



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**“SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA PRESENCIA
DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN GANGLIOS
LINFÁTICOS EN PACIENTES CON CÁNCER
CERVICOUTERINO TRATADOS INICIALMENTE CON
CIRUGÍA RADICAL: ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

QUE PRESENTA:

DR. JOSÉ DE JESÚS ZERMEÑO NAVA

ASESOR DE TESIS:

DR. DAVID FRANCISCO CANTÚ DE LEÓN



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2010



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE ESPECIALIDADES MÉDICAS

GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA



**“SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA
HUMANO EN GANGLIOS LINFÁTICOS EN PACIENTES CON CÁNCER
CERVICOUTERINO TRATADOS INICIALMENTE CON CIRUGÍA RADICAL:
ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES”**

TESIS

**Para obtener el grado de
Especialista en Ginecología Oncológica que**

P R E S E N T A

Dr. José de Jesús Zermeño Nava

Titular del curso de Especialización:

Dr. Aron González Enciso

Asesor:

Dr. David Francisco Cantú De León

México, D. F.

Agosto 2010

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Autorizaciones

Dr. José de Jesús Zermeño Nava

Médico de séptimo año de sub-especialidad en Ginecología Oncológica

Instituto Nacional de Cancerología

Dr. David Francisco Cantú De León

Médico adjunto del departamento de Ginecología Oncológica

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia

Subdirectora de Educación Médica

Instituto Nacional de Cancerología

AUTORES

Tesista:

Dr. José de Jesús Zermeño Nava
Médico de séptimo año de sub-especialidad en Ginecología Oncológica
Instituto Nacional de Cancerología

Asesor:

Dr. David Francisco Cantú De León
Médico adjunto del departamento de Ginecología Oncológica
Instituto Nacional de Cancerología

Co-asesores:

Dr. Alejandro García Carrancá
Jefe del Lab. de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología

Dra. María Delia Pérez Montiel
Médico Adscrito al Departamento de Patología
Instituto Nacional de Cancerología.

COLABORADORES

M. en C. Sofía Bernal Silva	Estudiante de Doctorado del Depto. de Bioquímica y Med. Molecular de la Fac. de Medicina Universidad Autónoma de Nuevo León.
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña	Jefe del Lab. de Genómica y Medicina Molecular del Depto. de Bioquímica y Med. Molecular de la Fac. de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
M. en C. Miriam Guido	Investigador asociado de la UNAM. Lab. de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.
M. en C. José Luis González	Estudiante de Doctorado. Lab. de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Cancerología y a todos los pacientes que tuve la oportunidad de conocer y tratar a los cuales les debo la oportunidad de madurar como médico y como persona en estos tres años de trabajo.

A mis compañeros de todas las especialidades que me ha permitido compartir experiencias y aprender de ellos.

A todos mis maestros que me han brindado apoyo y orientación en este período.

A mis asesores: el Dr. Cantú, Dra. Delia, Dr. García Carranca. Así como a nuestro colaborador el Dr. Hugo Barrera.

A todas las personas que participaron directamente en la elaboración del trabajo M. en C. Miriam Guido, M en C. José Luis González, M. en C. Sofía Bernal y Dr. Oscar Cerezo Camacho.

A todos mis amigos.

A mi familia: Papá, Mamá y Hermanos que siempre y en cada momento me han apoyado en mi preparación.

Y muy especialmente a mi esposa Sofía y a mi hija Valeria por ser el motor de mi vida así como por su cariño, comprensión y apoyo en todo momento.

ÍNDICE

1. Antecedentes.....	1
2. Planteamiento del problema.....	9
3. Justificación.....	9
4. Hipótesis del trabajo.....	10
5. Objetivos.....	11
5.1. Objetivo general.....	11
5.2. Objetivos específicos.....	11
6. Materiales y métodos.....	12
6.1. Lugar de realización.....	12
6.2. Diseño de estudio.....	12
6.3. Población de estudio.....	12
6.4. Criterios de selección.....	13
6.4.1. Criterios de inclusión.....	13
6.4.2. Criterios de exclusión.....	13
6.4.3. Criterios de eliminación.....	13
7. Definición de casos y controles.....	13
8. Descripción general del estudio.....	14
8.1. Procedimiento para el estudio clínico.....	14
8.2. Procedimiento para el análisis molecular.....	14
8.3. Análisis de datos.....	16

9. Cálculo de muestra.....	17
10. Aspectos éticos y financieros.....	17
11. Actividades realizadas por el alumno.....	18
12. Cronograma de actividades.....	19
13. Resultados.....	20
14. Discusión.....	29
15. Conclusiones.....	32
16. Perspectivas del trabajo.....	32
17. Referencias bibliográficas.....	33
18. Anexos	37

TÍTULO

“Significado pronóstico de la presencia de virus de papiloma humano en ganglios linfáticos en pacientes con cáncer cervicouterino tratados inicialmente con cirugía radical: estudio de casos y controles”

1. ANTECEDENTES

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial, con una incidencia de 500,000 nuevos casos a nivel mundial, se estima que es responsable de por lo menos 270,000 muertes al año, de las cuales el 80% ocurre en países en desarrollo (Parkin 2005). La infección persistente de alguno de los hasta ahora 15 genotipos oncogénicos conocidos del virus del papiloma humano (VPH) son necesarios más no suficientes para la transformación maligna de las células epiteliales, entre los factores asociados a esta transformación maligna se encuentran: tipo viral, persistencia viral, carga viral, tabaquismo, inmunosupresión, coinfecciones, alta paridad y deficiencias nutricionales. (Castellsague 2002). Al analizar los distintos genotipos oncogénicos de VPH Los tipo 16 y 18 son los dos más comúnmente asociados tanto a cáncer como a sus lesiones precursoras con un riesgo relativo de 100-500. (Castellsague 2008). causando aproximadamente 70% de los caso de cáncer invasor y 56% de las lesiones preinvasoras. Histológicamente el 80% de los casos de CaCU son de tipo epidermoide y el 15% adenocarcinoma, que tradicionalmente se ha considerado de peor pronóstico, sin que esto tenga relevancia en su tratamiento el resto 5% se divide en diferentes tipos histológicos(Look 1996).

El proceso de transformación neoplásica toma varios años. Por ejemplo, el cambio de un epitelio normal a cáncer *in situ* puede llevarse a cabo en cinco años y el cambio a cáncer invasor hasta en diez (Herrera-Gómez, 2006).

En los últimos 30 años, las tasas de incidencia y mortalidad del CaCU han disminuido más del 75% en los países desarrollados, gracias a la efectividad de sus programas de prevención basados en tamizaje citológicos y colposcópicos, aunados al tratamiento de sus lesiones precursoras (Valdespino-Gómez VM, 2004).

Para el caso del cáncer invasor, la Federación Internacional de Gineco-Obstetricia (FIGO) estableció en 1998 una estadificación de acuerdo a los datos clínicos encontrados durante la exploración física de la paciente. En el 2009 la FIGO publicó la última actualización, donde solo se modifica el EC IIA, pero sigue siendo clínica. (Pecorelli 2009). Las herramientas para la estadificación son la inspección, palpación, colposcopia, curetaje endocervical, cistoscopia, rectosigmoidoscopia, urografia excretora y radiografia de torax, pero cada uno de los estudios se solicita en forma selectiva (Benedet 2000).

La distribución de la enfermedad por etapas clínicas (EC) se ha observado de la siguiente forma: EC I: 28%, EC II: 34%, EC III: 33% y EC IV: 5%. (Franco EL, 2001).

El tratamiento de cada paciente dependerá del estadio clínico en el que se encuentre en el momento del diagnóstico así, las pacientes en etapa Ia1 sin invasión vascular ni linfática pueden tratarse mediante conización terapéutica y vigilancia estrecha o una histerectomía total extrafascial, dependiendo del deseo de fecundidad de la paciente. (Landoni 2001)

El cáncer microinvasor IA1 es adecuadamente tratado con Histerectomía extrafascial, mientras que para las etapa Ia2 y Ib1 el tratamiento de elección es una histerectomía radical

y linfadenectomía pélvica. Si existiera alguna contraindicación quirúrgica-médica puede atenderse con radioterapia y en casos de invasión menor a 3mm es suficiente con braquiterapia intracavitaria (Landoni 1997)

El tratamiento primario para la etapa Ib2 es la quimiorradioterapia concomitante, lo mismo ocurre para el resto de las etapas clínicas que son consideradas como localmente avanzadas (IIa,IIb,IIIa,IIIb y IVa), mientras que en el caso de la etapa IVb, en donde menos del 20% sobrevive a dos años, se ofrece tratamiento paliativo con quimioterapia (Green 2001, Keyn 1999).

