó una nested PCR (nPCR) usando primers internos (GP5/GP6) dándole una mayor sensibilidad a la metodología, se utilizó el producto amplificado que se corrió con MY09/MY11 como si fuese ADN, junto con el control positivo y un blanco (ver protocolo de PCR con GP5/GP6). Se llevaron los tubos de reacción al termociclador al programa de amplificación establecido, nuevamente se corrió un gel de agarosa al 3% y si observamos una banda de 150 pb, en la muestra igual que en el control positivo, nos indica que el caso tiene detección positiva a infección por PVH. Con esta

metodología de nPCR con los primers GP5/GP6 solo se detecta la presencia de PVH, no podemos genotipificar por ser un fragmento muy pequeño.

A continuación, algunos casos positivos con infección por PVH.

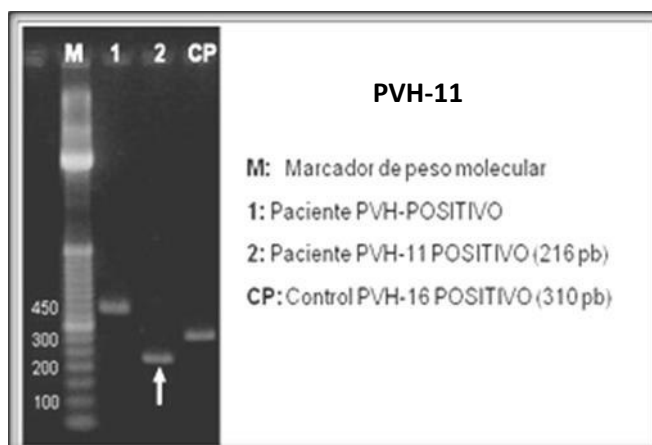
### Figura 8

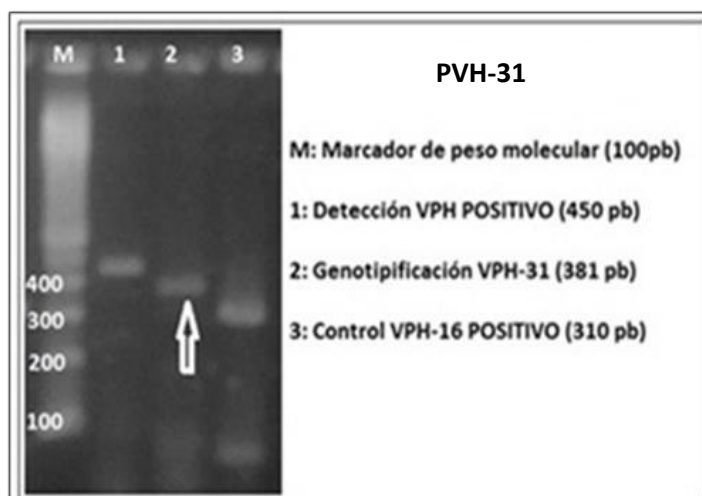
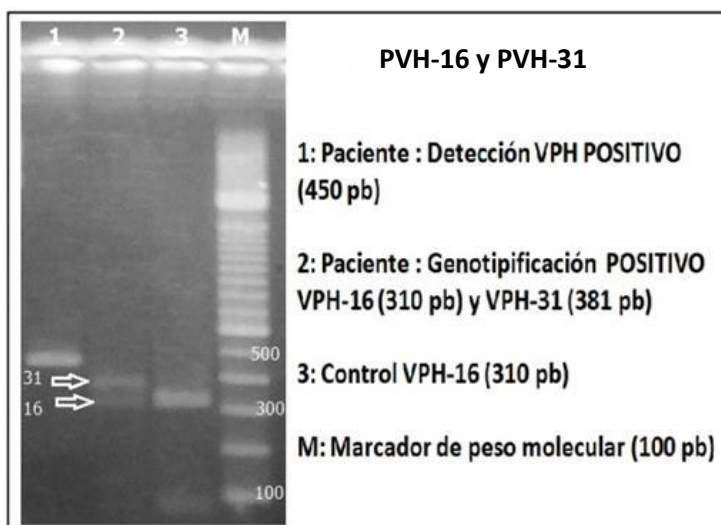
#### *Caso positivo PVH-16*



