



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA INVESTIGACIÓN CLÍNICA
EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA

ASOCIACIÓN DE LA DENSIDAD MICROVASCULAR Y LA EXPRESIÓN
PROTEICA CON LOS MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO
MESENQUIMAL, RELACIONADOS CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL
DE PACIENTES CON CÁNCER DE CÉRVIX LOCALMENTE AVANZADO.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q.F.B. SILVANA MASHENKA ROBLES MOLINA

TUTOR:
DRA. LUCELY DEL CARMEN CETINA PÉREZ
INCAN

Ciudad Universitaria, Cd. Mx a 15 de Agosto de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección de la Dra. Lucely del Carmen Cetina Pérez. El trabajo experimental se desarrolló en la Unidad de Investigación Biomedica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan / Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), con la supervisión del Dr. Joaquín Manzo Merino. Proyecto apoyado por el Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto: (018/037/IBI) (CEI/1284/1) y (017/048/IBI) (CEI/1227/17).

El comité tutorial estuvo conformado por:

Dra. Lucely del Carmen Cetina Pérez

Tutor

Instituto Nacional de Cancerología

El Jurado asignado para el examen de grado de Maestra en Ciencias se conformó por:

Dra. Guadalupe Silvia García de la Torre

Jefa del departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina UNAM.

Dra. Patricia Elena Clark Peralta

Encargada en Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital Infantil de México Federico Gómez , Coordinadora de Epidemiología clínica del PMDCMOyS UNAM

Dra. Lucely Cetina del Carmen Pérez

Responsable del Programa MICAELA e Investigadora Clínico en Ciencias Médicas, Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Joaquín Manzo Merino

Catedrático CONACyT, Instituto Nacional de Cancerología.

Dra. Lucía Méndez Sánchez

Investigadora en Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital Infantil de México Federico Gómez.



AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Dra. Lucely del C. Cetina Pérez gracias por su confianza, apoyo, conocimientos y facilidades que me brindó para ejecutar mi investigación.

Dr. Joaquín Manzo Merino agradezco y valoro, su apoyo, supervisión, interés y asesoría siempre certera, durante el proceso de mi proyecto de investigación.

Dr. Roberto Jiménez Lima, mi admiración y respeto como compañero e Investigador, gracias por compartirme su expertiz en lo estadístico, metodológico y médico. Su apoyo incondicional fué un impulso para la realización y culminación de mi proyecto.

Dra. Ma Delia Pérez Montiel Gómez agradezco su consejo, paciencia, profesionalismo y tiempo que dedicó en la interpretación de la expresión de proteínas en los casos como Patóloga experta, formando parte fundamental en éste trabajo.

Histotecnólogo José de Jesús Marín Aquino gracias por el apoyo en los cortes de tejido.

Al gran equipo de investigadores del Laboratorio 2 INCan por su amistad, sus sonrisas, aportaciones, enseñanzas y análisis en mis inmunohistoquímicas. Adri, Dianita, Katy, David, Diego, Joak y Josue me hicieron disfrutar cada momento en el laboratorio.

Dra. Silvia, Dra. Tatiana y Dr. Eder gracias por su apoyo en la revisión de expedientes.

Lic. Alba Ochoa agradecida con usted por su amable atención y pronta respuesta en los trámites durante toda la Maestría.

A la Máxima casa de estudios la UNAM que me ofreció una formación académica, integrando la docencia e investigación con excelentes Catedráticos dedicados a tan noble labor y que forman parte de mi Jurado para el grado, les agradezco sus observaciones, asesoría y valiosas aportaciones en el cuerpo de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi Mamá Silvana Molina Martínez, por siempre creer en mí y enseñarme que con amor, esfuerzo, dedicación y organización puedo lograr lo que deseo, me hace muy feliz saberte parte de esto y disfrutarlo juntas. Te Amo

A mis hermanos Paula y Joaquín por cuidarme desde niña, enseñarme a ser mejor persona, queriéndome, apoyándome y siendo los más divertidos cómplices de todas mis locuras.

A Ashley, desde que estás en mi vida con tu amor y alegría, eres mi motor de inspiración.

A Heber por continuar enriqueciendo mis días y ser un apoyo ideal en este camino de mi vida.

A mis amigos con los que curse la Maestría por tantas sonrisas y aprendizaje juntos.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	7
1. Introducción	8
2. Antecedentes	10
2.1. Cáncer	10
2.2. Cáncer cervicouterino (CaCu)	10
2.2.1 Tratamientos para cáncer cervicouterino	11
2.3 Virus de Papiloma Humano (VPH) y cáncer de cérvix	12
2.4 Cáncer de cérvix: Relación con la expresión de proteínas involucradas con angiogénesis y proliferación celular	13
2.4.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	13
2.4.2 Receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	15
2.5 Cáncer de cérvix: Relación con la expresión de proteínas involucradas en la transición epitelio-mesenquimal (TEM)	16
2.5.1 Transición epitelio-mesenquimal en cáncer	17
2.5.2 Inductores de la transición epitelio-mesenquimal	17
2.5.3 E-Caderina	18
2.5.4 Vimentina	19
2.5.5 Densidad Microvascular (DMV)	20
3. Revisión de literatura	21
4. Planteamiento del problema	24
5. Justificación	24
6. Pregunta de investigación	25
7. Hipótesis	25
8. Objetivos	25
9. Materiales y Métodos	26
9.1 Diseño del estudio	26
9.2 Población de estudio	26
9.2.1 Tamaño muestral	26
9.3 Criterios de selección	27
9.4 Definiciones operacionales	28
9.5. Descripción general del estudio	32
9.5.1 Recolección de datos demográficos de las pacientes	32
9.5.2 Determinación inmunohistoquímica: Expresión proteínas	32
9.5.3 Metodología del procedimiento inmunohistoquímico	34
9.5.4 Determinación de la expresión de EGFR	34
9.5.5 Determinación de la expresión de VEGF	34
9.5.6 Determinación de la expresión de E-caderina	35
9.5.7 Determinación de la expresión de Vimentina	35



9.5.8 Determinación de la densidad microvascular	35
10. Diagrama de trabajo	36
11. Plan de Análisis	37
12. Consideraciones éticas	37
12.1 Proceso de obtención de consentimiento informado	37
12.2 Acuerdos para indemnización a los participantes	38
12.3 Ingresos para investigadores	38
12.4 Normatividad	38
13. Resultados	38
13.1 Características basales	39
13.2 Características demográficas	40
13.3 Características del tratamiento	42
13.4 Respuesta al tratamiento	42
13.5 Estandarización de anticuerpos para la detección de proteínas	43
13.6 Determinación de proteínas en muestras de pacientes	48
13.7 Asociación de la SG con los niveles de expresión de proteínas en pacientes	51
14. Discusión	56
Conclusiones	60
Referencias	61

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	Página
1. Evidencia de búsqueda científica	22
2. Operacionalización de las variables	28
3. Características basales	40
4. Características demográficas	41
5. Características del tratamiento	42
6. Respuesta al tratamiento	42
7. Especificaciones de anticuerpos empleados en inmunohistoquímica	48
8. Casos de Expresión positiva de EGFR por IHQ	50
9. Casos de Expresión positiva de Vimentina por IHQ	50
10. Expresión de proteínas por IHQ	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Diagrama general del procedimiento de inmunohistoquímica	33
2. Validación de anti-EGFR en tejido cervical normal (IHQ)	43
3. Validación de anti-VEGF en tejido glioblastoma de rata (IHQ)	44
4. Validación de anti-E-caderina en tejido de páncreas normal (IHQ)	45
5. Validación de anti-Vimentina en tejido Cáncer de cérvix con diagnóstico confirmado (IHQ)	46
6. Validación de anti-CD31 en tejido de Placenta humana (IHQ)	47
7. Expresión de niveles de proteínas en muestras de CaCu	48
8. Supervivencia global	52
9. Supervivencia global VEGF	53
10. Supervivencia global E-Caderina	54

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
DNA	Deoxyribonucleic acid
CaCu	Cáncer cervicouterino
CCE	Carcinoma de células escamosas
DMV	Densidad microvascular
ECM	Matriz extracelular
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
GLUT-1	Transportador de glucosa tipo 1
GOG	Gynecology Oncology Group
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1 α	Factor inducible de la hipoxia 1 α
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
NCI	National Cancer Institute
LCR	Región larga de control
PTB	Phospho-tyrosine-binding domains
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
RTKs	Receptores tirosin cinasa
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SG	Supervivencia global
SH2	<i>Src homology domain-2</i>
SLP	Supervivencia libre de progresión
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VPH	Virus de Papiloma humano

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud vigente a nivel global, de acuerdo al Globocan (2018) anualmente se diagnostican 569 847 nuevos casos y se reportan 311 365 muertes, ocupando el cuarto lugar en tasas de incidencia a nivel mundial (IARC 2018). Más del 85% de la carga global ocurre en países en desarrollo, donde el CaCu representa el 13% de los cánceres femeninos. En estos países el 1.9% de las mujeres desarrollan CaCu y 1.1% mueren por dicha enfermedad antes de los 75 años. Un ejemplo de ello son los países de América Latina y el Caribe, que en su mayoría las tasas anuales de CaCu se mantienen altas, generalmente superiores a 20 casos por cada 100 000 mujeres (Lewis 2004). Actualmente se estima un 9.9% de incidencia de CaCu con 56 187 casos nuevos y 28 318 muertes en los países de América Latina y el Caribe (GLOBOCAN 2018). En países desarrollados, las tasas de incidencia y mortalidad por CaCu son de 0.9% y 0.3%, respectivamente, siendo dos a tres veces menores que en países en desarrollo (Arbyn, et al. 2008).

En el caso de México los datos más recientes reportan al CaCu como la tercera causa más común de cáncer en mujeres, al año 7 869 Mexicanas son diagnosticadas con CaCu y 4 121 mueren a causa de esta enfermedad (GLOBOCAN 2018). Específicamente, en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) la neoplasia más frecuente en mujeres correspondió al CaCu con un 30.6% de las 19 597 neoplasias diagnosticadas entre 1985 y 1994 (Mohar, Frias-Mendivil and Suchill-Bernal 1997).

En la actualidad el CaCu se estadifica de forma clínica de acuerdo a los lineamientos de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Montalvo, Coronel and Alvarado 2011). En términos de tratamientos, el CaCu puede dividirse en tres grandes grupos: Estadios clínicos (EC) tempranos desde IA1 hasta el IIA1, en CaCu localmente avanzado que puede ser considerado desde estadios clínicos IB2/IIA2 a IVA y en enfermedad avanzada o metastásica que engloba los EC IVB, recurrente o persistente. (Dueñas González, et al. 2010).

En Estados Unidos al igual que en otros países del primer mundo, la mayoría de los cánceres de cérvix se diagnostican en estadios tempranos (Robles, White and Peruga 1996). De los 13 458 pacientes con cáncer de cérvix incluidos en el *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) entre 1973 y 1987, el 71% tenía neoplasias estadios I a IIA según la clasificación FIGO (Pabón 1993).

En México es preocupante la distribución por estadios del CaCu, dado que se ha reportado que un 60% de los casos incidentes corresponden a lesiones localmente avanzadas (Robles, White and Peruga 1996) y los resultados del tratamiento en estas pacientes están lejos de ser óptimos, con una supervivencia a 5 años para las etapas 1B2, IIB, IIIB y IVA de 72.2%, 63.7%, 41.7% y 16.4% respectivamente, de acuerdo al reporte anual sobre los tratamientos de cáncer ginecológico (Cetina, et al. 2006).

En casos avanzados los tratamientos clásicos de elección son radioterapia y, últimamente quimioterapia, produciendo resultados poco notables con una tasa de supervivencia a 5 años del 70% para estadio IIB, 50% para el IIA, 40-30% para el IIIB y 10% para la etapa IVA (V. Nagy 2003).

El pronóstico es un factor importante en la selección del tratamiento adecuado en cada caso individual. Las variables que se han asociado con el pronóstico del paciente están relacionadas: al tumor (sitio primario, tipo celular y extensión de la enfermedad), al paciente (estado funcional, comorbilidades y sexo) y a factores ambientales (nutrición, elección y calidad del tratamiento); mismas que determinan el éxito terapéutico y que dependerán en gran medida de los factores propios del tumor. Es así que la búsqueda de biomarcadores asociados a una mejor sobrevida es imperante para permitir proponer herramientas en el tratamiento del CaCu.

2. ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER

El cáncer se define como al conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células, las cuales invaden y dañan tejidos u órganos provocando finalmente la muerte del individuo (Hanahan and Weinberg 2000). Uno de los cánceres de mayor relevancia clínica en mujeres Mexicanas es el CaCu el cual inicia en las células que revisten el cuello del útero, dicho proceso involucra una serie de pasos secuenciales que gradualmente promueven la transformación de las lesiones a precancerosas derivando posteriormente en cáncer (American Cancer Society 2016).

2.2 CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu)

El CaCu se origina a partir de las células del epitelio estratificado escamoso de la zona de transformación los cuales se catalogan de acuerdo a su origen histológico siendo un 80-90% de origen escamoso, conocido comúnmente como carcinoma de células escamosas (CCE), seguido por el adenocarcinoma en un 10-20%, que se origina en las células endocervicales (López Saavedra and Lizano Soberón 2006), (Galgano and et al. 2010).

Diversos autores describen el desarrollo del CaCu como un evento multifactorial, ya que diferentes factores se han asociado a su desarrollo, sin embargo, la infección por el virus de papiloma humano (VPH) se ha reconocido como el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, debido a que en la mayoría de los casos se encuentra el genoma del VPH (zur Hausen 2009).

Entre los determinantes de progresión de esta neoplasia están la ausencia de programas de tamizaje y la poca accesibilidad a los recursos diagnósticos; además de otros factores, como el genotipo viral, la persistencia de la infección, probablemente la carga viral, la integración del DNA viral en el genoma celular y periodos de inmunosupresión en el organismo (Manzo-Merino, Jiménez-Lima and Cruz-Gregorio 2014).

2.2.1 TRATAMIENTOS PARA CÁNCER CERVICOUTERINO

La administración concomitante de radioterapia pélvica con quimioterapia permite incrementar el control del crecimiento tumoral, induciendo un daño sub-letal sobre las células tumorales, al inducir daño al DNA que al no ser reparado ocasiona la muerte celular (Morris, Eifel and et al 1999).

En 1999, el *National Cancer Institute* (NCI) de los Estados Unidos recomendó el uso concurrente del cisplatino con la radioterapia como estándar para el tratamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado basado en los resultados de la integración de cinco estudios clínicos fase III con asignación aleatoria; de estos, dos fueron realizados de forma exclusiva en mujeres con enfermedad temprana (estados IA, II, IB y IIA) e incluyeron el uso preoperatorio y postoperatorio de radioterapia como parte del control (Peters, et al. 2000). En los tres estudios restantes publicados por el *Gynecology Oncology Group* (GOG) y por el *Raditation Therapy Oncology Group* (RTOG) se incluyeron un gran número de pacientes con estadios IIB, III y IVA (Peters, et al. 2000). Estos experimentos encontraron un beneficio uniforme con el uso de la quimiorradiación que otorga un incremento absoluto en la supervivencia global a cinco años del 12%. La mayoría de estos estudios incluyeron como tratamiento de quimioterapia concomitante Cisplatino, convirtiéndose en el medicamento de elección en esta estrategia de tratamiento (National Cancer Institute 1991).

A pesar del impacto positivo del tratamiento con quimio y radioterapia concomitante (utilizando cisplatino como radiosensibilizador), alrededor del 35% de las pacientes presentan progresión de la enfermedad (Collaboration 2008). Para evitar este fenómeno, se han intentado alternativas de tratamiento que permitan mejorar estos desenlaces. Una de ellas es la modificación del tratamiento adicionando gemcitabina al tratamiento con cisplatino como medicamento radiosensibilizador. Un estudio fase II en población Mexicana mostró que la respuesta patológica completa fue mayor en el grupo en que se administró la combinación cisplatino-gemcitabina comparado con el grupo que solo recibió cisplatino (Duenas-Gonzalez, et al. 2005). Si bien se obtuvieron mejores resultados

con Gemcitabina, esto fue a costa de una mayor toxicidad gastrointestinal y genitourinaria.

2.3 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y CÁNCER DE CÉRVIX

Prácticamente todos los casos de cáncer de cérvix son causados por infecciones persistentes con un conjunto restringido de VPH. Un estudio que evaluó la prevalencia del VPH en CaCu con una perspectiva mundial, detectó el DNA del VPH en el 93% de los tumores de CaCu, sin una variación significativa en la positividad del VPH entre los países (Bosch, et al. 1995). Algunos tipos de VPH, como VPH 16 y VPH 18 son claramente carcinogénicos potentes y están estrechamente relacionados, representando aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de cérvix (Jendoubi-Ferchichi, et al. 2018).

Los VPHs son virus pequeños con un diámetro aproximado de 55nm sin envoltura. Todos los VPH contienen un genoma de aproximadamente 8 Kb con una doble cadena de DNA circular, que puede ampliamente dividirse en tres regiones: temprana, tardía y región larga de control (LCR). La región temprana contiene los genes que codifican para las proteínas no estructurales que se han designado como E1 a E8. LA región tardía contiene los genes L1 y L2, que codifican las proteínas estructurales de la cápside viral, necesarias para la formación, transmisión y diseminación del virión. Los genes tempranos de VPH regulan el ciclo viral y manipulan la maquinaria celular para replicar, transcribir y traducir proteínas virales (E1 y E2), regulan productos virales tempranos, inducen reordenamientos del citoesqueleto (E4) y causan desregulación del ciclo celular (E6 y E7) (Petros, Panagiotis and Georgios 2016).