En estadios tempranos sometidos a tratamiento quirúrgico existen diferentes factores que influyen en la supervivencia y recurrencia de pacientes posterior a la histerectomía radical como son: edad, estado ganglionar, tamaño tumoral (TT), involucro paracervical, profundidad de invasión, invasión al espacio linfovascular y tipo histológico. La metástasis a ganglios pélvicos es el factor pronóstico que más contribuye a la mortalidad. La supervivencia a cinco años en pacientes con ganglios negativos es del 86% mientras para pacientes con ganglios positivos es solo del 54.2%. En este último grupo, si se tratan adecuadamente de forma quirúrgica, y a pesar de no tener factores de mal pronóstico el riesgo de recurrencia es de aproximadamente 15%, de igual importancia es el hecho de que aquellas pacientes que presentan recurrencia tienen una supervivencia a 5 años prácticamente nula si habían presentado involucro ganglionar al momento del tratamiento primario y de 18% sin los ganglios habían sido negativos (Lillo F, 2008).

La detección de VPH en ganglios linfáticos se ha investigado en los últimos años como un marcador indirecto de diseminación tumoral aunque la bibliografía publicada parece confusa. Existen estudios que no han demostrado dicha aseveración, pero hay

heterogeneidad en la selección de las pacientes, las técnicas empleadas para la detección de VPH, el seguimiento de las pacientes y la estrategia general seguida para la realización de los estudios. Sun y col. en 2008, intentaron correlacionar la presencia de VPH en ganglios linfáticos negativos y aquellos con metástasis confirmadas histopatológicamente analizando de forma retrospectiva 31 pacientes (18 sin metástasis ganglionares y 13 con metástasis), encontrando positividad para VPH en ganglios linfáticos en el 58.1% de los casos, pero variando considerablemente entre pacientes con metástasis histológicas de aquellas que no las presentan (84.6% vs 27.8%) concluyendo que la presencia de HPV en ganglios positivos se correlaciona adecuadamente con la detección de metástasis histológicas. (Sun, 2008)

Kobayashi y cols. En 1998, estudiaron un total de 30 pacientes tratadas con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica, positivas para HPV 16 y 18 en tumor primario, ocho de ellas se tomaron como controles positivos con estadio clínico IIB con ganglios linfáticos positivos para VPH y metástasis histológica. Doce pacientes se estudiaron como controles negativos, con estadio IIB y ganglios histológicamente negativos de las cuales solo una presentó VPH (+) en ganglios. Las 10 pacientes restantes fueron pacientes con recurrencia inesperada (primeros cuatro años) y encontraron que todas ellas, excepto una, tenían VPH en ganglios linfáticos histológicamente negativos en comparación con las 12 pacientes que no recurrieron en donde solo una presento VPH en ganglios linfáticos histológicamente negativos. Concluyendo así, que la presencia de VPH ganglionar podría implicar involucro ganglionar temprano o la coexistencia de diseminación no detectable histológicamente. Por lo que se podría utilizar como marcador para predecir recurrencias tempranas (Kobayashi Y, 1998).

Hernádi y cols. En 2003, estudiaron 39 pacientes con CaCU y VPH positivo para el tipo 16, en conjunto con los ganglios linfáticos pélvicos de las pacientes. Ellos encontraron que los ganglios linfáticos metastásicos eran más frecuentemente positivos para VPH que aquellos no metastásicos (100% vs 35.7%, respectivamente, $p = 0.001$). Los casos con ganglios positivos para VPH-16, presentaron mayor número de recurrencias que aquellos que eran VPH negativos (42.9% vs 11.1%, respectivamente, $p = 0.009$). Concluyeron así que, sin importar la presencia de metástasis ganglionares, el encontrar VPH en ganglios linfáticos es un factor de predicción de recurrencia significativo (Hernádi Z, 2003).

En el 2004, Lukaszuk y col estudiaron un grupo de 79 pacientes con CaCU EC IA – IIB y analizaron 365 ganglios linfáticos para describir la incidencia y el patrón de distribución del VPH en ganglios linfáticos negativos y en metástasis confirmadas histopatológicamente. En 60 pacientes se encontró VPH en el tumor primario de estas 60, 19 pacientes presentaron metástasis ganglionar confirmada histológicamente, mientras 31 tenían ganglios con presencia de HPV. Esto podría explicarse por 1. Presencia de micrometástasis no observadas, 2. Inmunodigestión de las micrometástasis 3. Presencia de particular virales libres. Concluyendo que el hallazgo de VPH parece ser un método mucho más sensible que la histopatología para detectar involucro ganglionar, (Lukaszuk K, 2004).

En 2007, El mismo autor Lukaszuk y cols. Publicaron un estudio prospectivo donde se analizaron 116 pacientes sometidas a histerectomía radical más linfadenectomía pélvica por CaCU invasor con positividad para VPH en el tumor primario, encontrando positividad para VPH en el 69.83% de los ganglios estudiados en transoperatorio. En el análisis estadístico se realizaron tres grupos HPV-/metástasis -, HPV+/ metástasis - y HPV+/ metástasis +. Al comparar el grupo HPV+/metástasis + con el HPV-/metástasis- se observó

diferencia significativa en supervivencia (60.5%) muertes en el grupo HPV+/metástasis + (29.1 meses de seguimiento) vs (25.7%) en el grupo HPV-/metástasis- (40.7 meses de seguimiento) ($P=0.001$), de igual forma se observó que la supervivencia fue muy similar en el grupo HPV+/mets- al compararla con HPV+/mets+ ($P=0.37$) Concluyendo que la presencia de VPH en los ganglios linfáticos es un signo temprano de metástasis y las pacientes deben ser tratadas como tal (Lukaszuk K, 2007).

En 2008, Lillo y cols., analizaron 13 casos de cáncer invasor, tipificando y cuantificando la carga viral por PCR en tiempo real. Ellos encontraron infección por un solo tipo viral en el 69.3% de los casos, siendo el más prevalente el VPH tipo 16 (61.5%). Así mismo, encontraron que la carga viral fue mayor en ganglios linfáticos positivos histológicamente ($p = 0.005$), concluyendo que el tipo y la carga viral en ganglios linfáticos puede representar una herramienta para identificar tempranamente el riesgo de diseminación tumoral, debiendo tener en cuenta que el número de muestra realmente es reducido como para poder llegar a una conclusión de esta naturaleza (Lillo F, 2008).

En la literatura, los resultados son contradictorios en cuanto al papel que juega la presencia del VPH como factor pronóstico de recurrencia cuando se encuentra presente en los ganglios linfáticos pélvicos de pacientes con CaCU invasor en los diferentes estadios clínicos. Como ejemplo se puede citar el estudio realizado por Baay y col, reportan 50 pacientes con CaCU invasor (36 IB, 9 IIA y 5 IIB) todas positivas para VPH16 en el tumor primario a las cuales les estudiaron un solo ganglio obturador izquierdo histológicamente negativo por paciente (50 en total), sin embargo 15 presentaban metástasis en algún otro ganglio, Encontraron VPH positivo en 19 de los 50 ganglios histológicamente negativos

(38%) y en 7 de los 15 histológicamente positivos (49.9%) $P=0.61$. Además, reportaron que solo una de 12 pacientes negativas para metástasis pero positivas para VPH presentó recurrencia. Todas las demás pacientes no tenían evidencia de enfermedad en un periodo promedio de seguimiento de 47.5 meses, concluyendo que la presencia de VPH en ganglios histológicamente negativos no tiene valor pronostico en este grupo de pacientes. (Baay MF 1997). De igual forma Chan y cols. En 2005, estudiaron, de forma retrospectiva, un total de 15 pacientes con etapas tempranas de CaCU tratadas con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica. Ellos encontraron que, de cuatro pacientes con recurrencia, tres presentaban metástasis ganglionar detectada por histología; el resto de pacientes con ganglios histológicamente negativos fueron también negativos para VPH. De siete pacientes con ganglios linfáticos positivos para VPH, pero sin evidencia histológica de metástasis ganglionar, ninguna desarrolló recurrencia. Por lo anterior, los autores concluyeron que no existe evidencia de que la presencia de DNA en ganglios negativos para metástasis represente un peor pronóstico (Chan PKS, 2005). Otro estudio donde no se encontró asociación fue el de Füle y cols. En 2006 donde estudiaron un total de 150 pacientes y 900 ganglios linfáticos (6 por paciente). 56 pacientes en con CaCU temprano (IA-IB) y 94 estadios avanzados (IIA-IIIB). Sesenta y nueve pacientes presentaron metástasis histológicas (al menos 1 ganglio) Encontrando que los ganglios metastásicos de las pacientes fueron positivos para VPH en 65% de los casos, comparado contra 46% en ganglios no metastásicos de pacientes con al menos un ganglio positivo para metástasis; además, reportaron que en aquellas pacientes sin metástasis ganglionar solo el 36% fueron positivos para VPH. Encontrando una diferencia estadísticamente significativa en supervivencia global al comparar pacientes con ganglios metastásicos contra no metastásicos ($p = 0.002$), pero no así al comparar pacientes la presencia de VPH en

ganglios contra aquellas que no lo presentaron. Concluyendo que la presencia de VPH en el tumor primario o en ganglios linfáticos, no parece ser relevante en la supervivencia de pacientes con CaCU (Füle T, 2006).