### Figura 9

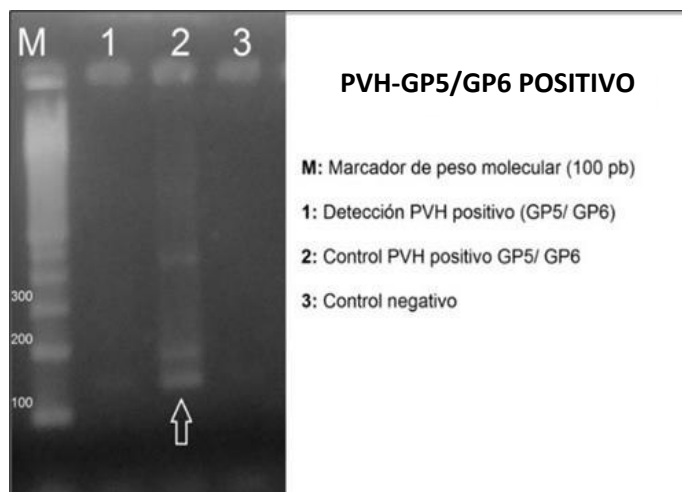
#### *Caso positivo PVH-11*



**Figura 10***Caso positivo PVH-31***Figura 11***Caso con infección múltiple a PVH-16 Y PVH-31*

**Figura 12**

*Caso positivo con GP5/GP6*

**2.7 Análisis estadístico de correlación.**

Con los resultados obtenidos, se realizó el análisis estadístico con los métodos de chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher, para nuestros casos de cáncer de pene y tipos de PVH. En el cual se obtuvieron los resultados con el programa IBM SPSS Statistics 24.

### III. RESULTADOS

Se realizó el estudio molecular de 62 muestras de pacientes admitidos al Departamento de Urología del INEN. Dos muestras quedan fuera del estudio, uno por tener ADN degradado, es decir a la biopsia de tumor de pene y a los ganglios le colocaron formol; el otro caso fue un tejido parafinado. Por lo que nuestro estudio para PVH fue realizado en 60 biopsias de tumor de pene y ganglios pélvicos e inguinales, según sea el caso.

**Tabla 4**

*Resultados según tipos de PVH*

<b>Tipos de PVH</b>	<b>Casos</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>PVH-16</b>	21	35.00
<b>GP5/GP6</b>	28	47.00
<b>PVH-11</b>	02	3.33
<b>PVH-31</b>	02	3.33
<b>PVH-16 y PVH-31</b>	01	1.66
<b>PVH-X</b>	01	1.66
<b>Negativos</b>	05	8.33
<b>Total</b>	60	100

Por Mejía Farro J.R. (2020)

Los resultados obtenidos fueron: Casos con infección por PVH-16 obtuvimos el 35% en 21 muestras estudiadas, siendo el más prevalente en nuestro medio similar a lo reportado por otros autores. Así mismo encontramos que con PCR anidada con primers internos GP5/GP6 (nested PCR) tenemos un 47% en 28 muestras, es decir aumentamos la sensibilidad y especificidad de la metodología, recuperando casos positivos con infección por PVH. Tenemos con PVH-31 con un 3.33% en dos pacientes, al respecto con PVH-11 de bajo riesgo, encontramos el 3.33% también en dos pacientes. Hallamos un paciente con infección múltiple,

es decir tiene 2 genotipos de alto riesgo PVH-16 y PVH-31, teniendo el 1.66%. También encontramos el único caso con PVH-X, sin determinar el genotipo, por limitaciones de nuestra metodología, la enzima de restricción solo reconoce 6 tipos de PVH, lo que nos indicaría que tiene infección por un tipo de PVH y que puede ser cualquiera de los otros 34 PVH que infectan la región ano genital. Referente a los 5 casos que dieron resultados negativos, con el 8.33%, nos indica que estos pacientes tienen diversas patologías no necesariamente relacionadas por infección por PVH, son por patologías inflamatorias causadas por otros agentes como hongos o microorganismos.

**Tabla 5**

*Resultados según tipo de muestras: Tumor de pene y ganglios*

<b>Muestras</b>	<b>PVH-16</b>	<b>PVH-31</b>	<b>PVH-11</b>	<b>PVH-16, 31</b>	<b>PVH-X</b>	<b>GP5/GP6</b>	<b>Total</b>
<b>Ganglios (+)</b>	04	-	-	-	-	07	11
<b>Tumor (+) y ganglios (+)</b>	03	-	-	01	-	07	11
<b>Tumor (+)</b>	13	01	02	-	01	13	30
<b>Tumor (+) y ganglios (-)</b>	01	01	-	-	-	01	03
<b>Total</b>	21	02	02	01	01	28	55

Por Mejía Farro J.R. (2020)