De manera importante la expresión constante de las oncoproteínas E6 y E7 es necesaria para mantener la célula tumoral, por lo que sus funciones han sido ampliamente estudiadas.

2.4 CÁNCER DE CÉRVIX: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS CON ANGIOGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

2.4.1 FACTOR DEL CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

La familia de proteínas relacionadas con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) alfa representa un grupo heterogéneo de elementos relacionados con el estímulo y aumento de la permeabilidad vascular, el crecimiento de las células endoteliales, su migración y diferenciación, que finalmente permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos que tienen como función principal proporcionar de nutrientes al tumor. Otros miembros adicionales de esta superfamilia son el factor de crecimiento placentario (PlGF, Placental Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. La sobreexpresión del VEGF alfa se ha correlacionado con un peor pronóstico en los pacientes con carcinoma escamoso de cérvix y sus niveles en suero representan un marcador subrogado del crecimiento tumoral (Veikkola, et al. 2000).

Actualmente, VEGF es considerado uno de los factores angiogénicos más importantes, el cual se ha relacionado a células tumorales y a la inducción de formación de vasos capilares mediados por la señalización de receptores tirosin cinasa (RTKs). (Nagy, et al. 2011).

La célula tumoral promueve la sobre expresión de VEGF debido a la acción de la oncoproteína E6, por medio de la inactivación del p53, modulando así la angiogénesis y vasculogénesis a través de la inhibición de la expresión del TSP1 (Trombospondina 1), una glicoproteína de adhesión que facilita la interacción entre las células y su matriz a nivel de estroma, permitiendo la unión de moléculas como el fibrinógeno, la fibronectina, la laminina, el colágeno tipo 5 y las integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$, importantes en la génesis del carcinoma de cérvix.

La intensidad de la expresión del VEGF cuantificada por inmunohistoquímica se correlacionó de forma negativa con la Supervivencia global (SG), hallazgo que confirmaron Gaffney y colaboradores (2003) al demostrar una asociación

estadísticamente significativa entre este marcador y la supervivencia libre de progresión (SLP) (Gaffney, et al. 2003).

El VEGF se une, al menos, a tres receptores de tipo tirosin-cinasa y a una proteína de membrana llamada neuropilina. Los tres receptores se denominan VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4). Los dos primeros se encuentran en el endotelio vascular, y el último se expresa exclusivamente en los vasos Linfáticos (Auguste, et al. 2005). La interacción de VEGF con VEGFR2 activa la proliferación, migración, supervivencia y reorganización del citoesqueleto celular. Además, VEGF no sólo activa un programa de proliferación en el endotelio, sino que pone en marcha propiedades citoprotectoras específicas, descritas hasta ahora en los capilares en desarrollo y en las neoplasias, cambios promovidos por la vía PI3K/Akt (Auguste, et al. 2005), (Costa, Soares and Schmitt 2004).

Zusterzeel (2009) concluyó que el aumento en los niveles circulantes de VEGF se asociaron con un mayor estado tumoral, con la posibilidad de documentar un tumor mayor de 2 cm y con una probabilidad superior de evidenciar la presencia de los tipos más agresivos del VPH (Zusterzeel, et al. 2009).

Dado que la angiogénesis se encuentra claramente relacionada con el desarrollo y la progresión del cáncer de cérvix, varios estudios han evaluado la eficacia y seguridad de agentes dirigidos contra VEGF como el bevacizumab, en mujeres con enfermedad recurrente o metastásica. Este agente demostró una tasa de respuesta del 11% y una proporción baja de pacientes sin progresión de la enfermedad después de 6 meses de iniciada la intervención (Monk, Sill, et al. 2009). Algunos reportes adicionales soportan el uso de este y otros agentes anti-angiogénicos en combinación con carboplatino y paclitaxel como parte del tratamiento sistémico del carcinoma de cérvix avanzado (Monk, Willmott and Sumner, Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer 2010), (Tan, et al. 2010), (Takano, et al. 2009).

2.4.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) pertenece a la familia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosin-cinasa. En humanos, el gen EGFR (c-erbB1) codifica para una glicoproteína integral de membrana de 170 KDa que posee un dominio catalítico responsable de la actividad tirosin-cinasa. Más de la mitad de la cadena polipeptídica de EGFR forma el receptor situado en la parte extracelular. Esta porción es específicamente reconocida por una familia de factores de crecimiento que poseen módulos estructurales semejantes al del EGF (*Epidermal Growth Factor*), su ligando prototipo. En el dominio citoplásmico de EGFR se encuentra localizado el sitio catalítico responsable de su actividad tirosin-cinasa. En este dominio se encuentra un residuo de lisina (Lys721), que está implicado en la unión del ATP al receptor, y cinco residuos de tirosina (Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148 y Tyr1173) en su extremo más distal, que son susceptibles de ser trans-fosforilados después de producirse la dimerización del receptor. Los residuos de fosfo-tirosina así generados sirven como sitios de reclutamiento y anclaje de proteínas que contienen dominios SH2 (*Src homology domain-2*) o dominios PTB (*phospho-tyrosine-binding domains*) que inician múltiples vías de señalización intracelular implicadas en la proliferación celular (Speake, Holloway and Costello 2005), (Ghosh, et al. 2001).

Se ha demostrado que EGFR se encuentra sobre-expresado en casi el 80% de los carcinomas escamosos de cérvix; Noordhuis y colaboradores (2009) demostraron recientemente que la sobreexpresión de EGFR en mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas con quimio-radiación se asoció de forma negativa con la Sobrevida Libre de progresión (SLP) (Noordhuis, et al. 2009). Además, la positividad a EGFR fue útil para predecir la respuesta al tratamiento de forma independiente al estado tumoral y al patrón histológico dominante. Esta asociación puede explicarse, por el papel que tiene el receptor en el proceso de reparación del daño ocasionado sobre el DNA debido a la quimioterapia, mismas que logra a través de la vía activación de la cascada de señalización PI3K/Akt.

2.5 CÁNCER DE CÉRVIX: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (TEM)

Las células epiteliales juegan un rol estructural y funcional en los órganos y son mutuamente adherentes a través de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Las moléculas de adhesión célula-célula incluyen a las caderinas mientras que las de adhesión célula-matriz extracelular involucra a las integrinas. Las caderinas y las integrinas reposan en el citoesqueleto que es una estructura rígida formada por filamentos de actina y citoqueratina. En un epitelio intacto las células tienen una estructura rígida y son inmóviles. En contraste, las células mesenquimales, tienen una organización menos rígida con menor cantidad de uniones celulares y de moléculas de citoqueratina, mostrando propensión a la movilidad (Wells, Yates and Shepard 2008).

En condiciones fisiológicas, las células epiteliales se encuentran en comunicación directa con el estroma por medio de una estructura organizada mayormente en hojas (a excepción de la piel), con células adyacentes unidas fuertemente por “*tight junctions*” y “*gap junctions*”. Estas conexiones ejercen diversas funciones como: comunicación, restricción de la proliferación, migración celular y mantenimiento de la polaridad celular. En la superficie apical de gran parte de los tejidos, las células epiteliales están en contacto con fluidos corporales que contienen en su mayoría factores de crecimiento y sus receptores se encuentran secuestrados en las superficies baso-laterales. Las “*tight junctions*” que se componen por uniones epitelio-caderinas (E-caderina o CDH1), limitan el acceso de los fluidos apicales a los espacios basolaterales y compartimientos estromales (Wells, Yates and Shepard 2008), (Micalizzi, Farabaugh and Ford 2010).

Cuando ocurre un proceso neoplásico, este ordenamiento sufre alteraciones. Generando una serie de eventos que resultan en la transición de una célula epitelial, no móvil hacia una célula mesenquimal no polarizada y móvil, con capacidad invasiva, proceso identificado y conocido como Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) (Wells, Yates and Shepard 2008). Durante el proceso de metástasis, debe existir un proceso coordinado de migración, invasión y TEM. La célula tumoral inicia con un cambio fenotípico que involucra la pérdida de marcadores epiteliales y un aumento de factores y proteínas

mesenquimales los cuales permiten que la célula tumoral migre e invada nuevos nichos para finalmente colonizarlos y generar la metástasis (Kalluri and Weinberg 2009).

La TEM no solo juega un papel primordial en las transformaciones neoplásicas, sino que también ha sido reconocido como un mecanismo importante en diversos procesos durante el desarrollo embriológico (incluyendo gastrulación, en donde el epitelio da origen al mesodermo), procesos de cicatrización, fibrosis y transformación neoplásica (Berx, et al. 2007).

2.5.1 TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL EN CÁNCER

El proceso de TEM que ocurre en cáncer es definido como la pérdida de la arquitectura epitelial normal generada por un deterioro de las uniones célula-célula. A nivel molecular se evidencia por pérdida de marcadores epiteliales como la E-caderina y la aparición de marcadores mesenquimales que incluyen: fibronectina, N-caderina y Vimentina más la adquisición de fenotipo fibroblastoide móvil e invasivo. Una vez que la célula mesenquimal alcanza su destino final durante el proceso de metástasis, sufre el proceso reverso conocido como transición mesenquimal-epitelial (Berx, et al. 2007).

2.5.2 INDUCTORES DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL

El proceso conocido como TEM puede ser inducido tanto por señales intrínsecas, (por ejemplo mutaciones génicas) o por señales extrínsecas (como señalización a través de factores de crecimiento). Dentro de los factores de crecimiento conocidos que inducen TEM está el factor de crecimiento transformante β (TGF β), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), diversos miembros de la familia de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (FGF) (Hay 1995), (Huber, Kraut and Beug 2005), (Hulit, et al. 2007), (Kang and Massagué 2004). Recientemente, la señalización a través de Notch ha sido implicada en transición TEM mediante la activación del factor de transcripción Snail2 (Slug), un potente represor de la

expresión de E-caderina. Cambios en la composición de la matriz extracelular (ECM) también son capaces de inducir TEM, como se observa con el colágeno tipo I y el ácido hialurónico (Niu, et al. 2007), (Peinado, Portillo and Cano 2004).

Como se mencionó anteriormente, en el proceso de TEM, además de la pérdida de las capacidades de adhesión, las células tumorales desarrollan procesos para ganar propiedades de migración e invasión a través de la disrupción de los contactos célula-célula, lo cual ha sido correlacionado con la pérdida de la E-caderina. Esta pérdida puede ser causada por mutaciones somáticas, hipermetilación del promotor o por la acción de represores transcripcionales como Slug, Snail, Twist1 y Zeb-1. La baja regulación de la E-caderina también se ha asociado con el desarrollo de carcinomas invasivos, diseminación metastásica y mal pronóstico (Peinado, Olmeda, et al. 2007), y su nivel de expresión es inversamente proporcional con el estado y grado tumoral. Todo esto en conjunto nos indica que la E-caderina puede ser considerada como un gen supresor de invasión (National Institute Cancer 2008).

2.5.3 E-CADERINA

La superfamilia Caderina es una familia evolutivamente conservada de moléculas de adhesión que median las interacciones célula-célula dependientes de calcio. Las moléculas de caderina pueden subdividirse en tres subfamilias: caderinas clásicas, caderinas no clásicas y protocaderinas. De estas las caderinas clásicas son las más estudiadas, basadas en su distribución de tejido, las caderinas clásicas comprenden principalmente caderina epitelial (E-caderina), caderina placentaria (P-caderina), y caderina neural (N-caderina), todas ellas son requeridas para la adhesión célula-célula normal y mantenimiento, integridad y homeóstasis del tejido. Recientemente se encontró que la expresión aberrante de las caderinas clásicas se asocia con invasión de tumores y un peor pronóstico en muchos carcinomas (Baohua , et al. 2016).

La E-caderina es una glucoproteína de transmembrana codificada por el gen de la cadherina (*CDH1*) localizado en el cromosoma 16q22.1 (Aristizábal and Satie- Takahashi

2016), misma que ha sido identificada como un gen supresor de tumores y se reconoce que tiene un rol en el desarrollo de cáncer de cérvix (Baohua , et al. 2016).

La pérdida de la función adhesiva de la E-caderina es un paso crítico en la progresión de las células epiteliales hacia un fenotipo más agresivo. Como se ha mencionado antes, la E-caderina en epitelio normal se reconoce como un gen supresor de factores de invasión, ya que su inactivación o la disminución de su función debido a mutaciones, deleciones alélicas o alteraciones epigenéticas, se asocian con la transición epitelio mesénquima, lo que conlleva a mayor agresividad del tumor y un mayor potencial metastásico. La función de la E-caderina se pierde frecuentemente durante el desarrollo del cáncer epitelial humano; además, se asocia con la diferenciación, invasión del tumor y metástasis en ganglios linfáticos (Aristizábal and Satie- Takahashi 2016).

El decremento de la expresión de E-caderina no solo se ha detectado en el carcinoma cervical escamoso, también se ha asociado con invasión tumoral y mal pronóstico. Varios factores reguladores, incluyendo el factor de crecimiento transformante B1, KCL contrasporter-3 y el factor de crecimiento epidérmico, promueven la migración celular y la invasión en líneas de CaCu al regular la expresión y función de E-caderina. Sin embargo, no se ha descrito la expresión de E-caderina en lesiones premalignas y su papel en la carcinogénesis cervical en etapas tempranas. (Baohua , et al. 2016).

2.5.4 VIMENTINA

Los marcadores de TEM incluyen a E-caderina, N-caderina y Vimentina. Así mismo Vimentina se ha identificado como uno de los mayores filamentos intermediarios mesenquimales y su expresión ha sido descrita como el estado final de la progresión en TEM, ésta proteína se presenta en un estado de células tumorales completamente diferenciadas, que son altamente proliferativas e invasivas (Xiangwen, et al. 2014).

La investigación de Jian-Qin 2015, refiere que la TEM es un paso clave en el procesos de metástasis del cáncer. Donde el incremento de la expresión de Vimentina y el

decremento de la expresión de E-caderina, son de los mejores índices de incidencia de TEM. El estudio de Satelli et al, 2011, confirmó que la sobre-regulación de la expresión de Vimentina en diversos tumores epiteliales está estrechamente asociado con la migración, invasión y metástasis del tumor.

Una de las vías de activación son por VPH16 E7 que pueden promover la transformación de células epiteliales normales de humano a células mesenquimales, y estas proteínas oncogénicas pueden acelerar la transformación maligna del tumor por medio de la inducción de la TEM. En los procesos de tumorigénesis y progresión, los factores de transcripción de acción mutua, proteínas cinasas del tumor y otros factores regulatorios pueden dar resultados anormales en la expresión de marcadores de TEM. Por ejemplo, los rearrreglos del citoesqueleto, la baja expresión de queratina y la sobre-expresión de Vimentina todos pueden causar cambios celulares fenotípicos en la matriz de adhesión celular (Jian, et al. 2015).

2.5.5 DENSIDAD MICROVASCULAR (DMV)

De igual manera, otros factores celulares se asocian a la presencia de nuevos vasos sanguíneos que permiten la sobrevivencia y desarrollo tumoral. Dentro de estos, la expresión del receptor CD31 en la superficie de las células endoteliales está bien establecido para monitorear la densidad vascular en tejidos tumorales. Evaluaciones colposcópicas del cérvix han encontrado vasos sanguíneos atípicos con formas irregulares y un aumento de la DMV (cuantificando el número de vasos mediante la expresión de CD31) que caracteriza un fenotipo más agresivo (Randall, et al. 2009).

El aumento en la DMV se asocia con la alteración de otros marcadores derivados del endotelio vascular como el factor VIII, el receptor CD34, la interleucina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y VEGF (Kainz, et al. 1995). Un estudio que valoró 117 mujeres con carcinoma de cérvix estado IBII, encontró una relación directa y proporcional entre la expresión de VEGF, la invasividad tumoral, el compromiso ganglionar y el volumen de la neoplasia (Lee, et al. 2002).

3. REVISIÓN DE LITERATURA

La búsqueda de artículos para esta investigación se realizó en metabuscadores como: Pubmed, Pubmed central, Artemisa, entre otros (Cuadro 1). Basando la búsqueda en la pregunta de investigación e involucrando las variables independientes y dependientes de éste estudio.

Se usó el acrónimo en inglés PEOS que se define mediante: Patient, Exposition, Outcome y Study.

P: Mujeres con cáncer de cérvix.

E: Expresión mediante IHQ de proteínas: EGFR, VEGF, E-caderina, Vimentina y CD31.

O: Supervivencia Global (SG).

S: Cohorte.

Cuadro 1. Evidencia de búsqueda científica: biomarcadores en CaCu como factores pronóstico.