A continuación se anexa una tabla en donde se muestra un resumen de las publicaciones sobre el significado pronóstico del VPH en ganglios linfáticos no metastásicos (Tabla 1).

Tabla 1. Publicaciones sobre la asociación entre el pronóstico y la presencia de VPH en ganglios linfáticos no metastásicos (Modificado de Füle T, 2006).

Autor y año	Número de casos	Significado pronóstico
Chan, et al. 2005	15	No
Graflund, et al. 2004	171	No
Hernádi, et al. 2003	31	Sí
Pilch, et al. 2001	223	Sí
Sápy, et al. 2000	4	Sí
Czeglédy, et al. 1998	31	No
Kobayashi, et al. 1998	236	Sí
Garzetti, et al. 1998	32	Sí
Baay, et al. 1997	35	No
Poka, et al. 1997	67	No
Cavuslu, et al. 1997	26	Sí
Park, et al. 1996	79	Sí
Hording, et al. 1995	24	No
Czeglédy, et al. 1995	11	No
Kónya, et al. 1995	47	No
Beyer-Finkler, et al. 1995	34	Inconsistente/No

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La detección de VPH en ganglios linfáticos histológicamente negativos en pacientes con CaCU invasor tendrá un significado pronóstico para recurrencia temprana de la enfermedad posterior al tratamiento quirúrgico radical?

3. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento para el cáncer cervicouterino en las etapas tempranas con cirugía se realiza con intento curativo, sin embargo, existe un porcentaje considerable de mujeres (10% - 15%) que presentan recurrencia de la enfermedad en un período de tiempo corto a pesar de contar con ganglios linfáticos negativos para metástasis en la revisión histopatológica de los mismos.

La asociación entre ganglios linfáticos positivos para VPH y el pronóstico en CaCU invasor se ha vuelto un tanto más evidente, pero no ha sido confirmado en estudios con mayor número de muestras y usando los nuevos métodos de genotipificación para VPH.

Por lo tanto, consideramos muy importante contribuir con información que ayude a dilucidar el verdadero papel pronóstico de la presencia de VPH en ganglios linfáticos negativos para metástasis en mujeres con estadios tempranos de cáncer cervicouterino, que permitan dar la pauta para brindar tratamientos adyuvantes más agresivos aun en ausencia de factores pronósticos adversos.

4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Se encontrará una frecuencia de al menos 30% mayor de positividad para VPH en los ganglios linfáticos resecados histológicamente negativos de las pacientes con recurrencia en comparación con el grupo control.

Hipótesis Nula = No habrá diferencia en la frecuencia de positividad para VPH en los ganglios linfáticos histológicamente negativos entre el grupo de pacientes con recurrencia y el grupo control.

Hipótesis Alterna = Se encontrará diferencia en la frecuencia de positividad para VPH en los ganglios linfáticos histológicamente negativos entre el grupo de pacientes con recurrencia y el grupo control.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar cuál es el papel pronóstico de la presencia de VPH en ganglios linfáticos histológicamente negativos para metástasis en mujeres con CaCU temprano tratadas de forma quirúrgica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Detectar la presencia y genotipificación de VPH en tumores primarios de pacientes que fueron sometidas a histerectomía radical más linfadenectomía pélvica por Cáncer cervicouterino invasor.

2.- Detectar la presencia y genotipificación de VPH en ganglios linfáticos histológicamente negativos para metástasis de pacientes que fueron sometidas a histerectomía radical más linfadenectomía pélvica por Cáncer cervicouterino invasor.

3.- Determinar los tipos más frecuentemente encontrados en las muestras de tumores primarios y sus respectivos ganglios y correlacionar el tipo entre ambos especímenes así como su relación con los factores pronósticos descritos.

4.- Determinar el grado de asociación entre la presencia de VPH en ganglios linfáticos histológicamente negativos y la recurrencia de la enfermedad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de realización

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología. Participaron tanto el Departamento de Ginecología Oncológica y el Departamento de Patología así como el Laboratorio de Virus y Cáncer de la misma institución.

6.2 Diseño (tipo de estudio).

Se trató de un estudio de casos y controles.

6.3 Población en estudio.

Se seleccionaron las muestras de tejido embebido en parafina de pacientes que fueron sometidas, como tratamiento primario, a histerectomía radical más linfadenectomía por diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor, de las cuales se contaba con muestras histopatológicas para el análisis.

6.4 Criterios de Selección:

6.4.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de CaCU invasor tratadas de forma primaria con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica bilateral.
2. Pacientes con reporte histopatológico negativo para metástasis ganglionares.
3. Pacientes con seguimiento de al menos seis meses posterior al tratamiento quirúrgico radical.

6.4.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes con VIH/SIDA
2. Pacientes con expediente incompleto en cuanto a los datos clínicos.

6.4.3 Criterios de eliminación

1. Pacientes con muestra insuficiente de DNA para la genotipificación viral.
2. Pacientes en las que no se contó con los bloques de parafina de las muestras quirúrgicas.

7. Definición de casos y controles.

Caso:

Se definió como caso aquella paciente con diagnóstico confirmado de cáncer cervicouterino invasor que fue tratada con histerectomía radical y linfadenectomía pélvica que presentó recurrencia posterior al tratamiento.

Control:

Se definió como control aquella paciente con diagnóstico confirmado de cáncer cervicouterino invasor que fue tratada con histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral que no presentó recurrencia posterior al tratamiento.

8. Descripción general del estudio.

8.1 Procedimiento para el estudio clínico.

Se revisaron los expedientes de pacientes sometidas a histerectomía radical más linfadenectomía pélvica por diagnóstico de CaCU invasor en el período de 1995 a 2008. De todos los expedientes se recabaron los datos mostrados en el Anexo 1. Todas las pacientes incluidas no presentaron metástasis ganglionares y se incluyeron como casos aquellas pacientes con recurrencia posterior al tratamiento y se seleccionaron como controles pacientes sin recurrencia de la enfermedad en una relación uno a uno.

8.2 Procedimientos para el análisis molecular.

Los cortes del tejido en parafina de los ganglios que fueron estudiados así como de los tumores primarios fueron proporcionados por el servicio de patología del Instituto Nacional de Cancerología. Se trabajó con cortes de 10µm los cuales se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml. Las extracciones de DNA se realizaron con el kit comercial FFPP de Qiagen de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Brevemente, a cada muestra se le agregó 1.5ml de xileno y se agitó en vortex por 15 segundos para eliminar la parafina del tejido. Se utilizó etanol para eliminar los restos de xileno de cada muestra y se incubaron a 56° C con buffer de lisis y proteinasa K hasta que el tejido se lisó por completo. Posteriormente, se transfirió el contenido de los tubos a cada columna del kit, se centrifugó por un minuto y se realizaron dos lavados con los buffers correspondientes. Finalmente, el DNA atrapado en la columna por afinidad, se eluyó en 40µl de buffer de elución. El DNA extraído se cuantificó en el Nanodrop y en algunas ocasiones se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar la información obtenida en el Nanodrop.

La búsqueda de VPH a partir de DNA extraído de los tejidos (tumores y ganglios) en parafina se realizó con el estuche comercial Inno-LiPA HPV genotyping extra (Innogenetics). La detección consistió en la amplificación de una región de L1 del genoma viral utilizando los iniciadores SPF10 los cuales amplifican un producto de aproximadamente 65 pares de bases (pb) (Kleter et al. 1998) con capacidad para amplificar hasta 54 tipos diferentes de VPH (Safaeian et al. 2007). El producto amplificado biotinilado resultante se desnaturalizó e hibridó con sondas específicas adheridas a membranas de nitrocelulosa. Después de la hibridación y de un lavado astringente, se agregó fosfatasa alcalina con estreptavidina conjugada, la cual se une a los híbridos biotinilados adheridos a la membrana durante el proceso de hibridación. Finalmente, las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas con un cromógeno que precipita en color morado y los resultados pudieron ser visualizados e interpretados utilizando una plantilla para la interpretación.