En la tabla 5 podemos observar que, en el grupo de ganglios (+), de los 11 ganglios estudiados 07 dieron positivos a PVH con GP5/GP6 y 04 con PVH-16. En el grupo de tumor (+) y ganglios (+), 07 casos fueron positivos para detección por PVH, 03 casos a PVH-16 y 01 caso con infección múltiple por PVH-16 y PVH-31. En el grupo de solo Tumor de pene (+) se encontró 13 casos con PVH-16, igual número con detección positiva a PVH con GP5/GP6, 02 casos con PVH-11, 01 caso con PVH-31, y también un caso con PVH-X (sin genotipificar). En

el siguiente grupo de Tumor (+) y ganglios (-) observamos 03 casos, uno con detección positiva a PVH-16, otro con PVH-31 y un caso con GP5/GP6 solo en el tumor de pene, y no se detectó en los ganglios, por lo que consideramos que en estos 03 pacientes su neoplasia está localizada, es decir se encuentra en el pene y no hay enfermedad avanzada o metastásica, por lo que en los ganglios no se evidenció presencia viral, lo que podemos concluir que en estos 03 pacientes solo con cirugía están curados y deberán seguir sus controles periódicos según indicación médica del especialista.

Con nuestros resultados podemos concluir que, la frecuencia de PVH en los pacientes con cáncer de pene en el INEN, fue de un 91.67% de los casos positivos mediante el método de PCR-RFLP.

Correlación de variables:

En el presente estudio de investigación, encontramos que sí existe una correlación significativa entre las 2 variables estudiadas: cáncer de pene y tipos de PVH (tabla 6). Empleando la prueba estadística del chi-cuadrado, obtuvimos una correlación de P valor=0.00, así como en la prueba estadística de Fisher, con un P valor = 0.00, indicándonos que sí hay correlación entre las 2 variables (tabla 7).

Hipótesis nula (Ho): No existe correlación entre las variables cáncer de pene y tipos PVH.

Hipótesis alterna (Ha): Existe correlación entre las variables cáncer de pene y tipos PVH.

Por lo tanto, si nuestro P valor =0.00, (chi –cuadrado como para Fisher) entonces P valor < 0.05, rechaza la hipótesis nula y acepta la hipótesis alterna.

Reglas de decisión:  $P \text{ value} < 0,05$  rechaza la  $H_0$  y acepta la  $H_a$ ,  $P \text{ value} > 0,05$  acepta la  $H_0$  y rechaza la  $H_a$

Como lo observamos en las siguientes tablas estadísticas:

**Tabla 6**

*Tabla cruzada cáncer de pene -tipos PVH*

		Tipos PVH			
		Ausente	Presente	Total	
<b>Cáncer de pene</b>	negativo	Recuento	5	0	5
		% dentro de diagnóstico	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de presencia	100,0%	0,0%	8,3%
		% del total	8,3%	0,0%	8,3%
	positivo	Recuento	0	55	55
		% dentro de diagnóstico	0,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de presencia	0,0%	100,0%	91,7%
% del total		0,0%	91,7%	91,7%	
<b>Total</b>	Recuento	5	55	60	

**Tabla 7**

*Pruebas de chi-cuadrado y de Fisher*

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	60,000 <sup>a</sup>	1	,000		
<b>Corrección de continuidad<sup>b</sup></b>	47,623	1	,000		
<b>Razón de verosimilitud</b>	34,420	1	,000		
<b>Prueba exacta de Fisher</b>				,000	,000
<b>Asociación lineal por lineal</b>	59,000	1	,000		
<b>N de casos válidos</b>	60				



#### IV. CONCLUSIONES

- El cáncer de pene es una neoplasia maligna poco frecuente.
- El riesgo de desarrollar cáncer de pene aumenta si el paciente está infectado por PVH de alto riesgo.
- El PVH-16 es el tipo viral más frecuente y prevalente hallado en nuestro estudio, similar a lo encontrado en otras investigaciones.
- La frecuencia de PVH en pacientes con cáncer de pene en el INEN, fue de un 91.67% de los casos positivos, mediante el método PCR- RFLP.
- Encontramos en nuestro estudio que sí existe una correlación significativa entre la presencia de cáncer de pene e infección por PVH.
- Los genotipos de PVH encontrados fueron, PVH de alto riesgo el 16 y el 31, PVH de bajo riesgo el 11, y PVH – X (indeterminado).
- El cáncer de pene se cura cuando se detecta a tiempo, es decir en los estadíos iniciales.