Publicación (Autor, Año)	Objetivo	Muestra	Resultados de Expresión IHC	Conclusiones
(Ueda, et al. 2017) Japón Sapporo Medical University Hospital	Evaluar co-expresión de múltiples receptores RTKs, EGFR , HER2 y c-Met por IHC y correlacionar la expresión con factores clínicos patológicos como pronóstico.	53 casos con adenocarcinoma cervical 2004 - 2012	<p>Evaluó EGFR en células epiteliales de tumor con tinción en membrana; Positivo (++, +++); Negativo (-, +).</p> <p>EGFR positivo en 17 (32.1%), incluyendo 7 (13.2%) y 10 (18.9%) casos con una puntuación de inmunoreactividad de 3+ y 2+, respectivamente.</p>	<p>La positividad de EGFR se asoció con metástasis en los ganglios linfáticos y el estadio, lo que resulta del rol conocido del EGFR en proliferación, invasividad y migración de células tumorales. Sin correlación entre la positividad de EGFR y el pronóstico de los pacientes como ya se ha reportado.</p> <p>Se ha observado la discrepancia similar en otros tumores como de vías biliares y carcinoma hepatocelular.</p>
(Bodner, et al. 2011) Austria Vienna Department of gynecology and obstetrics University Hospital	Evaluar expresión de p16 y EGFR IHC para determinar la influencia pronostica, asociación de su expresión y parámetros clínicos patológicos.	39 casos con adenocarcinoma cervical 1994 - 2006	<p>Evaluó EGFR en células tumorales a nivel membrana, citoplasma o ambas; Positivo: (+, ++, +++) Negativo: tinción citoplasmática (-)</p> <p>EGFR expresó en 17(44%) casos. + 7(18%), ++ 3(8%) y +++ 7(18%).</p>	<p>La investigación de p16 y EGFR tiene un uso limitado para evaluar pronóstico en los pacientes y como guía para su manejo clínico.</p> <p>No existió correlación estadísticamente significativa entre la expresión de EGFR y parámetros clínico-patológicos, así como No influyó en la SLE ni en la SG ($p>0,05$).</p>
(Pérez-Regadera, et al. 2009)	Determinar el impacto de la coexpresión de EGFR y c-erbB-2 respecto a la SLE y SLP.	170 casos con CaCu localmente avanzados 1994 - 2007	<p>Evaluó la inmunoreactividad positiva en membrana celular con el % de EGFR Negativo (-) ni una célula expresa EGFR y (+) 1-30% Positivo (++) 31-69% y (+++) >69% células expresadas con EGFR. 45 (26%) casos fueron EGFR positivos. Mostrando la positividad de EGFR como un factor predictivo independiente de pobre pronóstico.</p>	<p>La coexpresión de EGFR y c-erbB-2 son factores predictivos independientes de mala SLE y SLP en pacientes con CaCu.</p> <p>Resultados atribuidos a un incremento intrínseco en la agresividad del tumor producida por la presencia de homodimerización o heterodimerización.</p> <p>La sobreexpresión de EGFR esta asociada con mayor resistencia a radioterapia y una baja sensibilidad a cisplatino en distintos tipos de tumores.</p>

Cuadro 1. (continuación) Evidencia de búsqueda científica: biomarcadores en CaCu como factores pronóstico.

Publicación (Autor, Año)	Objetivo	Muestra	Resultados de Expresión IHQ	Conclusiones
(Nagy, et al. 2011) University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca	Determinar el valor pronóstico de marcadores VEGF , VEGFR , EGFR , COX-2 y DMV (CD34) en tumor, angiogénesis y su implicación en un aumento de la eficacia del tratamiento concurrente.	54 casos 44 con células de carcinoma escamoso localmente avanzado 10 de cérvix normal 2009 - 2010	Evaluó VEGF , VEGFR , por PCR y en suero EGFR , por IHQ se evaluó la intensidad en la expresión del citoplasma y la proporción en células positivas, COX-2 y DMV (CD34) IHQ. Usando el método Hot spot cuantificando en área de tumor, 3 campos microscópicos x200.	La DMV fue mayor en tejido tumoral que en tejido normal. Demostraron que la respuesta al tratamiento en CaCu está relacionada con la expresión de VEGFR2 como mRNA. La interrelación entre los diferentes biomarcadores demostraron la complejidad en el proceso de progresión del tumor. Y la importancia del uso de una batería de ensayos moleculares para predecir la respuesta clínica y ayudar a un tratamiento individualizado.
(Zhang, et al. 2017) China	Valor pronóstico de la sobreexpresión de VEGF en pacientes con CaCu: un meta-análisis	14 artículos elegibles 1306 pacientes incluidos con resultados de supervivencia 2000 - 2011	Evaluaron la expresión de VEGF por IHQ (10), ELISA (3) y RT-PCR (1). Los resultados sugieren que la expresión fuerte de VEGF puede ser considerado como un biomarcador predictivo en CaCu y como factor pronóstico en la práctica clínica.	La sobreexpresión de VEGF o VEGF-C se asoció con una baja supervivencia en pacientes con CaCu. Los hallazgos sugieren que la terapia de inhibición del VEGF podría tener un papel importante en el CaCu y el VEGF podría examinarse rutinariamente para predecir el pronóstico en pacientes con CaCu. La FDA en 2014 aprobó el uso de bevacizumab en CaCu, suprimiendo la actividad biológica del VEGF
(Baohua, et al. 2016) Hospital school of medicine, Zhejiang University	Examinar la expresión de E-, P- y N- caderina en tejido de epitelio escamoso cervical normal, NIC y estadios tempranos de carcinoma escamoso cervical por IHQ	508 casos con lesión cervical 2006 - 2010	Expresión evaluada de manera independiente por 2 patólogos : La intensidad en membrana de la expresión de E-caderina en células tumorales (0) <10%, 1 (10 a <50%) y 2 (≥ 50%). Expresión de E-caderina en epitelio de cérvix normal 97.9%, Expresión reducida de E-caderina en NIC 10.2% y en SCC 27.5%.	La expresión de E-caderina disminuyó gradualmente desde el epitelio normal, NIC a SCC. La expresión de E-caderina y P- caderina se asoció significativamente con algunas variables clínicas indicativas de mal pronóstico en términos de supervivencia en pacientes con SCC en estadio temprano. E-caderina puede ayudar en el diagnóstico de las NIC e indicar el pronóstico en pacientes en etapa temprana de SCC.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los esfuerzos encaminados a la detección oportuna del cáncer de cérvix, continua siendo un problema de salud pública sobre todo en países en desarrollo como nuestro país, con un impacto relevante en términos de mortalidad y morbilidad. Se ha reportado que 80% de pacientes con CaCu se diagnostica en etapa localmente avanzada y un 50% de estas pacientes progresan después del tratamiento estándar basado en quimioterapia-radioterapia concomitante con cisplatino, por lo que los tratamientos en etapas recurrentes son limitados en términos de supervivencia global.

El alto porcentaje de progresión al tratamiento, indica que el CaCU posee mecanismos asociados de resistencia o bien, que le proporcionan ventajas mediante las cuales es capaz de persistir, sin que al momento sea claro el papel que juegan los procesos de angiogénesis y TEM en este fenómeno.

5. JUSTIFICACIÓN

Si bien existe detección temprana del CaCu, muchos de estos casos progresarán y a la fecha no existen biomarcadores que sean capaces de detectar a las pacientes en riesgo de resistencia a tratamiento. Con este trabajo se intentan establecer factores pronóstico que permitan predecir que pacientes fallarán a la terapia basada en quimioterapia radioterapia concomitante, para establecer un manejo mas personalizado o prolongado en pacientes con CaCu localmente avanzado. La importancia del estudio es que actualmente existe evidencia donde se reporta de manera individual un aumento de la DMV mediante CD31 y la sobre expresión de ciertas proteínas, que van de un 60% a un 90%, mismas que incluyen al EGFR, VEGF, Vimentina y un decremento en la expresión de E-caderina. Sin embargo, se han evaluado de manera aislada, por lo que resulta necesario evaluarlos como parte de un panel de Biomarcadores que podrían estar involucrados en la supervivencia global de pacientes con CaCU localmente avanzado para ser considerados en la creación de modelos predictivos que sirvan como factores pronósticos.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una asociación entre la expresión proteica de marcadores de Transición epitelio-mesenquimal y angiogénesis, con la supervivencia global de pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de México?

7. HIPÓTESIS

La pérdida de expresión de E-Cadherina, la sobre expresión de VEGF, EGFR, Vimentina y el aumento de la densidad microvascular (CD31) en pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado, servirán como factores pronósticos en CaCu localmente avanzado en términos de SG.

8. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la asociación de los marcadores de transición del epitelio-mesenquimal (E-caderina y Vimentina), EGFR, VEGF y la densidad microvascular con la supervivencia global de pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado del INCan.

ESPECÍFICOS

Determinar las características clínicas y demográficas de pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado que hayan recibido tratamiento estándar en el INCan de México.

Evaluar la expresión de los marcadores celulares de TEM: E-cadherina y Vimentina así como de Angiogénesis: VEGF, EGFR y CD31 en muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado mediante inmunohistoquímica

Evaluar la supervivencia global de pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado en función del grado de expresión de proteínas E-cadherina, Vimentina, VEGF y EGFR.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Cohorte retrospectiva que incluyó pacientes con CaCu en etapas localmente avanzadas en estadio clínico IB2 a IVA.

9.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes con diagnóstico histopatológico de CaCU localmente avanzado atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), ubicado en la zona sur de la Ciudad de México. Av. San Fernando N° 22, Alcaldía de Tlalpan, durante el periodo 1999-2005.

9.2.1 TAMAÑO MUESTRAL

Se calculó el tamaño de muestra mediante la fórmula de una proporción para poblaciones infinitas considerando un alfa de 95%, un error del 10%, un 27.5% de probabilidad que ocurra la expresión de las proteínas en los casos de CaCu localmente avanzado, con base en el referente teórico del estudio de Baohua y cols., el cual documentó por inmunohistoquímica la expresión de E-caderina en epitelio de cérvix normal del 97.9%, una expresión reducida de E-caderina en NIC 10.2% y en SCC de **27.5%** (Baohua , et al. 2016), finalmente se adicionó un 20% por las probables pérdidas.

$$n = \frac{Z\alpha^2 \times P_o \times q_o}{d^2}$$

Donde:

$$Z\alpha = 1.96$$

$$d = 0.1$$

$$P_o = 0.275$$

$$q_o = (1 - P_o) = (1 - 0.275) = 0.725$$

$$n = \frac{3.8416 \times 0.275 \times 0.725}{0.01} = \frac{0.7659}{0.01} = 76.59$$

$$n = 76.59 + 15.32 (20\%) = 91.9$$

n= 92 casos

Por lo anterior, se deben incluir 92 pacientes que cumplan con los criterios de selección.

9.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Bloques confirmatorios de tejido tumoral (evaluados por patología) para su análisis inmunohistoquímico.
- Confirmación histológica de cáncer cervicouterino estadiado en etapas clínicas localmente avanzadas (E.C. IB2- IVA), participantes de cohortes de 1999-2005.
- Histología epidermoide, adenoescamoso y adenocarcinoma.
- Sin tratamiento previo
- Enfermedad medible
- Edad entre 24 y 70 años.
- Estado funcional de 0-2 de acuerdo a los criterios de la OMS
- Función hematológica, renal y hepática de acuerdo a los siguientes parámetros: Hb igual o mayor de 10 g/L (los pacientes pudieron transfundirse previo al tratamiento y ser incluidos una vez que alcanzaron 10gr de Hb), Leucocitos mayores o igual a 4,000/mm³. plaquetas igual o mayores a 100,000/mm³, Bilirrubina total menor de 1.5 veces el valor normal. Transaminasas menores de 1.5 veces el valor normal y Renal: Creatinina menor o igual a 1.2.
- Que hayan recibido tratamiento con fines curativos incluyendo QT-RT con CDDP a 40 mgs/m² con o sin Gemzar a 125 mgs/m² seguido de Braquiterapia convencional de baja tasa y seguimiento de por lo menos 5 años.

CRITERIO DE EXCLUSIÓN

- Pacientes que no tengan información completa en expedientes clínicos.

9.4 DEFINICIONES OPERACIONALES

Cuadro 2. Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala
Edad	Años cumplidos desde el nacimiento al día del diagnóstico de Cáncer cervicouterino.	Fechas extraídas de los expedientes clínicos de las pacientes.	Cuantitativa continua	Número entero en años
ECOG	<p>Escala de medida de la repercusión funcional.</p> <p>0. Actividad normal sin restricción ni ayuda</p> <p>1. Actividad restringida. Deambula</p> <p>2. Incapacidad para cualquier actividad laboral. Menos del 50% del tiempo encamado</p> <p>3. Capacidad restringida para los cuidados y el aseo personal. Mas del 50% del tiempo encamado</p> <p>4. Incapacidad total. No puede cuidar de sí mismo. El 100% del tiempo encamado</p>	<p>Índice elaborado por el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), que mide la repercusión funcional de la enfermedad oncológica en el paciente como criterio de progresión.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>
Tipo histológico	Clasificación de la estructura microscópica que presentan las células.	Dato recabado de expediente clínico en la nota de anatomía patológica: Tipo histológico de la biopsia en el diagnóstico de CaCu.	Cualitativa nominal	<p>1. Carcinoma epidermoide</p> <p>2. Adenocarcinoma</p> <p>3. Carcinoma adenoescamoso</p>
Estado nutricional	El indicador internacional para evaluar el estado nutricional en adultos es mediante índice de masa corporal (IMC).	El IMC se determinó de acuerdo a la clasificación de la OMS.	Cualitativa ordinal	<p>1. Bajo peso</p> <p>2. Peso normal</p> <p>3. Sobre peso</p> <p>4. Obesidad</p> <p>5. Obesidad mórbida</p>
Tamaño tumoral	Tamaño bidimensional o unidimensional de un tumor medido por algún medio de imagen (TAC o RM) o patología.	Valor resultado de la suma de los diámetros mayores de todas las lesiones diana detectadas.	Cuantitativa continua	Número entero en milímetros

Cuadro 2. (continuación) Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala
	Estadificación clínica definida por la modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en el año 2009.			
Estadio clínico	<p>IB1. Lesión clínicamente visible \leq de 4cm en su dimensión mayor.</p> <p>IB2. Lesión clínicamente visible $>$ de 4cm en su dimensión mayor.</p> <p>IIA. Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial.</p> <p>IIA2. Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial $>$ de 4cm.</p> <p>IIB. Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica.</p> <p>III. El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.</p>	<p>Clasificación clínica en etapa localmente avanzada descrita con estudio histopatológico mediante una biopsia dirigida del tumor.</p> <p>Dato reportado en el expediente clínico; físico y/o electrónico mediante INCaNet por patología.</p>	<p>Cualitativa nominal</p>	<p>1. IB1</p> <p>2. IB2</p> <p>3. IIA</p> <p>4. IIA2</p> <p>5. IIB</p> <p>6. III</p>
Procedencia	Lugar de residencia habitual en el que la persona vive en el momento de la entrevista.	Se obtuvo del expediente, en el cual la paciente refiere su Estado de procedencia de la República Mexicana.	Cualitativa nominal	<p>1. CdMx</p> <p>2. Guanajuato</p> <p>3. Guerrero</p> <p>4. Hidalgo</p> <p>5...., etc.</p> <p>0. Ninguna</p> <p>1. Primaria</p> <p>2. Secundaria</p> <p>3. Preparatoria</p> <p>4. Otra</p>
Escolaridad	Años de escolaridad cursados al momento de la entrevista.	Se obtuvo del expediente, en el cual la paciente refiere su último grado de estudios.	Cualitativa ordinal	<p>1. Soltera</p> <p>2. Casada</p> <p>3. Separada</p> <p>4. Divorciada</p> <p>5. Viuda</p> <p>6. Unión libre</p>
Estado civil	Situación civil en que se encuentra la persona por razón de circunstancias particulares en relación al matrimonio, al momento de la entrevista.	Se obtuvo del expediente, en el cual la paciente refiere su situación civil.	Cualitativa nominal	<p>1. Ama de casa</p> <p>2. Empleada</p> <p>3. Desempleada</p> <p>4. Comerciante</p> <p>5. Otra</p>
Ocupación	Actividad principal remunerativa que desempeña una persona al momento de la entrevista.	Se obtuvo del expediente, en el cual la paciente refiere su ocupación.	Cualitativa nominal	<p>1. Ama de casa</p> <p>2. Empleada</p> <p>3. Desempleada</p> <p>4. Comerciante</p> <p>5. Otra</p>

Cuadro 2. (continuación) Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala
Tratamiento	<p>Tratamiento médico, quirúrgico o farmacológico para tratar una determinada enfermedad al momento del diagnóstico de la enfermedad.</p> <p>Cambios en los diámetros mayores de las lesiones blanco considerando: Respuesta Completa. Desaparición de todas las lesiones diana Respuesta Parcial. Reducción de al menos 30% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de los diámetros mayores de la enfermedad. Enfermedad Progresiva. Incremento de al menos el 20% en la suma de los diámetros mayores de base Enfermedad Estable. Reducción no suficiente para calificar como RP o incremento insuficiente para calificar como EP, tomando como referencia la suma más pequeña de los diámetros mayores desde el inicio del tratamiento</p>	<p>Esquema de tratamiento de QT RT concomitante contra CaCu localmente avanzado, aplicado a pacientes.</p> <p>Diagnóstico radiológico basado en los criterios RECIST, con el estado de la enfermedad. Se evaluó con TAC y/o resonancia Magnética (RM) la respuesta a través del reporte por el radio-oncólogo.</p>	<p>Cualitativa nominal</p> <p>Cualitativa nominal</p>	<p>1. Cisplatio 2. Cisplatino + Gemzar®</p> <p>0. Respuesta completa 1. Respuesta parcial 2. Enfermedad estable 3. Enfermedad progresiva</p>
Enfermedad recurrente/persistente	<p>Enfermedad recurrente se define como el recrecimiento local del tumor o el desarrollo de metástasis a distancia, detectadas seis meses o más después de la regresión completa de la lesión tratada; en tanto que si se detecta dentro de los primeros seis meses después de completar el tratamiento primario, se le denomina persistencia</p>	<p>Registrada en el expediente clínico de acuerdo a los criterios clínicos.</p>	<p>Cualitativa nominal</p>	<p>0. Recurrente 1. Persistente</p>
Metástasis	<p>Proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. Organos afectados con al menos un tumor diferente al del tumor primario.</p>	<p>Sitio anatomopatológico donde por medio de TAC o RM se reportan en expediente clínico los sitios de metástasis.</p> <p>Tiempo entre la fecha de ingreso al estudio y la fecha de muerte o de última visita en caso de pacientes perdidas.</p>	<p>Cualitativa nominal</p>	<p>0. Sin metástasis 1. Con metástasis</p>
Sobrevida global	<p>Tiempo transcurrido entre la inclusión de la paciente y la falla, en este caso muerte.</p>		<p>Cuantitativa continua</p>	<p>Número entero en Meses</p>

Cuadro 2. (continuación) Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala
Expresión	Determinación del perfil inmunofenotípico por IHQ en cortes de tejido independientes la expresión de las proteínas EGFR, VEGF y E-caderina, evaluándose como:	La Patóloga determinó en el microscopio la inmunoreactividad de las proteínas:		
E-caderina	Negativa (-) ninguna célula tumoral expresó la proteína (+) expresión débil; de 1-30 % en células	EGFR ; a nivel de membrana y citoplasma. E-caderina ; a nivel de membrana. VEGF ; de forma nuclear y citoplasmática.	Cualitativa Nominal	0. Negativa 1. Positiva
EGFR	Positiva (++) expresión moderada; de 31-69% de células (+++) expresión fuerte; > 69% de células teñidas	Solamente en células tumorales.		
VEGF	Determinación del perfil inmunofenotípico de Vimentina por IHQ, determinándose como: Negativa (-) ninguna célula tumoral expresó Vimentina, aún cuando el estroma sea de expresión positiva Positiva (+) células tumorales teñidas sobre el transfondo sano, aún cuando el estroma sea de expresión positiva	La Patóloga determinó en la inmunoreactividad observada de Vimentina en el microscopio a nivel de citoplasma en células tumorales.	Cualitativa Nominal	0. Negativo cél. tumorales/Positivo estroma 1. Positivo cél. tumorales/Positivo estroma
Expresión Vimentina	Cuantificación del número de vasos sanguíneos expresados mediante IHQ por el anticuerpo CD31. Lectura en el microscopio de acuerdo al método "hot spot"; identificando áreas de mayor vascularización y contando microvasculatura en tres campos de las regiones del tumor mas vascularizadas. Evitando áreas necróticas o escleróticas	La Patóloga evaluó la densidad de vasos sanguíneos en zonas con gran vascularización de células tumorales teñidas	Cuantitativa continua	Número entero
DMV				

9.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

9.5.1 RECOLECCIÓN DE DATOS DEMOGRÁFICOS DE LAS PACIENTES

La información se obtuvo de 120 expedientes clínicos físicos y electrónicos (INCAnet) de mujeres diagnosticadas con CaCu localmente avanzado (Etapas Clínicas FIGO IB2-IVA), tratadas con quimio-radioterapia y braquiterapia en el INCAn.