Para la amplificación por PCR se utilizaron los reactivos proporcionados en el estuche comercial, los cuales contienen en la mezcla de amplificación un exceso de dNTPs, deoxiuridin trifosfato, oligonucleótidos biotinilados, polimerasa de DNA termoestable y la enzima uracil-N-glicosilasa para evitar contaminaciones en las reacciones subsecuentes. Las condiciones de PCR utilizadas comenzaron con un paso de incubación para remover los amplicones con uracilos que pudieran contaminar la muestra. Posteriormente, se realizó la desnaturalización a 94°C por nueve minutos seguido de 40 ciclos consistiendo cada uno de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 52°C por 45 seg y extensión a 72°C por 45 seg. Al final de los 40 ciclos, se mantuvo el producto amplificado a 72°C menos de 2 horas para su posterior hibridación en las tiras de nitrocelulosa.

La tipificación se llevó a cabo por hibridación reversa del producto amplificado con sondas de DNA específicas adheridas a tiras colorimétricas de nitrocelulosa, las cuales están incluidas también en el estuche comercial previamente mencionado (Innogenetics). La identificación se realizó utilizando una plantilla incluida en el mismo.

8.3 Análisis de datos.

Se utilizó estadística descriptiva. El análisis de asociación de la frecuencia de positividad para VPH se realizó mediante tablas de contingencia de 2x2 y se utilizaron las pruebas de Ji cuadrada de Pearson y exacta de Fisher cuando existan frecuencias menores de cinco en esta última. La fuerza de asociación se determinó por medio de una razón de momios >1 la cual será positiva o de susceptibilidad y <1 negativa o de protección, con un intervalo de confianza del 95%. Se realizó ajuste para variables confusoras mediante el método de Mantel-Hansen.

Después del ajuste para variables confusoras y si se continúa la presencia de asociación se realizará análisis multivariado de Cox.

Ambos grupos se compararon para el análisis de la información clínica de factores pronósticos, así como para el análisis de supervivencia y periodo libre de enfermedad, que se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación entre las curvas se realizará mediante el método de Log-Rank.

La significancia estadística se tomó con un valor de $p < 0.05$.

9. Cálculo del tamaño de la muestra.

Ya que el valor real de la positividad para VPH en ganglios negativos no se encuentra establecida y tomando en cuenta el porcentaje de positividad para VPH reportada por Füle et al donde el 40% de los ganglios linfáticos son positivos para VPH y utilizando una fórmula de estimación de proporciones con un valor de alfa de 0.05 y una tolerancia del 10% serán necesarios 92 pacientes en total. Si tomamos en cuenta una relación de 1:1 sería necesario identificar 30 pacientes con recurrencia y 30 pacientes sin recurrencia.

10. ASPECTOS ÉTICOS Y FINANCIEROS

Ya que se trata de un estudio retrospectivo donde se obtuvieron solo muestras de tejido parafinado del departamento de patología no fue necesario evaluación por el Comité de Ética de esta Institución aunque si será enviado para su aprobación por el comité Científico y de Revisión del Expediente Clínico.

El trabajo fue apoyado por el Laboratorio de Virus y Cáncer del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología en México (Dr. Alejandro García Carrancá) así como por el laboratorio de Genómica y Medicina Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL (Dr. Hugo A. Barrera Saldaña).

11. ACTIVIDADES QUE FUERON REALIZADAS POR EL ALUMNO

1. Recolección de datos demográficos y clínicos de pacientes y controles, así como la identificación de los casos y los controles.
2. Extracción del DNA de las muestras de parafina y genotipificación del VPH.
3. Análisis de los resultados clínicos y moleculares.
4. Análisis estadístico.
5. Escritura de la tesis.

12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

FEBRERO – MARZO 2009	ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO
ABRIL 2009 – MAYO 2009	APROBACIÓN POR COMITÉ CIENTÍFICO
JUNIO 2009 – DICIEMBRE 2009	IDENTIFICACIÓN DE LOS EXPEDIENTES CLÍNICOS, REVISIÓN DE LOS MISMOS, SELECCIÓN DE MATERIAL DE PATOLOGÍA, APRENDIZAJE DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES.
ENERO 2010 – JUNIO 2010	REALIZACIÓN DE ACTIVIDADES EN EL LABORATORIO.
JULIO 2010 – DICIEMBRE 2010	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS. ESCRITURA DE LA TESIS.

13. RESULTADOS

Datos clínicos y epidemiológicos.

Se estudiaron 42 pacientes, de forma retrospectiva, con diagnóstico de cáncer cervicouterino tratadas con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica bilateral, sin metástasis ganglionares, con seguimiento de al menos 6 meses (78.8 meses en promedio, 10 -130 meses), en un período comprendido entre Enero de 1995 y Diciembre de 2008.

El grupo de estudio se dividió en 21 pacientes controles (sin recurrencia de la enfermedad) con edad promedio de 48.04 años (32 - 77 años) y 21 casos (con recurrencia de la enfermedad) con edad promedio de 46.56 años (31 - 61 años). Los grupos de estudio fueron homogéneos al analizar variables epidemiológicas como: antecedentes heredofamiliares, patológicos y no patológicos (ej. tabaquismo), inicio de vida sexual, número de parejas sexuales. Así mismo, fueron homogéneos al analizar factores de riesgo para recurrencia de la enfermedad como son: tamaño tumoral, presencia de invasión linfovascular, invasión estromal, bordes quirúrgicos y parametrios (Tabla 2).

Tabla 2. Características tumorales.

HISTOLOGIA	SIN RECURRENCIA	CON RECURRENCIA	TOTAL	SIGNIFICANCIA
EPIDERMOIDE	18(85.7%)	18(85.7%)	36(85.7%)	P=0.549
ADENOCARCINOMA	3(14.2%)	2 (9.5%)	5 (11.9%)	
OTRO	0 (0%)	1(4.7%)	1 (2.35%)	
DIFERENCIACION				
BIEN	1(4.7%)	7 (33.3%)	8(38.1%)	P=0.0009
MODERADAMENTE	6 (28.5%)	9 (42.8%)	15 (35.5%)	
POCO	14 (66.6%)	4 (19%)	18(42.8%)	
INDIFERENCIADO	0	1(4.7%)	1 (2.38%)	
ESTADIO CLÍNICO				
IA1	0	1(4.7%)	1 (2.35%)	0.599
IB1	20 (95.2%)	19 (90.4%)	39 (92.8%)	
IB2	1(4.7%)	1(4.7%)	2 (4.7%)	
TIPO DE CIRUGÍA				
HR MAS LPB	21	21	42	
PVL				
-	16 (76.2%)	14 (66.6%)	30 (71.4%)	P= 0.495
+	5 (23.8%)	7(33.4%)	12 (28.6%)	
BORDES				
-	20 (95.2%)	21 (100%)	72 (97.6%)	P=0.311
+	1(4.7%)	0 (0%)	1 (2.38%)	
PARAMETRIOS				
-	20 (95.2%)	19 (90.4%)	39 (92.8%)	P=0.549
+	1(4.7%)	2(9.5%)	3 (7.2%)	
INVASIÓN				
<1/2	10 (47.6%)	7 (33.3%)	17 (40.4%)	P=0.346
>1/2	11 (52.3%)	14 (66.7%)	25 (59.5%)	

El promedio de inicio de vida sexual fue de 18.7 años (14 - 22 años) para las pacientes sin recurrencia y de 17.17 años (15 - 22 años) para las pacientes con recurrencia (p = 0.22).

El promedio del número de compañeros sexuales fue de de 1.8 (1 - 7 parejas) para pacientes sin recurrencia y ligeramente menor para las pacientes con recurrencia 1.76 (1 – 6 parejas) ($p = 0.517$).

El número promedio de embarazos fue de 5.8 (1 - 14) para las pacientes sin recurrencia contra 5.6 (1 - 10) para las pacientes con recurrencia ($p = 0.411$).

La principal sintomatología fue el sangrado que se presentó en 63% de todas las pacientes, 66% en pacientes sin recurrencia y 56% de pacientes con recurrencia. Los cuadros asintomáticos se presentaron en el 32% de las pacientes sin recurrencia y 33.2% de pacientes con recurrencia. Solo tres pacientes (4%) presentaron dolor como único síntoma inicial ($p = 0.372$).

La gran mayoría de las pacientes (92.8%) se diagnosticaron en estadio clínico (EC) IB1, solamente una paciente con recurrencia se presentó con EC IA1 al momento del diagnóstico y una paciente en cada grupo de estudio en EC IB2.