## V. RECOMENDACIONES

- Se sugiere procesar la biopsia de pene y/o ganglios lo más pronto posible, para evitar daños en el tejido y en el ácido nucleico, en este caso el ADN, caso contrario almacenarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- La recepción de la biopsia de pene y/o ganglios en el criovial debe ser sin ningún tipo de fijador ni preservante como formol, alcohol, solución salina, suero fisiológico, etc. Tener en cuenta que, en caso de emplearse un fijador, el ADN se degrada y de utilizar líquidos, los cristales que se forman a bajas temperaturas rompen las células degradando el ADN en estudio.
- Al momento de la extracción de ADN sacar el criovial de  $-80^{\circ}\text{C}$  con las biopsias respectivas y dejarlo, a temperatura ambiente dentro de la cabina de flujo laminar, para que se descongelen.
- Realzar nuestro trabajo de investigación que es multidisciplinario, es decir donde participan diversos profesionales de la salud como Urólogos, Biólogos, Médicos, Genetistas, Oncólogos, etc. formando un solo equipo para luchar contra este gran flagelo que se está incrementado en los últimos tiempos como es el Cáncer.

## VI. REFERENCIAS

- Alvarez, H. R. (2014). Diagnóstico molecular de virus papiloma humano mediante reacción de cadena de polimerasa en pacientes de sexo masculino sometido a penoscopia. *Revista Argentina de Urología*, 71(2), 60-63.
- Aranda, C. (2016). Infección por virus del papiloma humano: historia natural del cáncer de pene. *Gaceta Mexicana de oncología. Sociedad Mexicana de Oncología, A.C.*, 15(5), 323-326.
- Astudillo, O. F. (2014). Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano. *Panorama médico*, 8(1), 64-69.
- Benedetti, I. A. (2015). Infección por el virus de papiloma humano en hombres parejas de mujeres con lesión intraepitelial escamosa del cérvix. *Revista Urología Colombiana* 24(3), 143-149.
- Djajadiningrat, R. J. (2014). Prevalencia del virus del papiloma humano en cancer de pene invasiva y asociación con el resultado clínico. *The Journal of Urology*.
- Entiasupe, I. N. (2013). Comparison between two methods for molecular characterization of human papillomavirus. *Journal bras Doencas Sex Trasm* 25(1), 13-15.
- Flaherty, A. K. (2014). Implications for human papillomavirus in penile cancer. *Urologic Oncology: Seminar and Original Investigations*. 32, 53.
- Globocan. (2018). *IARC-WHO*. Obtenido de IARC-WHO: <http://gco.iarc.fr/>
- Guerrero, I. M.-S. (1999). Oncogenes E6-E7 del papiloma virus humano de alto riesgo detectado por PCR en biopsias de pene incluidos en parafinas. *Revista Médica Experimental*, XV(1-2), 40-43.

Hans-Ulrich, B. C.-Y.-K. (1994). Identification and assessment of Known and Novel Human Papillomavirus by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction, Fragment Length Polymorphism. Nucleotide Sequence and Phylogenetic Algorithm. *The Journal of Infectious Diseases*, 170, 1077-1085.

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. (Febrero de 2014). *Registro de Cáncer de Lima Metropolitana - 2012*.  
[http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/banners\\_2014/2016/.pdf](http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/banners_2014/2016/.pdf)

Li, W. P. (2016). Detección molecular y genotipificación del virus del papiloma humano como tamizaje de cáncer de cuello uterino. Posibilidades en el contexto peruano. *Boletín de Instituto Nacional de Salud*, 22 (1-3), 22-28.

Meza, L. C. (2017). Cáncer de Pene. *Manual de Cáncer Urológico - Diagnóstico y Manejo*. (1a, ed.). San Marcos.

Moya, M. P. (2016). Cáncer de pene: patología infrecuente en la consulta Médica. "Reporte de dos Casos y Revisión Literaria". *Revista Médica Risaralda*, 109-112.

Pascual, A. P.-P. (2007). High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. *Histology and Hystopathology*, 22, 177-183.

Rubin, M. K. (2001). Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma. *American Journal of Pathology*, 159(4), 1211-1218.

Sánchez, A. M. (2016). Penectomía parcial como tratamiento para el cáncer de pene localizado. Hospital Juárez de México. *Revista Mexicana de Urología*, 76(3), 182-188.

Scheiner, M.C.S. (2008). Human Papillomavirus and Penile Cancers in rio de Janeiro, Brazil: HPV Typing and Clinical Features. *Clinica Urology. International Braz Journal of Urology*, 34 (4), 467-476.