Examiné y registré los datos en una base de datos diseñada para tal fin, usando el paquete estadístico SPSS® ver21.0 (IBM software, Chicago, IL, EE.UU). Se consideraron y analizaron diversas variables clínico-patológicas (edad, grado de escolaridad, estado funcional basal cuantificado por el índice de ECOG, histología tumoral, graduación tumoral, estado tumoral, dimensiones del tumor primario en milímetros, presencia de ganglios pélvicos sugestivos de compromiso metastásico), esquema y dosis de la radioterapia pélvica y braquiterapia intracavitaria, dosis y número de ciclos de quimioterapia. Se realizó un análisis IHQ de cada una de las proteínas y se determinó el estado al final de las pacientes durante el seguimiento (viva o muerta, con o sin enfermedad) y la respuesta al Tratamiento (utilizando los criterios RECIST 1.1).

9.5.2 DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Se obtuvieron los bloques de parafina de las biopsias de las pacientes incluidas en el estudio al momento del diagnóstico, de los cuales se realizaron cortes de 2 μ M de espesor y montados en laminillas electrocargadas.

La Patóloga Dra. Delia Pérez perteneciente al INCAn, determinó la adecuada calidad del tejido para la evaluación por inmunohistoquímica de las proteínas y evaluó la expresión de estas.

La técnica de inmunohistoquímica de las proteínas en cada muestra las realicé en el laboratorio de investigación N° 2 del INCAn a cargo del Dr. Joaquín Manzo Merino. Siguiendo la metodología del procedimiento inmunohistoquímico que se ilustra a continuación (Figura 1) y posteriormente se describe.

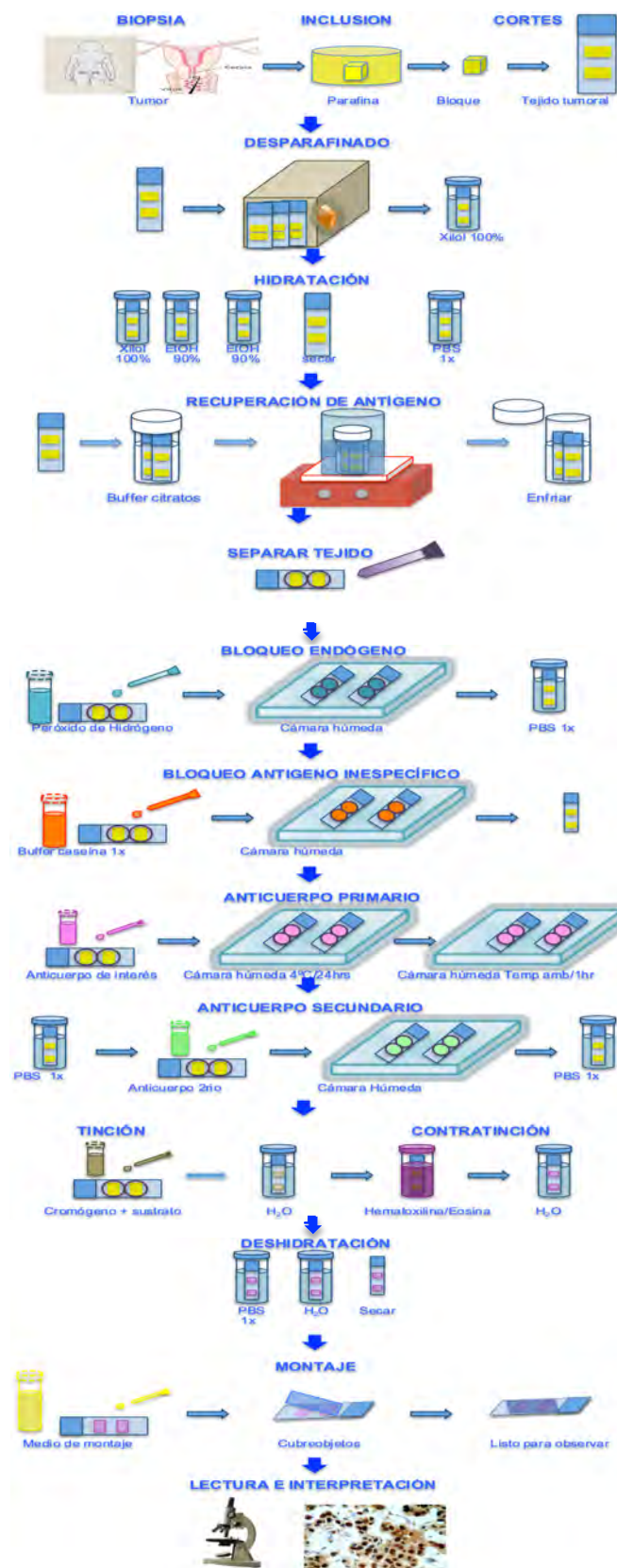


Figura 1. Diagrama general del procedimiento de inmunohistoquímica. Las condiciones empleadas para cada anticuerpo se sumarán en el Cuadro 7.

9.5.3 METODOLOGÍA DEL PROCEDIMIENTO INMUNOHISTOQUÍMICO

Una vez incluidas las pacientes al estudio, se procedió a obtener los bloques de parafina correspondientes a las biopsias del diagnóstico para realizar cortes de 2 μ M de espesor y analizar la expresión de EGFR, VEGF, E-caderina, Vimentina y CD31(para DMV).

El tejido obtenido de la se fijó en formol al 10% y embebido en parafina. Se procedió a realizar cortes de 2 μ M de espesor con el uso de un micrótomo. Los cortes se colocaron en una laminilla electrocargada. Las laminillas se sometieron a un proceso de desparafinación, hidratación del tejido y posteriores lavados con etanol y agua. Se realizó la recuperación de antígenos utilizando presión y temperatura. Posteriormente, se incubó el anticuerpo primario, se lavó y consecuentemente se incubó el anticuerpo secundario. Una vez lavado, se procedió al revelado del complejo antígeno-anticuerpo utilizando Diaminobencidina (DAB) la cual genera un precipitado color marrón. Se realizó una contratinción utilizando hematoxilina. Finalmente se realizó el montaje y posterior observación del resultado a través de un microscopio de luz transmitida.

9.5.4 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE EGFR

Para la tinción de EGFR seguí el proceso descrito de la técnica de inmunohistoquímica. La expresión de EGFR fue detectada empleando el anticuerpo policlonal EGFR 1005 (SC-03) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) en una dilución 1:50. Para los controles se empleó tejido de cérvix normal con exposición del anti-EGFR para los controles positivos y los controles negativos se procesaron sin exposición al anticuerpo primario. Los casos se consideraron negativos si ninguna de las células tumorales expresa EGFR y como expresión positiva de EGFR si las células tumorales estuvieron teñidas a nivel membrana y citoplasma sobre el trasfondo sano o sobre el control negativo.

9.5.5 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VEGF

Siguiendo el proceso descrito de la técnica de inmunohistoquímica se realizó la tinción para VEGF. Su expresión fue detectada empleando el anticuerpo policlonal VEGF A20

(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) en una dilución 1:25. Como controles se emplearon muestras de tumor de rata (angioblastoma), con la diferencia que los controles negativos fueron sin exposición al anticuerpo primario. Los casos se consideraron positivos con la inmunoreactividad nuclear y citoplasmática en células tumorales teñidas sobre el trasfondo sano o sobre el control negativo y como negativos si ninguna de las células tumorales expresó VEGF.

9.5.6 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADERINA

El tejido embebido en parafina se incubó con el anticuerpo anti E-caderina (G-10) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) en una dilución 1:50. Para los controles se empleó tejido humano de páncreas normal, con la diferencia que los controles negativos se realizaron sin exposición al anticuerpo primario. Los casos se analizaron mediante inmunohistoquímica considerando en membrana el nivel de inmunoreactividad y fue catalogado como negativo si ninguna de las células tumorales expresa E-caderina y reactivo positivo si las células tumorales estuvieron teñidas sobre el trasfondo sano o del control negativo.

9.5.7 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VIMENTINA

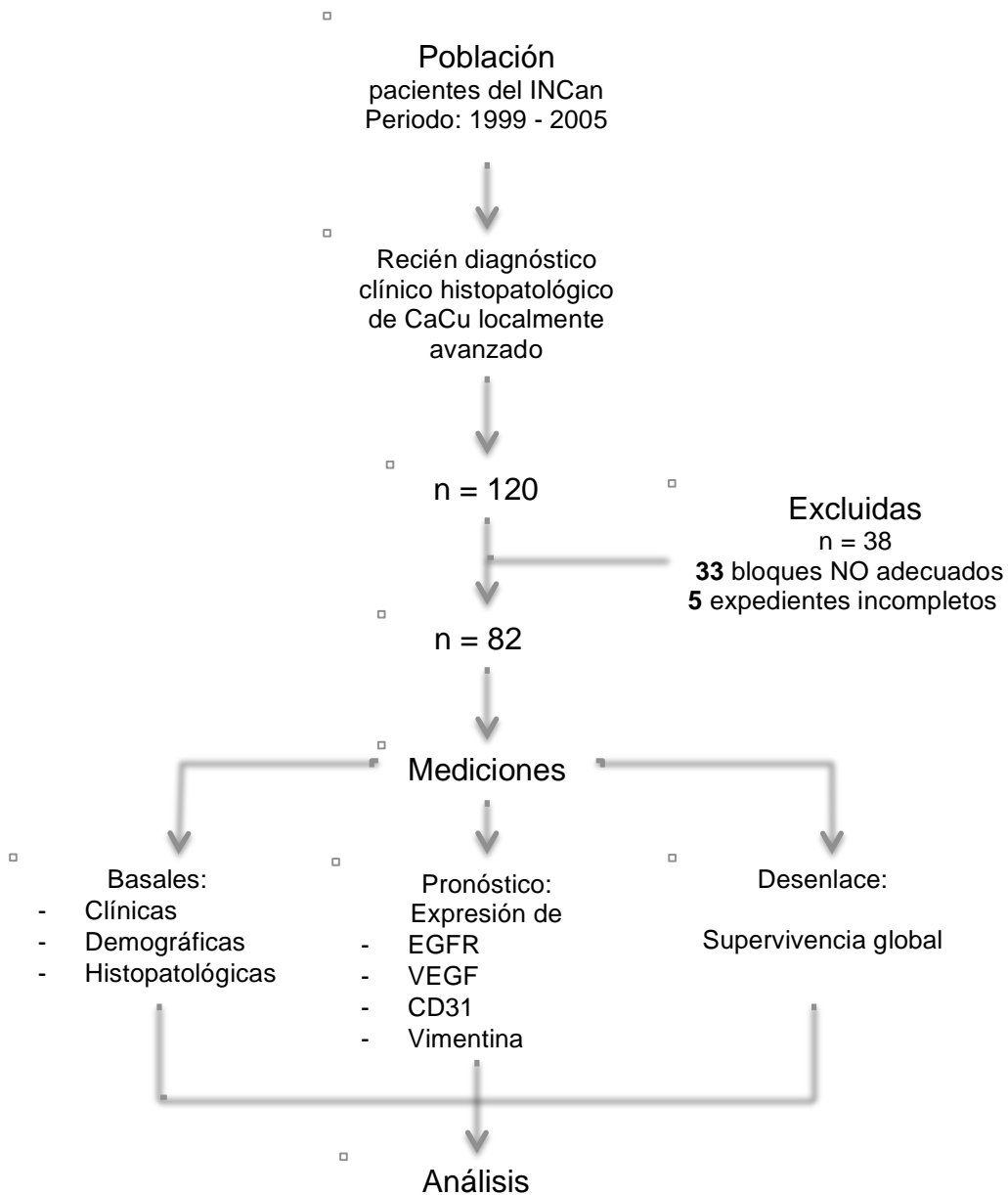
El tejido embebido en parafina se incubó con el anticuerpo anti Vimentin V9 (sc-6260) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) en una dilución 1:50. Como controles se empleo tejido de cáncer de cérvix y los controles negativos se realizaron sin exposición al anticuerpo primario. Los casos se analizaron mediante inmunohistoquímica considerando en citoplasma el nivel de inmunoreactividad y fue catalogado como: negativo si ninguna de las células tumorales expresa Vimentina; reactivo positivo, si estuvieron teñidas células tumorales sobre el trasfondo sano o sobre el control negativo, aun cuando el estroma sea de expresión positiva.

9.5.8 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD MICROVASCULAR

La presencia de vasos sanguíneos fue determinada empleando el anticuerpo anti-CD31, PECAM-1 (H3) (anticuerpo monoclonal, Santa Cruz Bitechology, California, USA) en

una dilución 1:50. La densidad de los vasos sanguíneos se determinó en zonas con gran vascularización, en función de los criterios propuestos por Weidner y colaboradores (1991) (Weidner, et al. 1991). En estas áreas, la densidad de microvascular se midió de acuerdo a lo descrito previamente por Tjalma y col. (1998) y se define en el cuadro 2.

10. DIAGRAMA DE TRABAJO



11. PLAN DE ANÁLISIS

Los datos se capturaron en una base de datos diseñada para el estudio en el programa estadístico SPSS® (IBM software, Chicago, IL, EE.UU) Versión 21. Para determinar si la variable cuantitativa (edad) se distribuyen de forma normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En el análisis descriptivo los resultados fueron descritos como medias, \pm desviación estándar si las variables cumplían con una distribución similar a la curva normal, en el caso de no tenerla se presentaron como mediana e intervalo de confianza al 95%. Para el caso de variables cualitativas u ordinales se reportaron como frecuencias relativas y absolutas. El análisis bivariado en datos cuantitativos paramétricos se realizó con la prueba de *t-student*, en caso de datos cualitativos se compararon mediante un análisis Chi-cuadrada o prueba exacta de Fisher. Para todos los casos, se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Las estimaciones de supervivencia se realizaron utilizando el modelo no paramétrico del límite del producto (método de Kaplan-Meier) para cada curva y sus funciones se compararon con la expresión de cada proteína (EGFR, VEGF, E-caderina y Vimentina), mediante la prueba Log-Rank.

En todos los análisis estadísticos se consideró una significancia estadística con el valor de p menor de 0.05 y los intervalos de confianza se construyeron con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza de 95%).

Los hazard ratio se estimarán por medio del modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox, en caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las proteínas.

12. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proceso para la obtención de muestras se estableció mediante el proyecto que fue sometido y aprobado por el comité de Ética e Investigación del INCan con el registro (013/013/ICI) (CEI/844).

12.1 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

El presente estudio no requiere de consentimiento informado debido a que se utilizaron tejidos almacenados.

12.2 ACUERDOS PARA INDEMNIZACIÓN A LOS PARTICIPANTES POR DAÑOS POTENCIALES DERIVADOS DEL ESTUDIO

De acuerdo a la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y conforme a los aspectos éticos de la investigación los estudios observacionales se consideran de riesgo mínimo, y en este estudio no existe ningún riesgo para la salud

12.3 INGRESOS PARA INVESTIGADORES

No existen ingresos.

12.4 NORMATIVIDAD

El estudio se condujo de acuerdo con lo señalado en la Declaración de Helsinki, Buenas prácticas clínicas y las Normas establecidas en la Ley General de Salud.

13. RESULTADOS

Se analizaron pacientes atendidas en el INCan del año 1999 al 2005 a través de la consulta del expediente físico y electrónico institucional INCAnet ®.