Al analizar las variantes histológicas de los tumores se confirmó que la más frecuente es el carcinoma epidermoide, el cual se presentó en el 85.7% de los casos en ambos grupos de estudio, seguido por el adenocarcinoma en 11.9% y otros tipos histológicos en 2.35% ($p = 0.549$).

Se observó que el 66.6% de las pacientes del grupo control presentó tumores poco diferenciados contra solo un 19% de los casos ($p = 0.0009$), sin que esto presentara alguna repercusión clínica.

Se analizaron los siguientes datos del reporte histopatológico: tamaño tumoral patológico, número de ganglios disecados, involucro linfo-vascular, invasión al parametrio, bordes e invasión estromal máxima.

El tamaño tumoral promedio para las pacientes sin recurrencia fue de 2.48 ± 1.088 vs 2.70 ± 0.859 en las pacientes con recurrencia ($p = 0.384$). El número de ganglios disecados, todos ellos negativos histológicamente, fue de 25.29 ganglios ± 11.33 para pacientes sin recurrencia y de 21.95 ± 8.99 para las pacientes con recurrencia ($p = 0.297$) (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaño tumoral y número de ganglios disecados.

		MEDIA	DES TIP	Error ti. De la media	
TT PATOLOGICO	SIN RECURRENCIA	2.70 cm	.8593	0.1875	P=0.384
	RECURRENCIA	2.48 cm	1.0888	0.2376	
NO GANGLIOS	SIN RECURRENCIA	25.29 gg	11.336	2.474	P=0.297
	CON RECURRENCIA	21.95 gg	8.99	1.962	

El involucro linfovascular se encontró en 28.6% de todas las pacientes estudiadas. El 23.8% de pacientes del grupo sin recurrencia presentaron involucro linfovascular y 33.4% en el grupo con recurrencia ($p = 0.495$). Los bordes quirúrgicos fueron positivos solo en una paciente la cual formaba parte del grupo control. El involucro parametrial fue positivo en el 4.7% del grupo sin recurrencia y 9.5% del grupo con recurrencia ($p = 0.549$). La invasión estromal fue $> \frac{1}{2}$ en el 66.7% y 52.3% de pacientes con recurrencia vs no recurrencia, respectivamente ($p = 0.346$).

La supervivencia media del grupo de estudio fue de 78.8 meses (10 - 132 meses), siendo de 100.09 meses (18 - 132 meses) para las pacientes sin recurrencia vs 57.52 meses (10 - 120) para las pacientes con recurrencia ($p = 0.0001$), siendo la única variable que alcanza significancia estadística.

Para el grupo de pacientes con recurrencia, el período libre de enfermedad (PLE) fue de 17.62 meses (1 - 48 meses).

Datos moleculares.

Se obtuvieron los bloques de tejido en parafina del producto de histerectomía radical de las 42 pacientes en estudio. De ahí se tomó muestra para extracción de DNA para la detección molecular del virus del papiloma (VPH) tanto del tumor primario como de seis ganglios pélvicos por cada paciente. Se realizaron 84 extracciones en total a partir de cortes de $10\mu\text{m}$ y la detección de VPH se realizó por PCR e hibridación reversa. Treinta y ocho de las muestras de tumores primarios (90.4%) fueron positivas para algún tipo de VPH. El tipo viral más frecuentemente encontrado fue el VPH-16 (71.4% de las pacientes con recurrencia y 80% de las pacientes sin recurrencia). El 23.8% de las pacientes en el grupo de recurrencia presentaron co-infecciones, mismo porcentaje que se presentó en el grupo de pacientes sin recurrencia. En el grupo de recurrencia los virus encontrados diferentes al tipo -16 fueron el tipo -31 en el 9.5%, el -52, -51 y -18 en el 4.7% cada uno de ellos. Mientras que en el grupo sin recurrencia fueron el tipo -51 y el -52 en el 9.5% cada uno y el tipo -18 y el -58 en el 4.7% cada uno de ellos (Fig. 1).

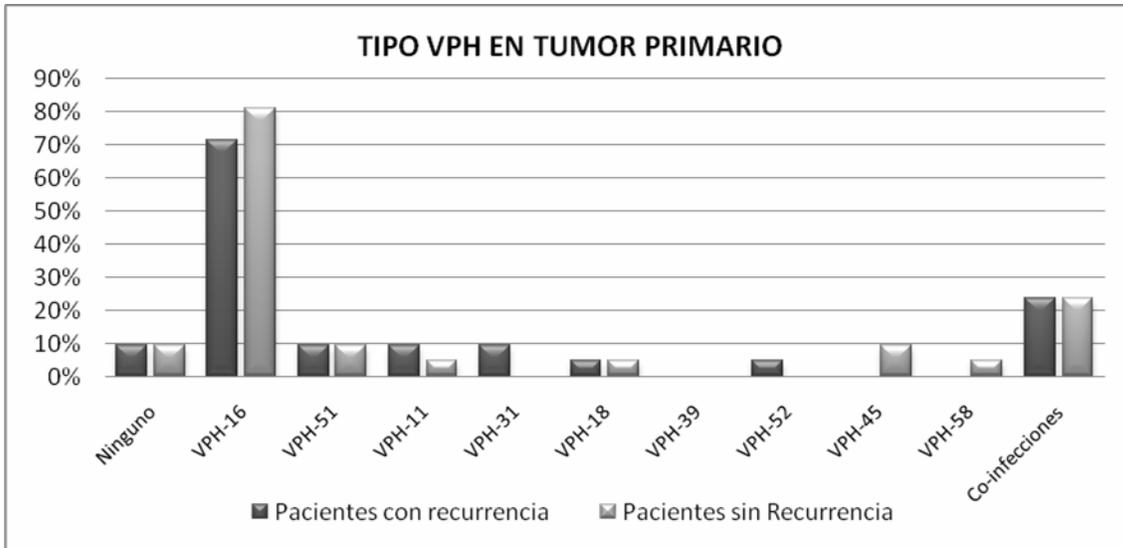


Figura 1. Tipo Viral y co-infecciones en tumor primario. Se realizó la detección y tipificación de los VPH presentes en el tumor primario utilizando la técnica de PCR e hibridación reversa. Se encontró que el VPH tipo 16 es el más frecuente en tumores. Además se observó que la frecuencia de co-infecciones es igual tanto en pacientes con y sin recurrencia de la enfermedad.

Al analizar los ganglios, se encontró VPH en el 52.3% de los casos, siendo el tipo VPH-16 el más frecuente (38%). Con menor frecuencia se encontraron el tipo -18 (9.5%), el -31 (4.7%) y el tipo -51 (4.7%). En el grupo control, la positividad para DNA viral en ganglios fue de 33.3%, siendo el más frecuente el tipo -16 (28.5%) y el tipo -39 (4.7%) En este grupo de pacientes no se presentaron co-infecciones virales en ganglios linfáticos, mientras que en los casos (pacientes con recurrencia), las co-infecciones se presentaron en el 14.3% (Fig. 2).

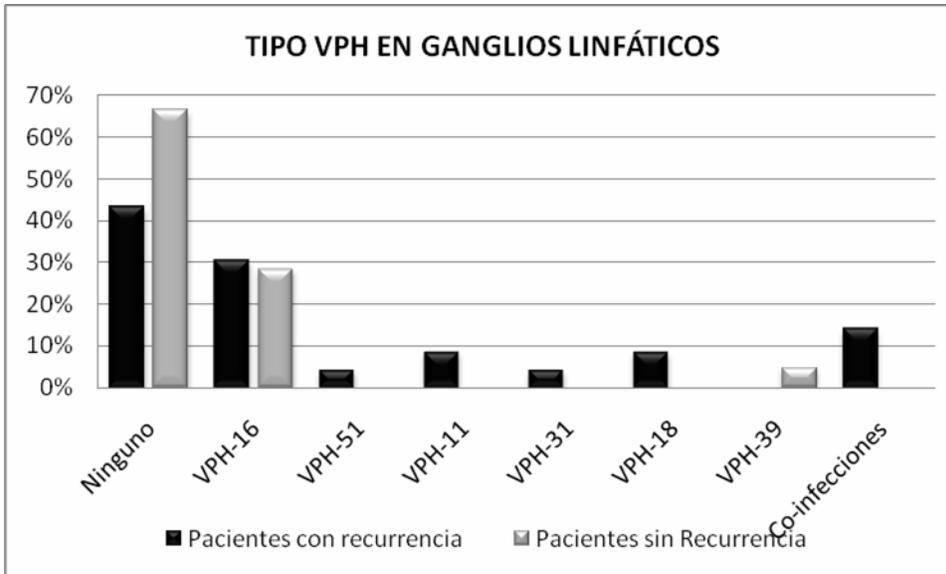


Figura 2. Tipo de VPH y co-infecciones en ganglios linfáticos. Se realizó la detección y tipificación de los VPH presentes en los ganglios linfáticos de las pacientes en estudio utilizando la técnica de PCR e hibridación reversa. Se encontró que aquellas pacientes sin recurrencia fueron negativas en mayor frecuencia al compararla con las pacientes con recurrencia de la enfermedad ($p = 0.212$). Se encontró que el VPH tipo 16 es el más frecuente. Además, se observó que la frecuencia de co-infecciones es mayor en pacientes con recurrencia de la enfermedad ($p = 0.245$).