- Silva, R. L. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Revista Chilena de Infectología*, 30(2), 186-192.
- Sullcahuaman, Y. C. (2015). Características sociodemográficas de mujeres peruanas con virus papiloma humano detectado por PCR-RFLP. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*, 32(3), 509-514.
- Vásquez, W. R. (2017). Virus del Papiloma Humano. *Revisión de la Literatura. Federación Latinoamericana de Sociedades Científicas de Estudiantes de Medicina FELSOCEM CIMEL*, 22(1), 72-76.

## VII ANEXOS

### Anexo A: Imágenes de diferentes casos de muestras en estudio

**Figura 13**

*Tumor de pene fijado en formol*



**Figura 14**

*Ganglios inguinales fijados en formol*



**Figura 15**

*Tumor de pene incluido en parafina*



**Anexo B: Protocolo de extracción de ADN a partir de biopsias frescas**

1. La biopsia que ha sido congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un crio vial, colocarla en una placa Petri para que se descongele a temperatura ambiente.
2. La biopsia será cortada en pequeños fragmentos, con una hoja de bisturí y una aguja hipodérmica estéril en la placa Petri.
3. Transferir los fragmentos de tejido a un tubo eppendorf de 1.5 ml. estéril y rotular el tubo con el código respectivo.
4. Adicionarle 200 ul. de Tissue Lysis Buffer, luego 40 ul de proteinasa K, reconstituida (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Mezclar por vortex.
5. Incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 hora.
6. Adicionarle 200 ul.de binding buffer.
7. Mezclar por vortex, e incubar a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
8. Adicionarle 100 ul de isopropanol y mezclar por vortex.
9. Transferir el lizado a una columna de High Pure.
10. Microcentrifugar a 8,000 RPM por 2 minutos a temperatura ambiente, descartar el filtrado.
11. Adicionarle 500 ul de Inhibitor removal Buffer.
12. Microcentrifugar a 8,000 RPM por 2 minutos a temperatura ambiente, descartar el filtrado y el tubo colector.
13. Adicionarle 500 ul de buffer de lavado I
14. Microcentrifugar a 8,000 RPM por 2 minutos a temperatura ambiente, descartar el filtrado y tubo colector.
15. Adicionarle 500 ul de buffer de lavado II
16. Microcentrifugar a 8,000 RPM por 2 minutos a temperatura ambiente, descartar el

filtrado.

17. Microcentrifugar a 13,000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente y descartar el tubo colector.
18. Colocar la columna con filtro en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
19. Adicionarle 50 ul de buffer de elución (Pre-calentado a 70°C) e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
20. Microcentrifugar a 8,000 RPM por 2 minutos a temperatura ambiente, descartar la columna.
21. En el tubo eppendorf tenemos el ADN extraído, cuantificamos y almacenamos a -20°C en su criobox correspondiente hasta la PCR.



**Anexo C: Protocolo de PCR para detección de PVH (MY09/MY11)**

Buffer 10X	2.5 uL
Dntp 2.5mM	2.0 uL
MgSo4 50mM	1.3 uL
Taq polimerasa 1U/ul	0.13 ul
Agua grado molecular	16.0 uL
Primers MY09 (10 pmol)	1.0 uL
Primers MY11 (10 pmol)	1.0 uL
Muestra ADN	1.0 uL
Volumen final	25.0 uL

**Anexo D: Protocolo de PCR para amplificación del gen de la Beta-globina humana (PCO4/GH20)**

Buffer 10X	2.5 uL
Dntp 2.5mM	2.0 uL
MgSo4 50mM	1.3 uL
Taq polimerasa 1U/ul	0.13 ul
Agua grado molecular	16.0uL
Primers PCO4 (10 pmol)	1.0 uL
Primers GH20 (10 pmol)	1.0 uL
Muestra ADN	1.0 uL
Volumen final	25.0 uL

**Anexo E: Protocolo de PCR-RFLP con enzima de restricción Afa I**

Enzima de restricción: Afa I	1.0 uL
Buffer 10X	2.0 uL
BSA 0.1%	2.0 uL
Muestra ADN	10.0 uL
Agua grado molecular	5.0 uL
Volumen final	25.0 uL

**Anexo F: Protocolo nested PCR con (GP5/GP6)**

Buffer 10X	2.5 uL
Dntp 2.5mM	2.0 uL
MgSo4 50mM	1.3 uL
Taq polimerasa 1U/ul	0.13 ul
Agua grado molecular	15.0 uL
Primers GP5 (10 pmol)	1.0 uL
Primers GP6 (10 pmol)	1.0 uL
Muestra Amplicón	2.0 uL
Volumen final	25.0 uL