El tamaño de muestra inicial fue de 120 pacientes, de estas se excluyeron 33 pacientes por no contar con bloque confirmatorio de tejido tumoral y otros 5 pacientes por no tener acceso al expediente clínico o carecer de datos completos, conformando un tamaño de muestra final de 82 participantes para el estudio. De las 82 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión de diagnóstico confirmado de CaCU en etapas clínicas localmente avanzadas mediante estudio histopatológico, con histología epidermoide, adenoescamoso y/o adenocarcinoma, vírgenes al tratamiento y posterior a su diagnóstico recibieron tratamiento con fines curativos de QT-RT con CDDP a 40 mg/m² con o sin Gemzar a 125 mg/m² seguido de Braquiterapia convencional de baja tasa y con un seguimiento de por lo menos 5 años.

13.1 CARACTERÍSTICAS BASALES

La cohorte quedó conformada por 82 (100%) pacientes consideradas para éste análisis, de los cuales 38 (46.3%) casos recibieron el tratamiento estándar propuesto por la OMS con cisplatino y 44 (53.7%) casos el tratamiento de cisplatino mas Gemzar ®; del total de pacientes presentaron una media de edad de 50.2 años (DE 9.57), con estatus funcional de 0-1 de acuerdo a la escala funcional de ECOG, presentando en su mayoría un estado nutricional de peso normal y sobrepeso con un (34.1% y 40.2%) respectivamente, evaluado mediante el IMC.

Con respecto a la histología tumoral de mayor prevalencia fue el carcinoma escamoso en un (87.8%), seguido de adenocarcinoma (7.3%) y carcinoma adenoescamoso (4.9%), el (91.5%) de mujeres presentó un tumor igual o mayor a 40mm, las pacientes al inicio del estudio fueron diagnosticadas principalmente en etapas clínicas IIB y IIIB con un (68.3% y 17.1%) respectivamente, características basales (Cuadro 3).

Con la finalidad de demostrar homogeneidad en el grupo de pacientes del estudio, se realizó el análisis por subgrupos dependiendo del tratamiento recibido en cada cohorte, el cual muestra que No existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los siguientes características; edad, histología del tumor, estado nutricional de las pacientes por el indicador IMC y tamaño del tumor, estableciendo un grupo homogéneo inicial de pacientes de CaCu localmente avanzado con base en estas características evaluadas.

Por lo que respecta al estado general de las pacientes en ambos subgrupos fue bueno, de acuerdo a la escala de ECOG que los calificó como 0 y 1, presentando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los subgrupos, lo cual refiere que las pacientes de la cohorte de cisplatino presentan en ECOG de 1; 23 (60.7%) casos con status donde las pacientes presentan síntomas que les impiden realizar trabajos arduos. Respecto a las pacientes que recibieron tratamiento de cisplatino más gemcitabina, la mayoría de estas presentaron un ECOG de 0; de las cuales 29 casos (65.9%) se encontraron totalmente asintomáticas y capaces de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características Basales
n= 82

Característica	Muestra n = 82		CDDP n = 38		CDDP GZR n = 44		P
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Edad (años)							
Media (DE)	50	(9.57)*	52	(10.29)	48	(8.65)	0.07**
ECOG							
0	44	(53.7)	15	(39.5)	29	(65.9)	0.045***
1	38	(46.3)	23	(60.5)	15	(34.1)	
Histología							
Epidermoide	72	(87.8)	34	(89.5)	38	(86.4)	0.203***
Adenocarcinoma	6	(7.3)	1	(2.6)	5	(11.3)	
Carcinoma adenoescamoso	4	(4.9)	3	(7.9)	1	(2.3)	
Estado nutricional por IMC							
Bajo peso	2	(2.4)	0	(0)	2	(4.5)	
Peso normal	28	(34.1)	15	(39.5)	13	(29.5)	0.251***
Sobrepeso	33	(40.2)	15	(39.5)	18	(40.9)	
Obesidad	17	(20.7)	6	(15.8)	11	(25.0)	
Obesidad mórbida	2	(2.4)	2	(5.2)	0	(0)	
Tamaño tumoral (mm)							
< 40	7	(8.5)	1	(2.6)	6	(13.6)	0.116****
≥ 40	75	(91.5)	37	(97.4)	38	(86.4)	
Etapas Clínicas (FIGO)							
IB2	2	(2.4)	0	(0)	2	(4.5)	
IIA	8	(9.8)	1	(2.6)	7	(15.9)	
IIA2	1	(1.2)	1	(2.6)	0	(0)	0.001***
IIB	56	(68.3)	22	(57.9)	34	(77.3)	
IIIA	1	(1.2)	1	(2.6)	0	(0)	
III	14	(17.1)	13	(34.2)	1	(2.3)	

*Prueba de Kolmogorov - Smirnov, **Prueba t-sudent, *** Prueba Chi-cuadrada, **** Prueba exacta de Fisher, todas con significancia de $p < 0.05$

13.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

El perfil de procedencia de las pacientes incluidas en este estudio fue que en su mayoría fueron originarias del Estado de México, Morelos y de la Ciudad de México (Cuadro 4), probablemente debido a que el INCan es una institución de concentración y geográficamente representa una de las opciones más cercanas a estos estados.

La mayoría de las pacientes solo poseían un nivel de estudios elemental, primaria en un (57.3%) y en su mayoría eras mujeres casadas (51.2%) y con ocupación de ama de casa (63.4%).

Cuadro 4. Características Demográficas		n= 82
Característica		n (%)
Procedencia (Estado)		
Cd de México		13 (15.9)
Guanajuato		2 (2.4)
Guerrero		3 (3.7)
Hidalgo		1 (1.2)
Jalisco		2 (2.4)
Estado de México		25 (30.5)
Michoacan		3 (3.7)
Morelos		10 (12.2)
Oaxaca		4 (4.9)
Puebla		6 (7.3)
Tlaxcala		2 (2.4)
Veracruz		7 (8.5)
Chiapas		4 (4.9)
Escolaridad		
Ninguna		21 (25.6)
Primaria		47 (57.3)
Secundaria		12 (14.6)
Preparatoria		2 (2.4)
Estado civil		
Soltera		8 (9.8)
Casada		42 (51.2)
Separada		9 (11.0)
Divorciada		2 (2.4)
Viuda		9 (11.0)
Unión libre		12 (14.6)
Ocupación		
Ama de casa		52 (63.4)
Empleada		3 (3.7)
Desempleada		23 (28.0)
Comerciante		2 (2.4)
Sin dato		2 (2.4)

13.3 CARACTERÍSTICAS DEL TRATAMIENTO

El tratamiento principal fue quimioterapia (Cuadro 5) en dos regímenes: 1) Cisplatino (46.3%) y 2) Cisplatino más Gemzar (53.7%) donde la mayoría de las pacientes completaron 6 ciclos de tratamiento (61%). En su mayoría las pacientes incluidas recibieron braquiterapia (97.6%).

Cuadro 5. Características del Tratamiento		n=82
Parámetro		n (%)
Tipo de Quimioterapia		
Cisplatino		38 (46.3)
Cisplatino + Gemcitabine		44 (53.7)
Ciclos de concomitancia		
3		2 (2.4)
4		10 (12.2)
5		20 (24.4)
6		50 (61.0)
Braquiterapia		
Si		80 (97.6)
No		2 (2.4)

13.4 RESPUESTA AL TRATAMIENTO

La mayor proporción de pacientes tuvo respuesta completa al tratamiento (82.9%) de acuerdo a los criterios de Recist. La mayoría de las pacientes (64.6%) no presentaron recurrencia o progresión de la enfermedad (Cuadro 6).

Cuadro 6. Respuesta al Tratamiento		n= 82
Tipo de respuesta		n (%)
Respondedora		68 (82.9)
No respondedora		14 (17.1)
Respuesta Objetiva según Recist		
Respuesta completa		68 (82.9)
Respuesta parcial		4 (4.9)
Enfermedad estable		1 (1.2)
Progresión de la enfermedad		9 (11.0)
Recurrencia/Progresión		
Sí		29 (35.4)
No		53 (64.6)

13.5 ESTANDARIZACIÓN DE ANTICUERPOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico se expresa en células epiteliales en constante proliferación. Uno de los tejidos más empleados en la estandarización de este anticuerpo es cérvix normal debido a la alta proliferación de las células. Por esta razón se utilizó tejido proveniente de cérvix normal para evaluar la eficacia del anticuerpo EGFR (1005) (SC-03 Santa cruz biotechnology). Se evaluaron distintas diluciones entre ellas 1:100 y 1:50, siendo la dilución 1:50 en cortes de 2 micras de espesor donde se obtuvo una expresión mayoritariamente membranar (Figura 2). La evaluación patológica determinó la eficacia del anticuerpo y las condiciones probadas para analizar los casos.

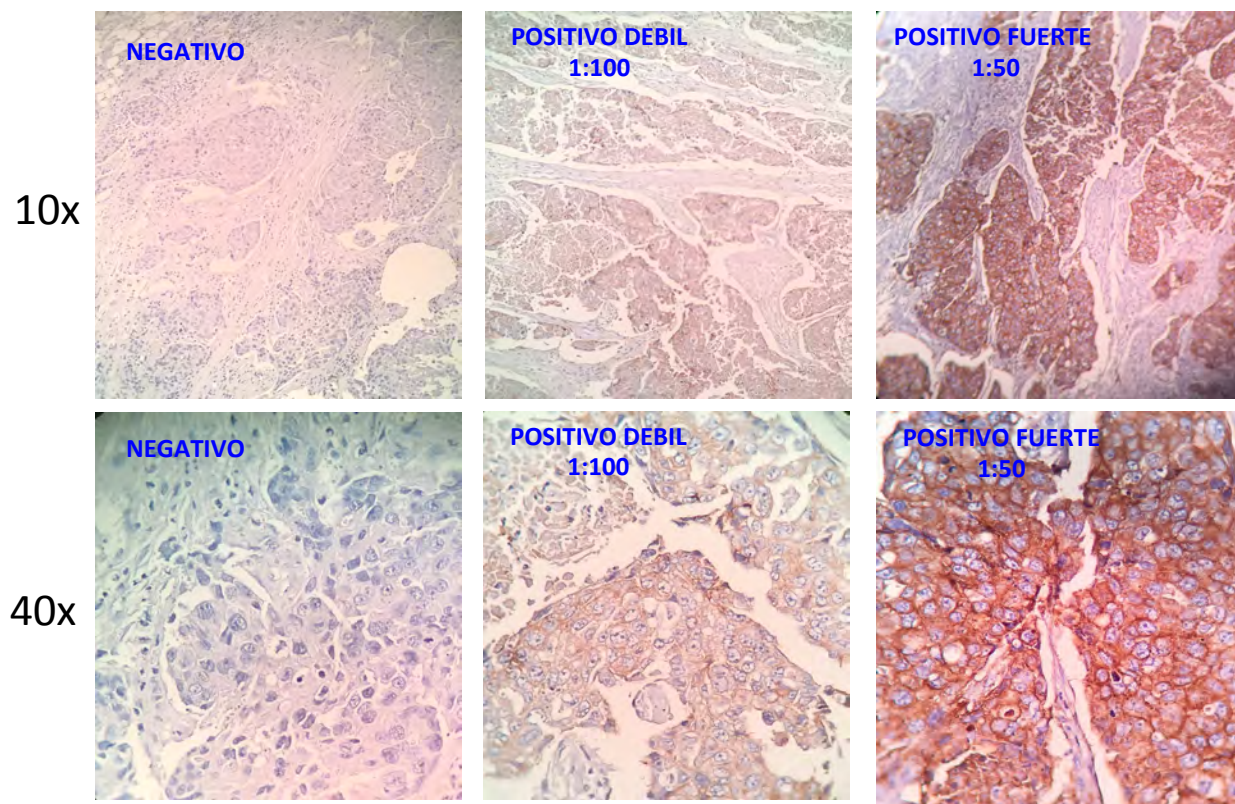


Figura 2. Validación de anti-EGFR en tejido cervical normal (IHC). El anticuerpo anti-EGFR (1005) fue validado en tejido cervical normal. Panel superior imagen tomada con objetivo 10X. Panel inferior, imagen tomada con objetivo 40X. El control negativo careció de anticuerpo primario. La dilución 1:50 mostró una señal fuerte de EGFR mientras que con la dilución 1:100 se obtuvo una señal débil. Se eligió al dilución 1:50.

VEGF

El factor del crecimiento vascular endotelial es una proteína cuya expresión determina la formación de vasos sanguíneos. Los tejidos empleados en la validación de la expresión de VEGF son de angiosarcoma y algunos tejidos con alta tasa de vasculatura como glioblastoma. Para determinar la utilidad del anticuerpo VEGF A20 rabbit Santa Cruz Biotechnology se utilizó glioblastoma de rata como tejido de expresión positivo para VEGF. Las diluciones probadas fueron 1:50 y 1:25 en cortes de 2 micras de espesor. Se determinó que la dilución 1:25 era la concentración óptima para determinar el nivel de expresión de VEGF en los casos (Figura 3). La localización fue mayoritariamente citoplasmática y nuclear, coincidiendo con lo esperado.

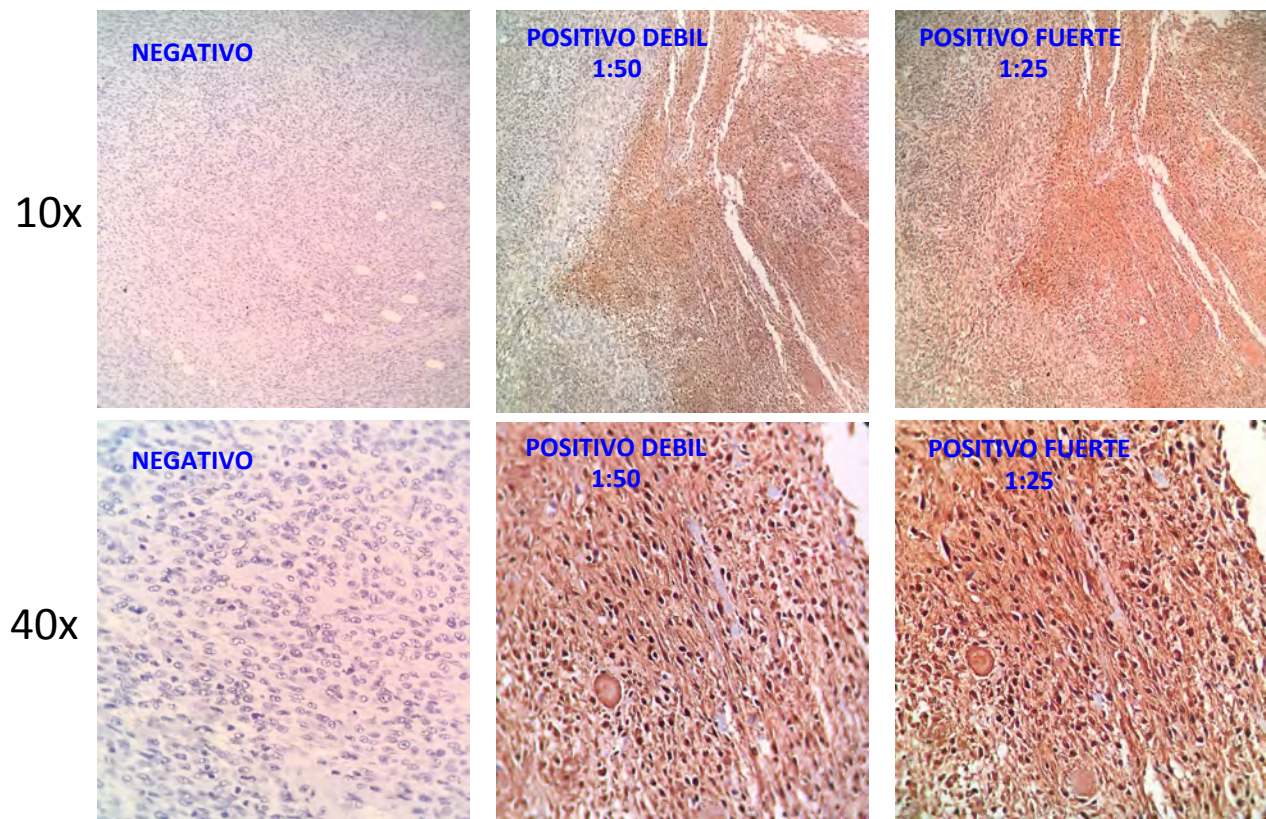


Figura 3. Validación de anti-VEGF en tejido glioblastoma de rata (IHC). El anticuerpo anti-VEGF (A20) fue validado en glioblastoma de rata. Panel superior imagen tomada con objetivo 10X. Panel inferior, imagen tomada con objetivo 40X. El control negativo careció de anticuerpo primario. La dilución 1:25 mostró una señal fuerte de VEGF mientras que con la dilución 1:50 se obtuvo una señal débil. Se eligió al dilución 1:25.

E-CADERINA

La proteína E-caderina se expresa en las uniones adherentes de los epitelios y es un marcador ampliamente utilizado para definir el fenotipo epitelial. Usualmente cualquier epitelio se emplea en la validación de los anticuerpos destinados a determinar la expresión de esta proteína. Para el presente trabajo se utilizaron las diluciones 1:50, 1:100 y 1:200 en tejido de Páncreas y pezón. La evaluación patológica determinó que la dilución 1:50 en Páncreas fue la más óptima para emplearse en la evaluación de los casos a nivel de expresión de membrana principalmente (Figura 4).