No se encontró diferencia significativa al buscar asociación entre recurrencia de la enfermedad y la presencia del VPH tanto en el tumor primario como en ganglios ($p = 1$ y $p = 0.212$, respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación entre recurrencia de la enfermedad y presencia de VPH.

VPH en Tumor	Sin recurrencia	Con recurrencia	Total	Significancia
Negativo	2	2	4	$P = 1$
Positivo	19	19	38	
VPH en Ganglios				
Negativo	14	10	24	$P = 0.212$
Positivo	7	11	18	

Al analizar el período libre de enfermedad tampoco se encontró diferencia significativa con respecto a la presencia de VPH en ganglios linfáticos ($p = 0.711$) (Fig. 4). Sin embargo, el periodo libre de enfermedad fue significativamente mayor en aquellas pacientes en donde el tumor primario es causado por algún tipo viral diferente al VPH-16 (Fig. 5).

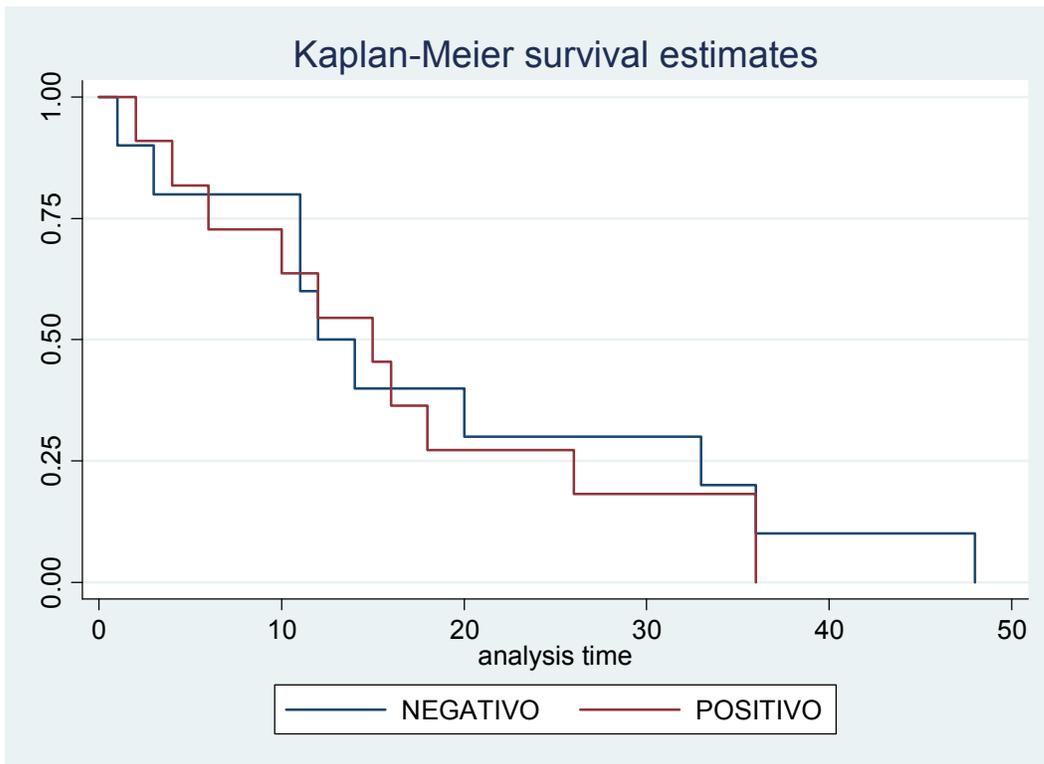


Figura 4. Periodo libre de enfermedad según estado de VPH ganglionar. Al analizar la supervivencia por medio de la curva de Kaplan-Meier se observó que la presencia de VPH en ganglios linfáticos no tiene relación con la supervivencia libre de enfermedad.

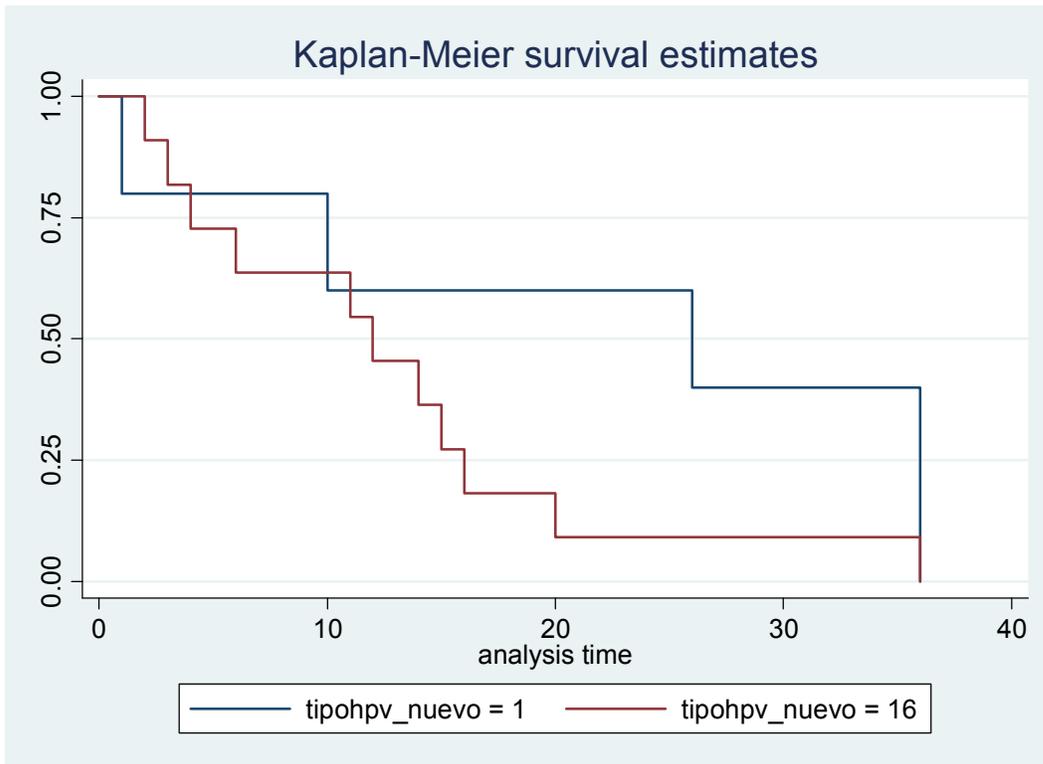


Figura 5. Periodo libre de enfermedad según Co- infecciones en tumor primario. Al realizar análisis a través de la curva de Kaplan-Meier se observó que el VPH-16, en el tumor primario, presentó menor supervivencia libre de enfermedad que cualquier otro tipo viral ($p = 0.0001$).

14. DISCUSIÓN

El presente proyecto se basó en el estudio retrospectivo de pacientes con cáncer cérvicouterino invasor en estadios tempranos, tratadas con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica bilateral, en el período de 1995 a 2008. Todas las pacientes incluidas presentaron ganglios linfáticos negativos para metástasis.

Las pacientes se dividieron en dos grupos: los casos, que consistieron en pacientes con recurrencia de la enfermedad y los controles, que consistieron en aquellas pacientes sin recurrencia hasta el momento del análisis.

Probablemente el valor más importante de este estudio es que ambos grupos de estudio son homogéneos tanto para las variables epidemiológicas y características tumorales como para las variables clínicas de riesgo para recurrencia.

El objetivo principal de este estudio fue el estudiar si la presencia de VPH en los ganglios linfáticos de las pacientes con recurrencia pudiera servir como un marcador de riesgo para recurrencia. Es bien conocido que existen ciertos factores clínico-patológicos que pueden servir como marcadores de riesgo para la recurrencia de la enfermedad, como son edad, estado ganglionar, tamaño tumoral (TT), involucro paracervical, profundidad de invasión, invasión al espacio linfovascular y tipo histológico (Lillo F, 2008). Y sin lugar a duda, las metástasis a ganglios pélvicos es el factor pronóstico que más contribuye a la mortalidad (Lillo F, 2008). Sin embargo, en este grupo de pacientes, en las cuales podemos observar una homogeneidad como la antes descrita, existen mujeres que a pesar de no contar con metástasis ganglionar, presentaron recurrencia de la enfermedad. Es por esto que fue de

nuestro interés estudiar la presencia del VPH en los ganglios de estas pacientes para tratar de explicar este fenómeno.