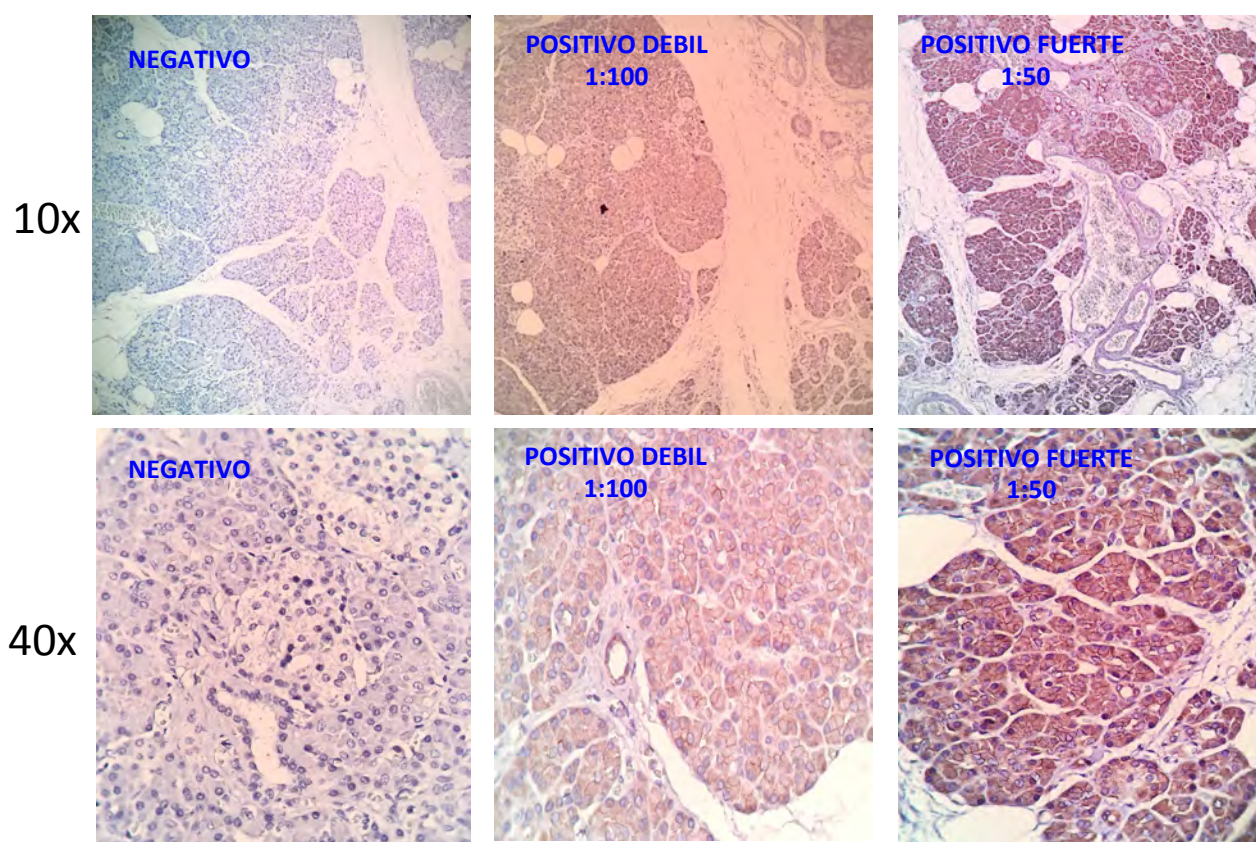


Figura 4. Validación de anti-E-caderina en tejido Páncreas normal (IHQ). El anticuerpo anti-E-caderina (G10) fue validado en tejido de Páncreas. Panel superior imagen tomada con objetivo 10X. Panel inferior, imagen tomada con objetivo 40X. El control negativo careció de anticuerpo primario. La dilución 1:50 mostró una señal fuerte de E-caderina mientras que con la dilución 1:100 se obtuvo una señal débil. Se eligió al dilución 1:50.

VIMENTINA

Vimentina es una proteína expresada en células mesenquimales y cambios en su expresión indican que un tumor está en proceso de TEM. Vimentina es evaluada en tejidos transformados ya que exhiben altos niveles de esta proteína. Como tejido de estandarización se utilizaron cortes de cáncer de cervix con diagnóstico confirmatorio previo. Se empleó una dilución 1:50 y después del análisis patológico se estableció como la dilución adecuada para evaluar los casos (Figura 5).

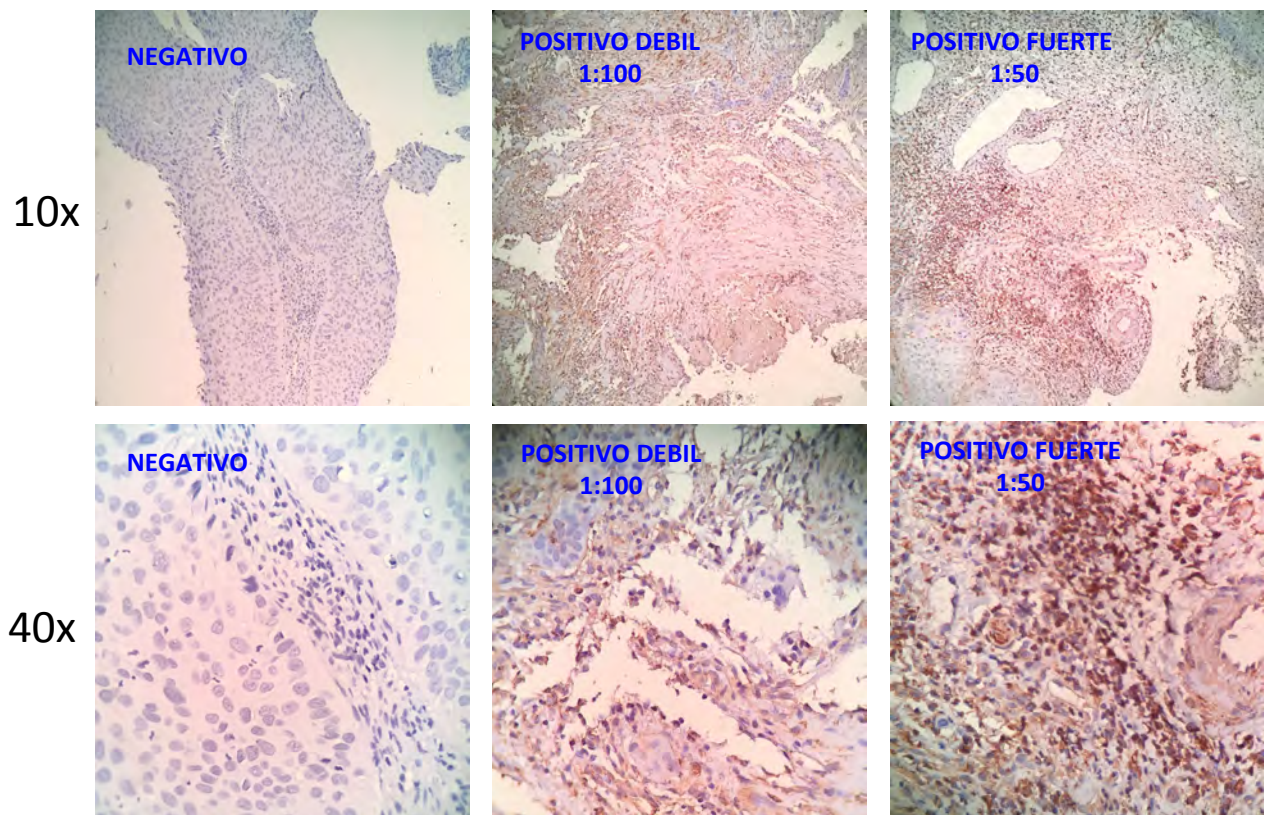


Figura 5. Validación de anti-Vimentina en tejido de Cáncer de cervix con diagnóstico confirmado (IHC). El anticuerpo anti-Vimentina (V9) fue validado en tejido de cáncer de cervix. Panel superior imagen tomada con objetivo 10X. Panel inferior, imagen tomada con objetivo 40X. El control negativo careció de anticuerpo primario. La dilución 1:50 mostró una señal fuerte de Vimentina mientras que con la dilución 1:100 se obtuvo una señal débil. Se eligió al dilución 1:50.

CD31

CD31 es una molécula de adhesión expresada principalmente en células endoteliales. Por lo que niveles elevados de esta molécula están asociados a un proceso de

angiogénesis y en tumores indica un incremento en los niveles de oxígeno para su supervivencia (Liu et al., 2012). Con el fin de validar el anticuerpo para determinar el grado de densidad microvascular en los casos de CaCU, se procedió a evaluar la expresión de CD31 en muestras de placenta humana con el anticuerpo PECAM-1 (H3) Santa Cruz Biotechnology. Se probaron las diluciones 1:50 y 1:100. Después del análisis patológico se determine la dilución 1:50 como la óptima para procesar los casos para evaluar el número de vasos intracelulares como lo demuestra la (Figura 6) (Liu and Guo-Ping 2012).

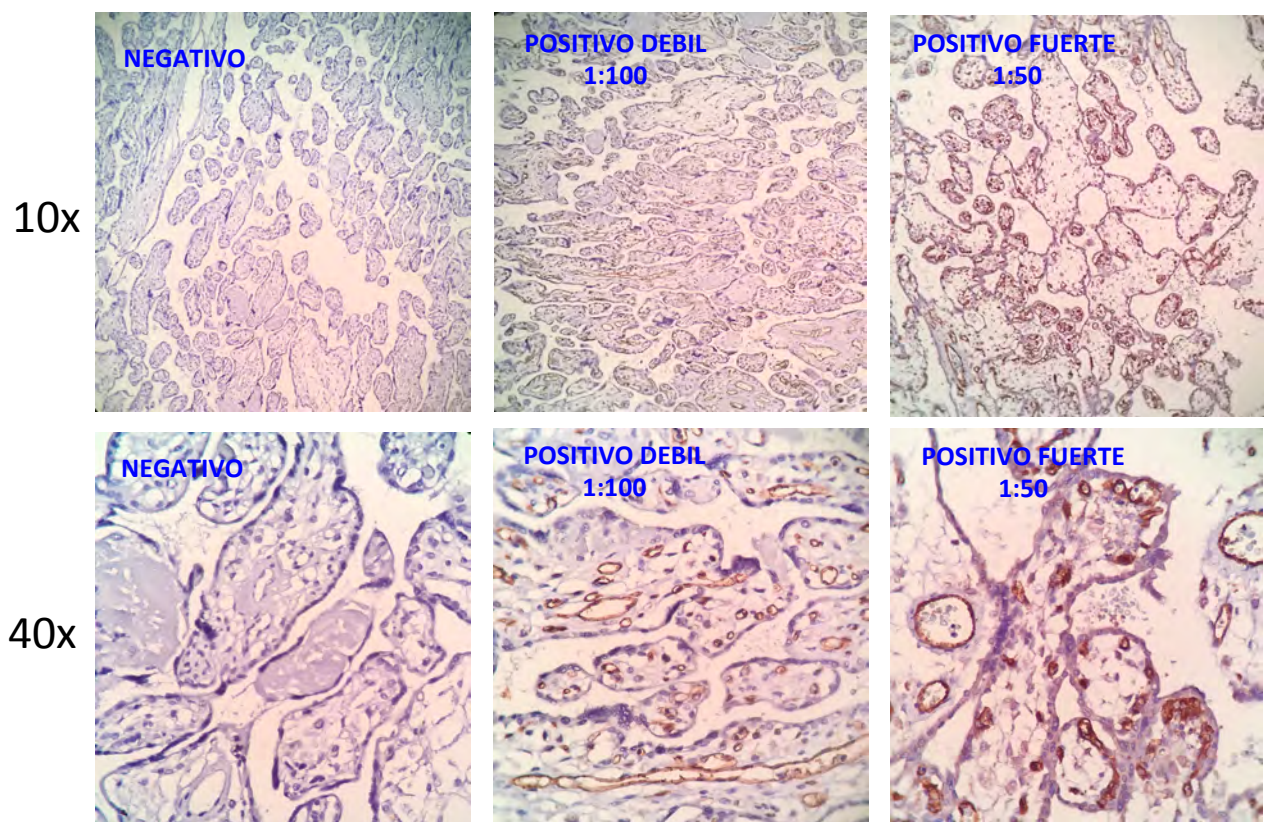


Figura 6. Validación de anti-CD31 en tejido de Placenta humana (IHC). El anticuerpo anti-CD31 PECAM-1 (H3) fue validado en tejido de placenta humana. Panel superior imagen tomada con objetivo 10X. Panel inferior, imagen tomada con objetivo 40X. El control negativo careció de anticuerpo primario. La dilución 1:50 mostró una señal fuerte de CD-31 mientras que con la dilución 1:100 se obtuvo una señal débil. Se eligió al dilución 1:50.

La Patóloga determinó el nivel de expresión de las proteínas de interés, con lo que empleé diversos tejidos, diluciones y condiciones para validar la utilidad de los anticuerpos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Especificaciones de anticuerpos empleados en Inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	Dilución estandarizada	Diluciones de prueba	Tejido control	CODIGO
E- caderina	1 : 50	1:50 – 1:100	Páncreas	(G-10): sc-8426
EGFR	1 : 50	1:50 – 1:100	Cérvix normal	(1005): sc-03
VEGF	1 : 25	1:25 – 1:50	Tumor de rata	(A20): sc-152
PECAM-1 CD31	1 : 50	1:50 – 1:100	Placenta humana	(H3): sc-376764
Vimentina	1:50	1:50 – 1:100	Cáncer de cérvix	(V9): sc-6260

13.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE PACIENTES

Una vez aprobados los controles, evalué mediante IHQ la expresión de los niveles de EGFR, VEGF, E-caderina, Vimentina y CD31 en biopsias de tumor de cuello uterino de las participantes del estudio con diagnóstico de CaCu localmente avanzado (Figura 7).

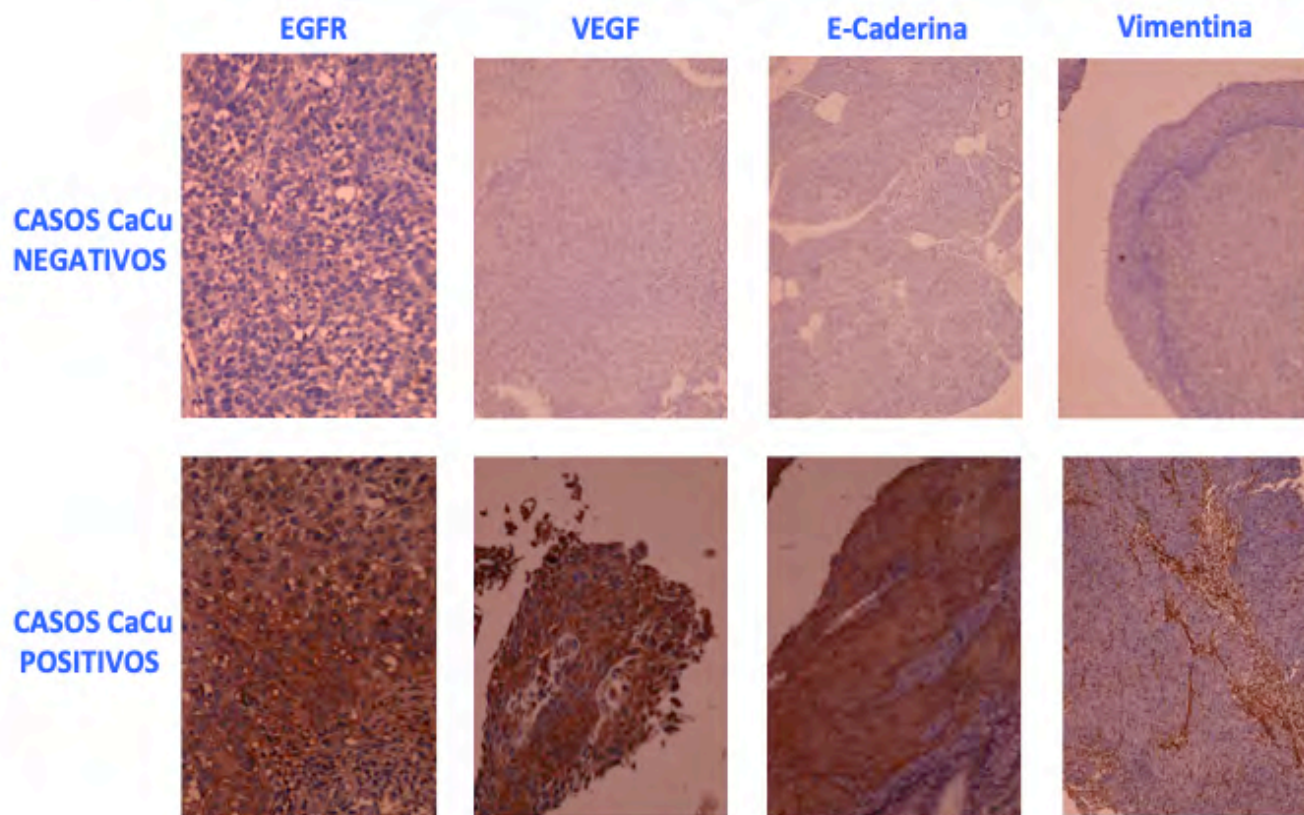


Figura 7. Expresión de niveles de proteínas y marcadores en muestras de CaCu. Panel superior muestra los que se determinaron como casos Negativos y en la parte inferior, los casos Positivos.

De manera importante la expresión de EGFR fue negativa en la mayoría de los casos (96.3%), encontrando únicamente 3 casos positivos (3.7%).

Mientras que la expresión de VEGF mostró un patrón heterogéneo en las muestras analizadas donde el 41.5% de los casos fue débil/negativo y el 58.5% de los mismos mostró una expresión alta (Cuadro 8).

Respecto a los marcadores de TEM, E-caderina y Vimentina, el primero de estos exhibió una positividad débil en la mayoría de los casos (70.7%) indicando que los tumores analizados carecían de la expresión de esta proteína.