En la literatura existen reportes que intentan implicar la presencia de VPH en ganglios linfáticos como un factor de riesgo para recurrencia, sin embargo, los grupos de estudios han sido heterogéneos; además, los autores incluyen en sus estudios pacientes tanto con metástasis histológicas en ganglios y sin ellas por lo que esto podría estar sesgando los resultados al momento del análisis (Füle y cols. 2006,). Así mismo, las técnicas de detección molecular para el VPH son muy variables de un estudio a otro y muchas veces poco sensibles para el tipo de muestra en cuestión, ya que se trata de DNA proveniente de tejido embebido en parafina (Baay MF 1997). También cabe mencionar que, algunos de los estudios reportados hasta el momento se enfocan en el análisis de un solo tipo viral no tomando en cuenta las co-infecciones como un factor de riesgo. Es por esto que en el presente estudio hemos cubierto todas estas variables que pudieran intervenir en la diferencia de los resultados y para esto fue que reunimos este, muy bien seleccionado, grupo de pacientes y además, utilizamos técnicas de detección viral sensibles y específicas para el tipo de DNA con el que se trabaja.

El tipo viral más frecuentemente encontrado fue el VPH-16 (71.4% de las pacientes con recurrencia y 80% de las pacientes sin recurrencia), lo cual coincide con lo descrito en la literatura (Chan PKS, 2005). Así mismo, se encontró que el 23.8% de ambos grupos presentaron co-infecciones, muy similar a lo descrito por Füle en 2006 quien reportó VPH 16 en 82.6% de las pacientes estudiadas con co-infecciones en 28% de las mismas.

Burnett y col. en 1992 publicaron un estudio retrospectivo, en el cual analizaron ganglios obtenidos de pacientes sometidas a histerectomía radical; seis pacientes con recurrencia y seis pacientes sin recurrencia, encontrando positividad para VPH en 71% de los ganglios en pacientes que recurrieron vs solo 35% de los que no recurrieron ($p = 0.0047$). Sugiriendo con esto que la presencia de VPH en ganglios histológicamente negativos se asocia a alto riesgo de recurrencia.(Burnett 1992), hallazgo que no fue confirmado en nuestro estudio ya que a pesar de que ninguna de las pacientes presentó metástasis histológica en ganglios linfáticos, al analizar la presencia de DNA viral en dichos ganglios, pudimos observar que la presencia del VPH en los ganglios no metastásicos de pacientes con recurrencia de la enfermedad no es un marcador de riesgo para la misma.

Las pacientes que presentaron recurrencia con VPH positivo en ganglios linfáticos presentaron PLE y SVG de 16.45 y 50 meses vs 18.9 y 65.7 meses para aquellas pacientes con recurrencia pero con VPH negativo en ganglios linfáticos. De igual forma, encontramos que la presencia de co-infecciones en los ganglios linfáticos es nula en las pacientes sin recurrencias y se encontró en el 14.3% de las pacientes con recurrencia pero con un valor de $p = 0.245$. Además, pudimos observar que la supervivencia en aquellas pacientes con tumores causados por VPH-16 es significativamente menor que las pacientes con tumores causados por algún otro tipo viral, por lo que es de gran importancia determinar el tipo viral en el primario y estudiar con mayor profundidad los factores virales y del huésped implicados en dicho acontecimiento.

15. CONCLUSIONES

- Se encontró presencia de VPH en el tumor primario en el 90.4% de las pacientes estudiadas, donde el genotipo viral más frecuentemente encontrado fue el tipo 16 hasta en el 70% de los casos
- Se encontró VPH en el 42% de los ganglios negativos, 52.3% de las pacientes con recurrencia vs 33.3% de las pacientes sin recurrencia. Siendo el tipo viral más frecuentemente encontrado el -16, hasta en 38% de los casos y 28.5% de los controles.
- No existe asociación entre la presencia de VPH en ganglios linfáticos negativos a metástasis y la recurrencia de la enfermedad.
- La presencia de VPH-16 en el tumor primario podría tener relación con el riesgo de recurrencia temprana en este grupo de pacientes.

16. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

No fue posible encontrar significancia estadística en las variables que se proponían como posibles marcadores de riesgo para recurrencia de la enfermedad como son: presencia de DNA viral en los ganglios negativos para metástasis así como la presencia de co-infecciones en los mismos. Sin embargo, sería conveniente, a futuro, aumentar tanto el número de casos (por lo menos a 30) como el de los controles para tenerlos en una proporción de 1:2.

17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baay MF, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Quint WG, et al. Detection of HPV-16 DNA by PCR in histologically cancer free lymph nodes from patients with cervical cancer. *J Clin Pathol.* 1997;50(11):960-1.
2. Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 70:209.
3. Beyer-Finkler E, Girardi F, Sillem M, Pfister H. Human papillomavirus DNA in genital cancers, metastases, and lymph nodes. *Intervirology.* 1995;38(3-4):173-80.
4. Castellsague X, F. Xavier Bosch, Nubia Muñoz. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002 (89): 191-/199
5. Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cáncer. *Gynecologic Oncology.* 2008 (110): S4–S7
6. Cavuslu S, Goodlad J, Hobbs C, Connor AM, Raju KS, Best JM. Relationship between human papillomavirus infection and overexpression of p53 protein in cervical carcinomas and lymph node metastases. *J Med Virol.* 1997;53(2):111-7.
7. Chan PKS, Yu MMY, Cheung TH, To KF, Lo KWK, Cheung JLK, Tong JHM. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumour and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. *J Clin Virol.* 2005;33:201-5.
8. Committee on Practice Bulletins-Gynecology. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas, number 35, May 2002. *Obstet Gynecol* 2002; 99:855.
9. Czegledy J, Losif C, Forslund O, Willen R, Hansson BG. Detection of human papiloma virus DNA in lymph nodes extirpated at radical surgery for cervical cancer is not predictive of recurrence. *J Med Virol.* 1998;54(3):183-5.
10. Czegledy J, Losif C, Hansson BG, Evander M, Gergely L, Wadell G. Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer? *Int J Cancer.* 1995;64(3):211-5.

11. Franco EL, Duarte FE, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001;164(7):1017-25.
12. Füle T, Csapó Z, Máthé M, Tátrai P, László V, Papp Z, Kovalszky I. Prognostic significance of high-risk HPV status in advanced cervical cancers and pelvic lymph nodes. *Gynecol Oncol*. 2006;100(3):570-8.
13. Graflund M, Sorbe B, Sigurdardottir S, Karlsson MG. Relation between HPV-DNA and expression of p53, bcl-2, p21WAF-1, MIB-1, HER-2/neu and DNA ploidy in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome. *Oncol Rep*. 2004;12(1):169-76.
14. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, Menso S, De Nictolis M. The role of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma and risk of lymph node metastasis: association with 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining. *Cancer*. 1998;82(5):886-92.
15. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2001; 358:781.
16. Hernádi Z, Szarka K, Sápy T, Krasznai Z, Veress G, Poka R. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow up. *BJOG*. 2003;110(2):205-9.
17. Herrera-Gómez A, Granados-García M, González-Barón M. *Manual de Oncología. Procedimientos médico quirúrgicos*. McGraw Hill, 3^a ed. México. 2006.
18. Hording U, Ravn V, Knudsen J, Visfeldt J. The use of polymerase chain reaction to detect metastatic cancer cells within lymph nodes in stage I cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 1995;14(4):339-43.
19. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340:1154.