Sin embargo al determinar los niveles de Vimentina, únicamente 5 casos (6.1%) demostraron positividad en las células tumorales, mientras que el (93.9%) de los casos fue negativo en células tumorales pero positivo en el estroma (Cuadro 9). Esto indica que los tumores analizados aún no adquieren el fenotipo de TEM probablemente debido a que se trata de casos en un estado local.

La tinción de CD31 para evaluar la DMV fue realizada en todos los casos y al ser analizada por la Patóloga experta se determinó que los casos presentaban una expresión aberrante, causada por el anti-CD31 que presentó expresión en vasos sanguíneos, pero a su vez también citoplasmática, lo cual interfería en la lectura para cuantificar el número de vasos, siendo no clara, ni específica la inmunotinción en las muestras de las pacientes, con lo cual no se puede demostrar un resultado concluyente en términos de DMV.

Por lo que el marcador CD31 no fue considerado en la determinación de la DMV, a pesar de que los controles de tinción en tejido de placenta mostraron una expresión uniforme y acorde a lo reportado en la literatura (Figura 6).

Cuadro 8. Casos de Expresión positiva de EGFR por IHQ n= 3

N. caso Tx	Edad (años)	Tipo Histológico	Estadio clínico	Tamaño tumor	Tipo de respuesta	Desenlace	Recurrencia	Expresión
53889 CDDP/GZR	29	Carcinoma epidermoide	IB2	60 mm	Respuesta completa	Perdido sin enfermedad	NO	VEGF + Vimentin + E-Caderin -
70523 CDDP/GZR	42	Adeno-carcinoma	IIB	40 mm	Respuesta completa	Vivo sin enfermedad	NO	VEGF + Vimentin - E-Caderin -
70393 CDDP/GZR	53	Carcinoma epidermoide	IIA	35 mm	Respuesta parcial	Perdido con enfermedad	SI	VEGF + Vimentin - E-Caderin -

Cuadro 9. Casos de Expresión positiva de Vimentinapor IHQ n= 5

N. caso Tx	Edad (años)	Tipo Histológico	Estadio clínico	Tamaño tumor	Tipo de respuesta	Desenlace	Recurrencia	Expresión
53889 CDDP/GZR	29	Carcinoma epidermoide	IB2	60 mm	Respuesta completa	Perdido sin enfermedad	NO	VEGF + EGFR + E-Caderin -
11733 CDDP	29	Carcinoma epidermoide	IIB	70 mm	Respuesta parcial	Vivo sin enfermedad	SI	VEGF + EGFR - E-Caderin -
33541 CDDP	41	Carcinoma adenoescamoso	IIIB	40 mm	Respuesta completa	Vivo sin enfermedad	NO	VEGF + EGFR - E-Caderin -
22211 CDDP	50	Carcinoma epidermoide	IIB	60 mm	Respuesta completa	Vivo sin enfermedad	NO	VEGF - EGFR - E-Caderin +
61991 CDDP/GZR	49	Carcinoma epidermoide	IIB	50 mm	Respuesta completa	Vivo sin enfermedad	NO	VEGF + EGFR - E-Caderin -

Los resultados del análisis de la expresión de los marcadores empleados en este estudio se encuentran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Expresión de Proteínas por IHQ n = 82

Expresión de EGFR	n (%)
Positivo (++)	3 (3.7)
Negativo (0/+)	79 (96.3)

Expresión de VEGF	n (%)
Positivo (++)	48 (58.5)
Negativo (0/+)	34 (41.5)

Expresión de E-Caderina	n (%)
Positivo (++)	24 (29.3)
Negativo (0/+)	58 (70.7)

Expresión de Vimentina	n (%)
Positivo cél tumorales/Positivo Estroma	5 (6.1)
Negativo cél tumorales/Positivo Estroma	77 (93.9)

13.7 ASOCIACIÓN DE LA SG CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN PACIENTES.

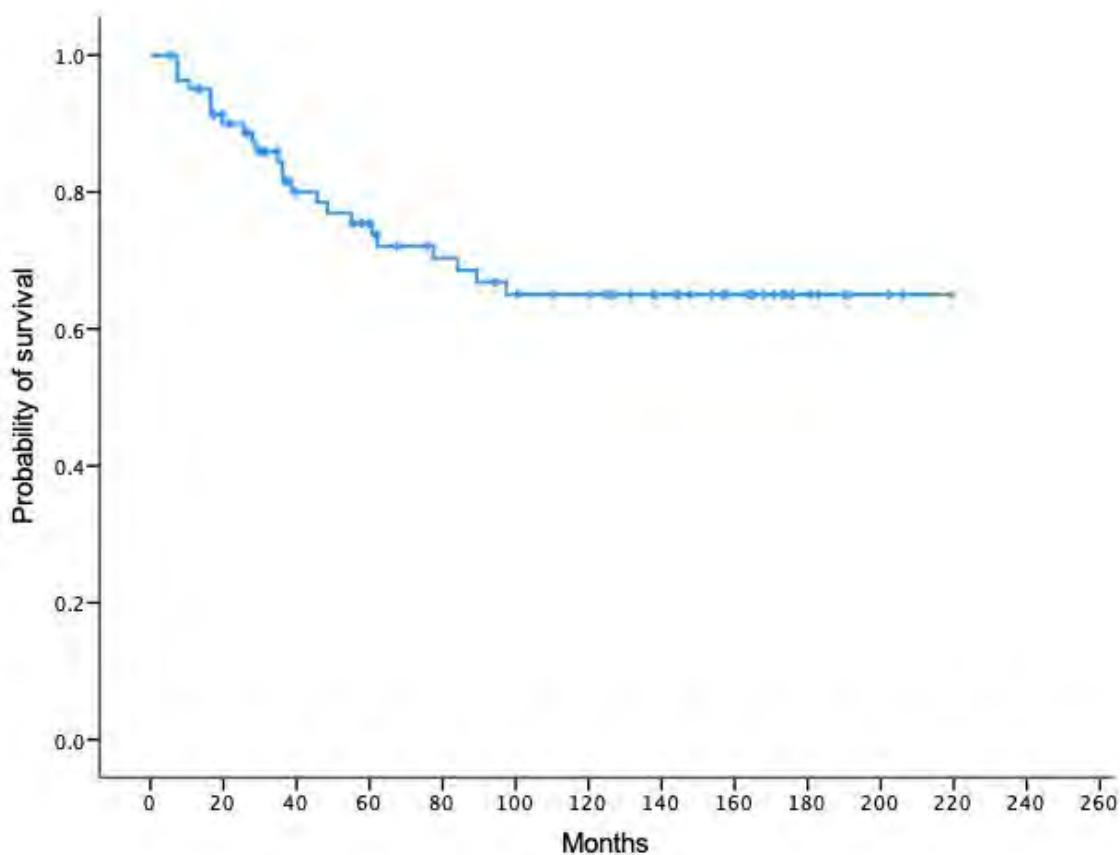
Una vez determinados los niveles de expresión de EGFR, VEGF, E-caderina, Vimentina y CD31 se procedió a determinar la posible asociación de estos marcadores con la SG.

Se realizó el análisis de sobrevida de acuerdo a los niveles para cada una de las proteínas analizadas. Para realizar este análisis estadístico se dicotomizaron los niveles de expresión en positivo (++) y negativo (0/+).

Debido a que las pacientes positivas a EGFR fueron solo 3 y en Vimentina 5 casos alterados, no se realizó el análisis de acuerdo a la expresión de esta proteína.

Primeramente se determinó la SG de las pacientes incluidas en este estudio, obteniendo una media de seguimiento de 157.5 meses (IC 95%: 137.27 – 177.77) (Figura 8).

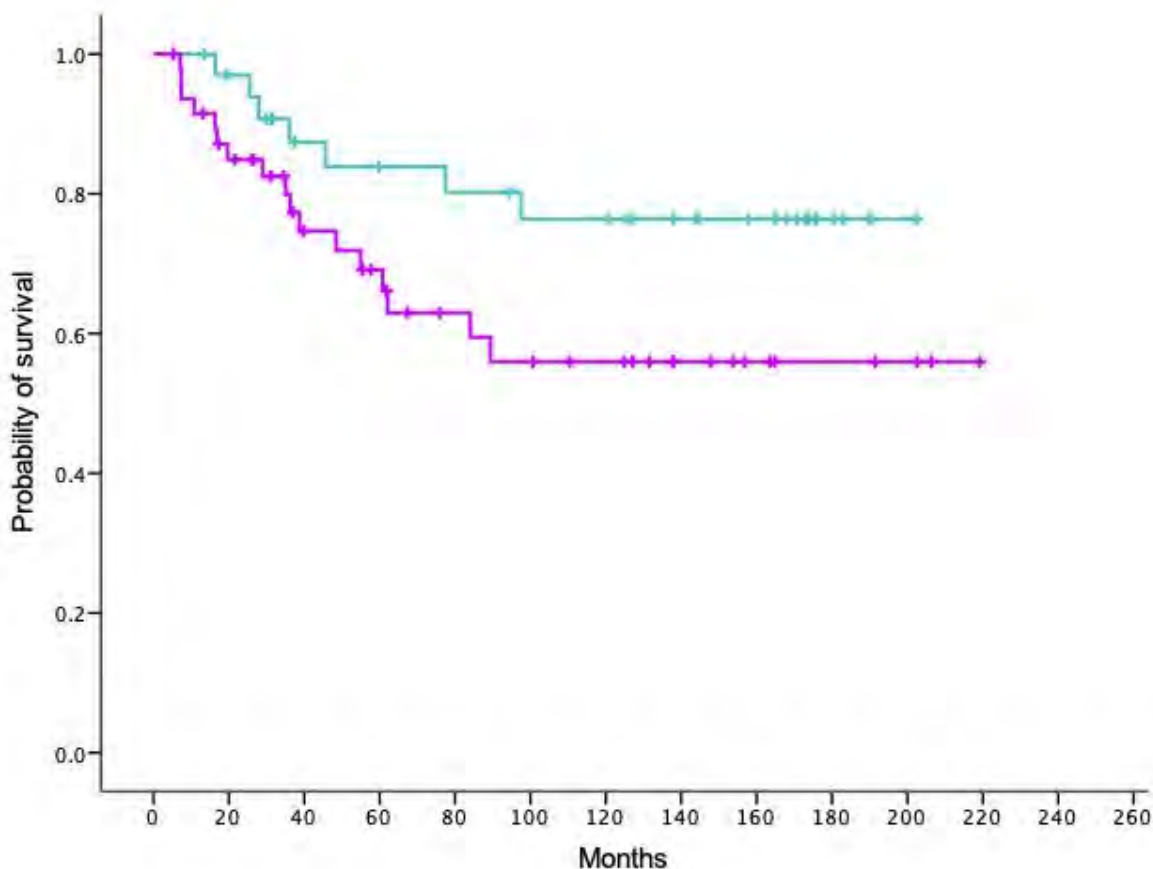
Figura 8. SUPERVIVENCIA GLOBAL



SG media (meses)	IC 95%	Nº eventos	Nº censuras
n = 82 157.5	(137.27 – 177.77)	24 (29.3%)	58 (70.7%)

Los resultados de la supervivencia de acuerdo a la expresión de VEGF se encontró que la positividad a VEGF muestra una media de SG de 140.79 meses (IC 95% 112.09 – 169.48), mientras que los casos con expresión negativa mostraron una media de SG de 166.31 meses (IC 95% 142.29 - 189.97), ($p = 0.072$) sin diferencia estadísticamente significativa entre expresar VEGF positivo o negativo con respecto a la SG, sin embargo el estimador p está acercándose a la significancia estadística y probablemente estemos encontrando diferencia con una significancia clínica concordando con lo reportado en la literatura (Figura 9).

Figura 9. SUPERVIVENCIA GLOBAL VEGF



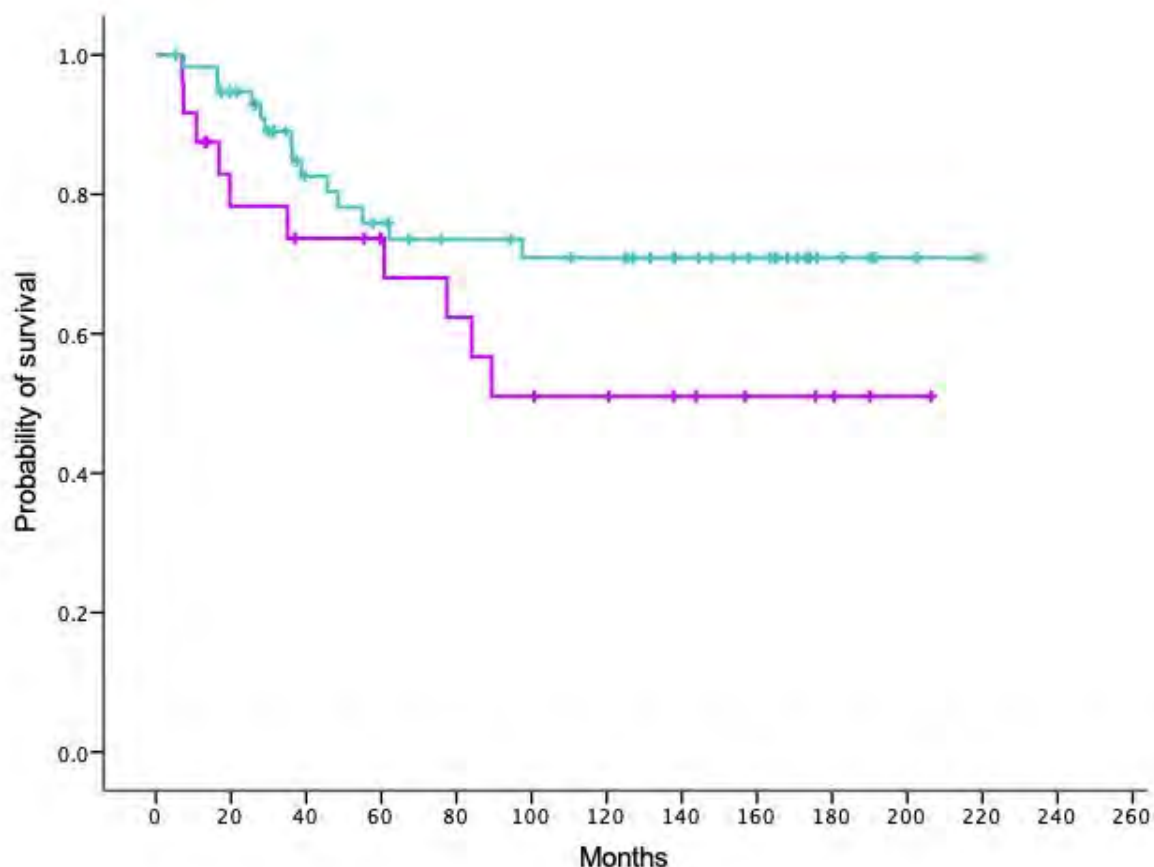
	SG media (meses)	IC 95%	Nº eventos	Nº censuras
— VEGF/tumor (-/+) IHQ	n = 34 166.13	(142.29 – 189.97)	7 (20.6%)	27 (79.4%)
— VEGF/tumor (+/++++) IHQ	n = 48 140.79	(112.09 – 169.48)	17 (35.4%)	31 (64.6%)

HR = 2.206 (IC 95% 0.912- 5.337), Log Rank $p = 0.072$

Los resultados de supervivencia respecto a la expresión de E-caderina se muestran como E-caderina negativos aquellos en los que existe disminución de la proteína en el tejido, con una media de SG 167.9 meses (IC 95% 144.26-190.51) y en el tejido que mantiene la presencia de E-caderina se reportaron como E-caderina positiva con una media de SG 127.2 meses (IC 95% 90.99-163.49) ($p = 0.119$), sin mostrar una diferencia

estadísticamente significativa, entre presentar expresión de E-caderina positiva Vs expresión de E-caderina negativa en términos SG (Figura 10).

Figura 10. SUPERVIVENCIA GLOBAL E-Caderina



	SG media (meses)	IC 95%	Nº eventos	Nº censuras
E-Caderina/tumor (-) IHQ	n = 58 167.39	(144.26 – 190.51)	14 (24.1%)	44 (75.9%)
E-Caderina/tumor (+) IHQ	n = 24 127.24	(90.99 – 163.49)	10 (41.7%)	14 (58.3%)

HR = 1.374 (IC 95% 0.916 – 2.063), Log Rank $p = 0.119$

Los resultados de supervivencia respecto a la expresión de Vimentina no fue posible estimarlos debido a la presencia de Vimentina positiva en células tumorales con estroma positivo en solo 5 casos, de los cuales eran casos censurados y la población restante se

reportó como Vimentina Negativa en los que no expreso la proteína en células tumorales con expresión positiva en estroma.

	SG media (meses)	IC 95%	Nº eventos	Nº censuras
Vimentina/tumor (-) IHQ	n = 77 no calculó	no calculó	24 (31.2%)	53 (68.8%)
Vimentina/tumor (+) IHQ	n = 5 no calculó	no calculó	0 (0.0%)	5 (100.0%)

En los resultados de la supervivencia de acuerdo a la expresión de EGFR se encontró que la positividad a EGFR en solamente 3 casos con 1 evento mostrando una media de SG de 81.5 meses (IC 95% 18.55 – 144.59) con un IC95% muy amplio y los 79 casos restantes que presentaron expresión de EGFR negativo en células tumorales existe una media de SG de 158.43 meses (IC 95%137.98 – 178.89), con una $p= 0.615$, sin diferencia estadísticamente significativa evidentemente. Resultados que no concuerdan la mayoría de los reportados en la literatura.

	SG media (meses)	IC 95%	Nº eventos	Nº censuras
EGFR/tumor (-) IHQ	n = 79 158.43	(137.98 – 178.89)	23 (29.1%)	56 (70.9%)
EGFR/tumor (+) IHQ	n = 3 81.57	(18.55 – 144.59)	1 (33.3%)	2 (66.7%)

14. DISCUSIÓN

A pesar de las estrategias de tamizaje para la prevención y la detección oportuna implementadas en nuestro país, el CaCu continúa siendo un serio problema de salud pública con importantes implicaciones económicas y sociales. Sin embargo, hasta el momento los esfuerzos no han sido suficientes para disminuir la prevalencia de esta neoplasia en mujeres mexicanas. Es por ello que se continúan fortaleciendo las estrategias dirigidas a controlar los estragos de esta enfermedad.

El pronóstico de las pacientes con CaCu depende en gran medida del estadio clínico al momento del diagnóstico, mismo que dictará el tratamiento a seguir. Importantemente, la mayoría de los casos diagnosticados en México se encuentran en etapas localmente avanzadas, de los cuales el 17% presentarán falla al tratamiento.

Los factores pronósticos y blancos terapéuticos son de gran interés para poder determinar nuevos marcadores que ayuden a clasificar a las pacientes de manera más adecuada y poder brindar tratamientos con alta probabilidad de éxito, sobre todo para las pacientes con CaCu de mal pronóstico. Recientemente, se ha encontrado que la expresión aberrante de múltiples proteínas celulares se ha asociado a tumores malignos y predicen el mal pronóstico de la enfermedad, mismas que pueden implementarse como biomarcadores. La detección de biomarcadores ayudará a implementar nuevas estrategias terapéuticas con tratamientos dirigidos a blancos moleculares en CaCu con la finalidad de mejorar los resultados en CaCu localmente avanzado.

Diversos biomarcadores pueden bien actuar como factores pronóstico, que junto con las evaluaciones clínico-histopatológicas, podrían usarse para indicar terapias blanco en conjunto con la quimio-radioterapia estándar. Sin embargo, los estudios encaminados a proponer biomarcadores en CaCu así como su valor pronóstico, permanece irresuelto debido a la heterogeneidad de las muestras incluidas en los análisis, donde se incluyen pacientes con tumores en cualquier estadio clínico, lo que podría estar sesgando los resultados. Es por ello que el objetivo de este trabajo se centró en determinar el valor

pronóstico de biomarcadores celulares en pacientes con CaCU en etapa localmente avanzada para disminuir la heterogeneidad de la muestra y proponer biomarcadores más adecuados a este estadio clínico.

Los resultados de nuestra población de estudio indican que las características demográficas e histopatológicas son similares a los mostrados en otros estudios, clasificando a la población de estudio en mujeres de edad promedio de 50 años con cáncer cervicouterino localmente avanzado, con una distribución mayoritaria en estadio clínico FIGO IIB y IIIB con una proporción de 68% y 17% respectivamente, con histología tumoral de carcinoma escamoso (87.8%), el cual se ha reportado de un 80-90% en este tipo de pacientes (López y Lizano, 2006; Galgano et al., 2011). Un tamaño tumoral mayor de 40mm fue encontrado en un 91% de nuestra población. Como bien se mencionó, el 80% de las pacientes que presentan CaCu se diagnostican en etapa localmente avanzada, mismas que se encuentran en condiciones socioeconómicas y culturales desfavorables debido a que la mayoría de ellas reportaron un nivel de escolaridad bajo (primaria en un 57.3%) y ocupación de ama de casa (63.4%), que no es remunerada en la mayoría de los casos (Lewis 2004).

Las proteínas evaluadas como posibles biomarcadores de SG en este estudio incluyeron al EGFR, VEGF, E-caderina, Vimentina y CD31, los cuales han sido ampliamente estudiadas en el desarrollo del cáncer (Ueda, et al. 2017), (Nagy, et al. 2011), Zhang, et al., 2017, Baohua , Hiyan, Fenten , Die , Weigou, & Xing, 2016) y han sido postuladas como marcadores de progresión y de SG de manera independiente (Pérez-Regadera, Sánchez-Muñoz, De-la-Cruz, & Ballestín, 2009, (Bodner, et al. 2011).

Se encontró que el 96% de las pacientes analizadas, presentó una expresión negativa para la proteína EGFR, hecho contrario a lo reportando en la literatura en que se analizaron casos de Cáncer de cérvix donde se estipula que más del 80% de los casos poseen alta expresión de esta proteína (Noordhuis y colaboradores (2009). Esto puede deberse a que los estudios no han hecho una clasificación de acuerdo a los estadios clínicos y que las etapas localmente avanzadas poseen baja expresión que no pudo ser detectada en nuestras condiciones. Así mismo, estudios recientes concluyen con la positividad de EGFR está asociada con el desarrollo de metástasis a ganglios linfáticos y

el estadio clínico, lo que resulta del rol conocido del EGFR en proliferación, invasividad y migración. Sin embargo, nuestro análisis no encontró correlación entre la positividad de EGFR y el pronóstico de los pacientes como ya se ha reportado (Ueda, et al. 2017). Otro estudio, realizado en 39 casos con adenocarcinoma cervicouterino, indicó que la presencia de EGFR tiene un uso limitado para evaluar el pronóstico de las pacientes y como guía para su manejo clínico. No existió correlación estadísticamente significativa entre la expresión de EGFR y los parámetros clínico-patológicos, así como no influyó en la SLE ni en la SG ($p > 0,05$) (Bodner, et al. 2011). Aunque algunos estudios identifican que la sobre-expresión de EGFR en carcinomas escamosos se asocia a mala supervivencia, otros trabajos No confirman estos hallazgos. Por tal motivo, es de interés de continuar investigando la expresión del EGFR en las diferentes etapas clínicas del cáncer de cérvix y definir su relación pronostica en éstas pacientes.

Cuando se analizó la expresión de VEGF en nuestra cohorte de pacientes, se encontró que cerca del 50% de las mismas tenía una expresión positiva y dicha expresión parece estar asociada a la SG. Si bien no hubo diferencia estadísticamente significativa al analizar la SG, se observa que las curvas de sobrevida parecen separarse cuando las pacientes se categorizan como positivas y negativas a la expresión de VEGF. Resultados que concuerdan con investigaciones previas donde concluyen que la sobreexpresión de VEGF está asociada con una baja supervivencia en pacientes con CaCu (Zhang, et al. 2017). Hallazgos que sugieren que la terapia basada en la inhibición de VEGF podría tener un papel importante en el tratamiento de CaCu, donde la expresión de VEGF podría examinarse rutinariamente para predecir el pronóstico en pacientes con CaCu. Este hecho ha sido confirmado por la aprobación del uso de bevacizumab en CaCu, el cual suprime la actividad biológica de VEGF, por parte de la FDA en 2014.

Nuestros resultados podrían indicar que los tumores con alta expresión de VEGF podrían encontrarse en un proceso de angiogénesis, mismo que proporcionaría ventajas respecto al tratamiento. Sin embargo, es necesario determinar este proceso mediante la detección de la DMV.

Para analizar la DMV se detectó la presencia de CD31. De manera importante la expresión de CD31 no funcionó para determinar la DMV en los casos analizados. La

tinción de CD31 fue realizada en todos los casos y al ser analizada por la patóloga experta se determinó que estos presentaban una expresión aberrante de la molécula por lo que el marcador CD31 no fue considerado en la determinación de la densidad microvascular, a pesar de que los controles de tinción (placenta) mostraron una expresión uniforme y acorde a lo reportado en la literatura (Figura 6). Recientemente, Randall y colaboradores (2009) describieron la relevancia pronóstica de la densidad microvascular detectada por inmunohistoquímica en una muestra de especímenes recolectados en un ensayo clínico fase III que incluyó mujeres con cáncer de cérvix tratadas con quimiorradiación. Este estudio demostró que una alta expresión de CD31 representa un factor pronóstico independiente que se asocia con una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y global (SG) (Randall, et al. 2009). En contraposición, Obermair (1998) reportó que el aumento en la DMV se asoció con un desenlace negativo al documentar una reducción en la tasa de supervivencia global a 5 años entre las mujeres que tuvieron un recuento mayor a 20 vasos por campo detectados en un aumento de 40X (Obermair, et al. 1998). La inconsistencia de los resultados en estos y otros estudios puede ser explicada por la heterogeneidad de la población evaluada, por el método de detección utilizado, por la estrategia para cuantificar la DMV y por las diversas intervenciones usadas (Rutgers, Mattox and Vargas 1995) (Kainz, et al. 1995). Dadas las discrepancias en el uso de CD31 como marcador de DMV, se ha propuesto el empleo de otros marcadores capaces de distinguir vasos sanguíneos normales de los que son formados de “novo” por el tumor; por ejemplo, CD34 o endogлина.

El uso de biomarcadores en cáncer ha ganado terreno en los últimos años debido a las altas tasas de prevalencia y mortalidad asociadas a esta enfermedad. Es imperante la realización de estudios que permitan establecer la presencia, no solo de un marcador, sino un panel compuesto con mayor poder predictivo que sea capaz de anticipar el comportamiento de pacientes con cáncer, especialmente en grupos vulnerables. Esto permitirá definir estrategias terapéuticas personalizadas encaminadas a disminuir los índices de morbi-mortalidad del CaCu.

CONCLUSIONES

Las pacientes con CaCU en etapas localmente avanzadas muestran un perfil de expresión diferencial de EGFR, E-caderina y Vimentina con respecto a lo reportado a la literatura. Dada la complejidad y diversidad de los mecanismos patogénicos del cáncer de cérvix, encontramos puntos débiles en la correlación entre la etapa clínica y el pronóstico, lo cual hace necesario el estudio de biomarcadores pronósticos creando un perfil molecular que permita definir y conocer de forma más precisa cada estadio clínico, y de esta manera poder establecer un panel de marcadores que acierten de manera efectiva en el pronóstico de pacientes en etapas localmente avanzadas, ésta propuesta se acerca al enfoque actual que se está manejando en el tratamiento integral y personalizado del cáncer de cérvix.

La expresión de VEGF mostró una tendencia y significancia clínica, sin embargo no estadística en términos de la SG con una $p = 0.07$, al demostrar que una sobre-expresión de VEGF en pacientes con cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada tiene un mal pronóstico y en la actualidad la presencia de este marcador ayuda al tratamiento en este tipo de pacientes con una terapia dirigida al sitio blanco.

Por lo cual, es fundamental continuar investigando los factores que facilitan la progresión en cáncer de cérvix, para precisar mejor su papel en cada estadio clínico lo que dará apertura a potenciales vías para el tratamiento más dirigido o ajustado en cada paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Estimating the world cancer burden. GLOBOCAN 2000. *Int J Cancer* 2001, 94:153-15.
2. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. 31 de julio de 2018
3. Cetina et al, Radiosensibilizadores en cáncer cervicouterino, *Cancerología* 1 (2006): 4-29.
4. Monk BJ, Tewari KS. Invasive cervical cancer, in DiSaia PJ, Creasman WT (eds): *Clinical Gynecologic Oncology* (ed 7). Philadelphia, PA, Mosby Publishers, 2007.
5. Robles SC, White F, Peruga A. Trends in cervical cancer mortality in the Americas. *Bull Pan Am Health Org.* 1996;30:290-301.
6. Palacio-Mejía S, Lazcano E, Allen-Leigh B, et al. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Mex* 2009; 51 (supp 2): s208-s219.
7. Mohar A, Frias-Mendivil M, Suchill-Bernal M, et al. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Publica Mex* 1997; 39: 253-258.
8. Pabón A. La mortalidad en Colombia 1953-1991. [Mortality in Columbia 1953-1991]. Santafé de Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 1993
9. Keys H, Gibbons SK. Optimal management of locally advanced cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1996;21:89-92.
10. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;340:1137-1143.
11. Peters WA III, Liu PY, Barrett II RJ, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with radiotherapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early stage-cancer of the cervix. *J Clin Oncol.* 2000;18:1606-1613.
12. Cancer trials. NCI issues clinical announcement on cervical cancer chemotherapy plus radiation improves survival, <http://www.cancer.gov/newscenter/cervicalcancer.html>.
13. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration: Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: A systematic review and metaanalysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:5802-5812.
14. Duenas-Gonzalez A, Cetina-Perez L, Lopez-Graniel C, Gonzalez Enciso A, Gómez-González E, Rivera-Rubi L, et al: Pathologic response and toxicity assessment of chemoradiotherapy with cisplatin versus cisplatin plus gemcitabine in cervical cancer: a randomized phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, 61:817-823.

15. Datta NR, Agrawal S. Does the evidence support the use of concurrent chemoradiotherapy as a standard in the management of locally advanced cancer of the cervix, especially in developing countries? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2006;18(4):306-12.
16. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002;89:213-228.
17. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1125-31.
18. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *PNAS*. 1993;90:3988-3992.
19. Giuntoli RL 2nd, Webb TJ, Zoso A, Rogers O, Diaz-Montes TP, Bristow RE, et al. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Cancer*. 2001;92:2875-2884.
20. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res*. 1996;2:755-762.
21. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*. 2004;92:873-880.
22. Ngan HY, Stanley M, Liu SS, Ma HK. HPV and p53 in cervical cancer. *J Virol*. 1992;66:6237-6245.
23. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60:203-212.
24. Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, Tian C, Burger RA, Liao SY. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):583-9.
25. Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, et al. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(2):314-9.
26. Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 1995;14(2):114-8.
27. Kainz C, Speiser P, Wanner C, Obermair A, Tempfer C, Sliutz G, et al. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res*. 1995;15:1549-1551.
28. Lee IJ, Park KR, Lee KK, Song JS, Lee KG, Lee JY, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;54:768-79.

29. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56(4):922-8.
30. Brahim-Horn C, Pouysségur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer.* 2006;93(8):E73-80.
31. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Ref Oncol Hematol.* 2005;54(1):53-61.
32. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS.* 2004;112(7-8):402-12.
33. Zusterzeel PL, Span PN, Dijksterhuis MG, Thomas CM, Sweep FC, Massuger LF. Serum vascular endothelial growth factor: a prognostic factor in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:283-290.
34. Lu ZH, Wright JD, Belt B, Cardiff RD, Arbeit JM. Hypoxia-inducible factor-1 facilitates cervical cancer progression in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Am J Patol.* 2007;171(2):667-681.
35. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell.* 2005;8:99-110.
36. Liu J, Zhang J, Wang X, Li Y, Chen Y, Li K, Zhang J, Yao L, Guo G. HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells. *Exp Cell Res.* 2010;316(12):1985-93.
37. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology.* 2009;387(2):442-8.
38. Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, et al. Prognostic impact of HIF-1alpha expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. *Strahlenther Onkol.* 2008;184(3):169-74.
39. Burri P, Djonov V, Aebbersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56(2):494-501.
40. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1alpha predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60(2):513-21.
41. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8405-12.
42. Monk BJ, Sill MW, Burger RA, Gray HJ, Buekers TE, Roman LD. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma

- of the cervix: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol.* 2009;27(7):1069-74.
43. Monk BJ, Willmott LJ, Sumner DA. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2010;116(2):181-6.
 44. Tan SJ, Juan YH, Fu PT, Yu MH, Lai HC. Chemotherapy with low-dose bevacizumab and carboplatin in the treatment of a patient with recurrent cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2010;31(3):350-3.
 45. Takano M, Kikuchi Y, Kita T, Goto T, Yoshikawa T, Kato M, et al. Complete remission of metastatic and relapsed uterine cervical cancers using weekly administration of bevacizumab and paclitaxel/carboplatin. *Onkologie.* 2009;32(10):595-7.
 46. Speake G, Holloway B, Costello G. Recent developments related to the EGFR as a target for cancer chemotherapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(4):343-9.
 47. Ghosh S, Liu XP, Zheng Y, Uckun FM. Rational design of potent and selective EGFR tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 2001;1(2):129-40.
 48. Noordhuis MG, Eijssink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7389-97.
 49. Wells A, Yates C, Shepard C. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(6):621–628.
 50. Micalizzi DS, Farabaugh Sm, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15:117–134.
 51. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
 52. Berx G, Raspé E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(8):587-97
 53. Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Oct;15(5):565-71.
 54. Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):657-65.
 55. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
 56. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20.

57. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(5):548-58.
58. Hult J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, Dong X, Williams TM, Lisanti MP, Knudsen K, Hazan RB. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 2007;67(7):3106-16.
59. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 2004;118(3):277-9.
60. Niu RF, Zhang L, Xi GM, Wei XY, Yang Y, Shi YR, Hao XS. Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007 Sep;26(3):385-94.
61. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365-75.
62. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer.* 2007 Jun;7(6):415-28.
63. National Cancer Institute. Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 3.0. URL available from <http://www.fda.gov/cder/cancer/toxicityframe.htm>, Accessed in November 2008.
64. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
65. Kimura S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Hihara J, Yoshida K, Toge T, Chayama K: Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha is associated with vascular endothelial growth factor expression and tumour angiogenesis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2004;40(12):1904-1912.
66. Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7389-97.
67. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer.* 1998;78:170-4.
68. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumour angiogenesis and metastasis-Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8
69. Cetina L, Rivera L, Hinojosa J, Poitevin A, Uribe J, et al. Routine management of locally advanced cervical cancer with concurrent radiation and cisplatin. Five-year results. *BMC Women's Health* 2006;6(3):1-20.
70. Baena et al, Tendencias e indicadores sociales de la mortalidad por cáncer de mama y cuello uterino. Antioquia, Colombia, 200^o-2007, salud pública de México, vol. 53, no. 6, noviembre-diciembre de 2011.



71. zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. Annu Rev Microbiol 1994;48:427-447.
72. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1996;1288:F55-78.
73. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003 Feb 6;348(6):518-527