20. Kobayashi Y, Yoshinouchi M, Tianqi g, Nakamura K, Hongo a, Kamimura S, Mizutani Y, Kodama J, Miyagi Y, Kudo T. Presence of human papilloma virus DNA in pelvic lymph nodes can predict unexpected recurrence of cervical cancer in patients with histologically negative lymph nodes. *Clin Cancer Res.* 1998;4(4):979-83.
21. Kónya J, Veress G, Hernádi Z, Soos g, Czeglédy J, Gergely L. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with prognostic factors in invasive cervical neoplasias. *J Med Virol.* 1995;46(1):1-6.
22. Landoni F, Maneo, A Cormio, G. Class II versus class III radical hysterectomy in stage IB-IIA cervical cancer: A prospective randomized study. *Gynecol Oncol* 2001; 80:3.
23. Landoni F, Maneo A, Columbo A. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage IB-IIA cervical cancer. *Lancet* 1997; 350:535.
24. Lillo F, Galli L, Lodini S, Taccagni G, Ferrari A, Origoni M. Extralesional detection and load of human papillomavirus DNA: a possible marker of preclinical tumor spread in cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2008;12(3):204-9.
25. Lillo F, Galli L, Lodini S, Taccagni G, Ferrari A, Origoni M. Extralesional detection and load of human papillomavirus DNA: a possible marker of preclinical tumor spread in cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2008;12(3):204-9.
26. Look KY, Brunetto VL, Clarke-Pearson DL. An analysis of cell type in patients with surgically staged stage IB carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1996; 63:304.
27. Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Sliwinski W, Emerich J, Wojcikowski C. HPV and histological status of pelvic lymph node metastases in cervical cancer: a prospective study. *J Clin Pathol.* 2004;57:472-6.
28. Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, Sliwinski W, Baay M, Wozniak I, Maj B, Lukaszuk M. Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients- A prospective study. *Gynecol Oncol.* 2007;104:721-6.

29. Park JS, Rhyu KS, Kim CJ, Kim HS, Han KT, Ahn HK. Presence of oncogenic HPV DNAs in cervical carcinoma tissues and pelvic lymph nodes associating with proliferating cell nuclear antigen expression. *Gynecol Oncol.* 1996;60(3):418-23.
30. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
31. Pecorelli S, Lucia Zigliani, Franco Odicino. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2009;(105) 107–108.
32. Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, Tanner B, Brockerhoff P, Maeurer M, et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinic pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *Int J Gynecol Cancer.* 2001;11(1):39-48.
33. Poka R, Czégledy J. HPV- and node status in cervical cancer. Long-term results. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 1997;71(2):169-72.
34. Sápy T, Hernádi Z, Kónya J, Lukácskó L. Poor clinical outcome in early stage cervical cancer with human papillomavirus-18 positive lymph nodes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;90(1):93-5.
35. Sun Y, Liu GB, Yu YH Correlation between human papillomavirus DNA in the lymph nodes and metastasis of early-stage cervical carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2008;28(5):796-8.
36. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo VE. Current perspectives in cervical cáncer. *Ginecol Obstet Mex.* 2004;72(1):29-38.

18. ANEXOS

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS DE PROTOCOLO DE INVESTIGACION

“SIGNIFICADO PRONOSTICO DE LA PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN GANGLIOS LINFATICOS EN PACIENTES CON CANCER CERVICOUTERINO TRATADOS INICIALMENTE CON CIRUGIA RADICAL: ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES”

Nombre _____

Registro _____ Expediente _____

Fecha de Ingreso al INCAN _____ (dd/mm/aaaa) Fecha de Cirugía _____

Días de estancia Hospitalaria _____ IC _____ IC _____ IC _____ IC _____

Nivel Socioeconómico ___ 1.I 2.II 3.III 4.IV 5.V 6.VI 7. Subrogado 8. Exento

Historia Familiar de Cáncer ___ 0. NO 1. Padre 2.Madre 3.Hermana 4.Hermano
5. Abuelo Materno 6.Abuelo Paterno 7.Abuela Materna 8. Abuela Paterna

Sitio ___ 1.Mama 2.Colon 3.Ovario 4. Utero 5. Cérvix 6.Otro

Tabaquismo ___ 0: Negativo 1: Positivo. Edad de inicio ___ Cig. Por día ___

Alcoholismo ___ 0: Negativo 1: Positivo. Edad de inicio ___ Bebidas por día ___

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS

Enfermedades Asociadas _____ 0. No 1.DM 2.Hipertensión 3.Cardiopatía
4. Nefropatía 5.Otra

Tiempo de Duración _____ Medicamentos _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRICOS

Menarquia _____ IVSA _____ Compañeros Sexuales _____

G _____ P _____ C _____ A _____

PF _____ 0: Ninguno 1: DIU 2: Hormonales 3: Barrera 4: SPC

Menopausia _____ 0: Negativo 1: Positivo. Edad _____

THR _____ 0: Negativo 1: Positivo. Tiempo de uso _____

CANCER DE CERVIX

Signos Clínicos _____ 0.Asintomática 1.Dolor Pélvico 2.Sangrado anormal

3.Ascitis 4.Adenomegalia Inguinal 5.Derrame Pleural 6.Masa Abdominal 7.Otro

Forma de Diagnóstico Histológico _____ 0. No 1. Biopsia 2. Solo PAP 3.Biopsia

4. Guiada (TAC o US) 5.Otra

Tipo Histológico _____ 1.Epidermoide 2. Adenocarcinoma 3. Adenoescamoso

4. Neuroendócrino 5. Otro

Grado de Diferenciación _____ 1. Bien Dif. 2. Mod Dif 3. Poco Dif

4. Indiferenciado

Tamaño Tumoral _____ (dos Dimensiones por cualquier método) 0. No medido

Hb _____ Linfocitos _____ Albúmina _____ 0. No

Estudios Iniciales _____ 0. Ninguno 1. Solo Clínica 2. TAC 3. RMN 4.PET 5.Otro

Estadio Clínico _____ 0. No clasificable u Op FINC 1. Ia1 2.Ia2 3.Ib1 4.Ib2 5. IIa 6.IIb

7.Otro

CIRUGÍA

Tipo de Insición _____ 0.Media 1.Transversa

Estudio Transoperatorio _____ 0.No 1.Si

Si si _____ 1. Ganglio Pélvico 2.Ganglio Paraórtico 3. Parametrio 4. Hígado

5. Adherencias 6. Otro

Reporte del Transoperatorio _____ 0. Negativo 1. Metastático

Se abortó el procedimiento? _____ 0. No 1.Si

Tipo de histerectomía _____ 1. Tipo II 2. Tipo III 3.Mesometrial 4.Tipo IV 5. Otro

Hallazgos transoperatorios _____ 0.Ninguno 1. Ascitis 2.Adherencias 3. Ganglios
4. Otro
Nivel de la Linfadenectomía _____ 0. No realizada 1. Pélvicos 2. Paraórticos
Complicaciones Transoperatorias _____ 0.Ninguna 1. Vasculares 2.Vesicales
3.Intestinales 4. Nerviosas 5. Otras
Tiempo Quirúrgico _____
Sangrado _____
Drenajes _____ 0.No 1.Drenovac 2.Penrose 3. Biovac

REPORTE DE PATOLOGÍA

Tamaño Tumoral _____
Estirpe _____ 1.Epidermoide 2. Adenocarcinoma 3. Adenoescamoso
4. Neuroendócrino 5. Otro
Número Total de Ganglios _____ Número de Ganglios Afectados _____
PVL _____ 0: NO 1: SI
Bordes _____ 0. Negativos 1. Positivo
Parametrios _____ 0. Negativos 1. Positivo
Invasión estromal _____ mm en pared de _____ mm
Invasión Miometrial _____
0: sin invasión 1: Menos del 50% 2: Mas del 50% 3: Toda la Pared
Aduvancia _____ 0.Ninguna 1. RT 2. QT/RT 3. QT 4. Otro _____

REPORTE DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Tumor Primario

VPH _____ 0. Negativo 1.Positivo

Tipo viral _____

Ganglios Linfáticos

VPH _____ 0. Negativo 1.Positivo

Tipo viral _____

RECURRENCIA

Sitio de la Recurrencia _____

0: Ausente 1: Local 2: Distancia (Sitio) _____ 3: Locorregional

PLE _____ (meses) Fecha de diagnóstico _____ (dd/mm/aaaa)

Sintomatología _____ 0.Asintomática 1.Dolor Pélvico 2.Distensión Abdominal
3.Ascitis 4.Adenomegalia Inguinal 5.Derrame Pleural 6.Masa Abdominal 7.Otro

Forma de Diagnóstico _____ 1. Clínica 2.TAC 3.RMN 4.US 5.Otro

Localización _____ 1. Pélvico 2.Abdominal 3.Abdomino-pélvico 4.Para-aórtico
5.Carcinomatosis

Tamaño Tumoral _____ (dos Dimensiones por cualquier método) 0. No medido

Tratamiento _____ 0.No 1.Cirugía 2.QT 3. Solo biopsia 4. Otro _____

Exenteración _____ 0. No 1. Total 2.Anterior 3. Posterior

Fecha de Cirugía _____ (dd/mm/aaaa)

STATUS _____ 1. VSAT 2.MSAT 3.VCAT 4.MCAT

ÚLTIMA VISITA _____ (dd/mm/aaaa)

SOBREVIDA GLOBAL _____ (Meses)

Observaciones: _____