



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA
“INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA”**

TÍTULO:

**“AMPLIFICACIÓN DEL DNA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
(VPH) EN LOS BORDES NEGATIVOS DE LA PIEZA QUIRÚRGICA DE
PACIENTES CON CARCINOMA CERVICO UTERINO SOMETIDAS A
HISTERECTOMÍA RADICAL”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO(A) EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

DRA. SYLVIA VERÓNICA VILLAVICENCIO VALENCIA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DAVID FRANCISCO CANTÚ DE LEÓN

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

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, enero de 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia
Alumna del Programa de Maestría en Ciencias Médicas



Dr. David Francisco Cantú de León
Director de Tesis

**Responsable del programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud en el
Instituto Nacional de Cancerología**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre conmigo.

A mis padres, por haberme formado como la persona que soy actualmente, me brindaron todas las oportunidades, me motivaron constantemente a alcanzar mis sueños y me mostraron el camino a la superación.

A mis hermanos y mi familia, por brindarme su tiempo, apoyo incondicional y no dejarme vencer nunca, por su motivación constante a ser una mejor profesionista.

A mis amigos, que siempre me brindaron consejos y apoyo incondicional para culminar esta etapa de mi vida.

A mis maestros, por transmitirme todos sus conocimientos y el tiempo y dedicación que me brindaron a lo largo de este proceso.

A mi hija, por ser mi inspiración para superarme día a día, espero algún día ser el mejor ejemplo para ti...

INDICE

Índice	4
Resumen.....	5
Antecedentes	7
Epidemiología y factores relevantes	7
Quimioterapia neo adyuvante seguido de cirugía para el tratamiento del cáncer cervicouterino localmente avanzado	10
Factores pronósticos en cáncer cervicouterino (Ca Cu)	13
Enfermedad residual mínima (ERM)	14
Virus Del Papiloma Humano (VPH)	15
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Materiales y métodos	17
Diseño	17
Población (pacientes)	18
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	18
Métodos	18
Preparación de las muestras	19
Extracción de ADN	20
Reacción en cadena de la polimerasa	20
Tamaño de la muestra	21
Análisis Estadístico	22
Resultados	22
Discusión	24
Bibliografía.....	26
Anexos.....	31

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer cervicouterino, la cuarta causa de cáncer en mujeres alrededor del mundo, representa más del 85% de mortalidad en países en vías de desarrollo y el 15% de estas muertes, ocurren en Latinoamérica. En México, solo el 15% de los casos son detectados en etapas tempranas. A pesar de los esfuerzos realizados a lo largo del tiempo, la carga general de la enfermedad, los resultados del tratamiento y el número de mujeres que buscan atención siguen rezagados en comparación con los países más desarrollados, dando como resultado una alta mortalidad en estos casos. El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más común en mujeres en nuestro país, y las tasas de mortalidad a pesar de tener un decremento del 2000 a 2013), no han sido sustanciales en disminuir sustancialmente la mortalidad en nuestra población. El virus del papiloma humano (VPH) es catalogado como el agente etiopatogénico del cáncer cervicouterino (Ca Cu) y la presencia de este en los bordes quirúrgicos de resección puede ser un factor predictor de recurrencia. Uno de los factores pronósticos más importantes en los tumores sólidos, es la presencia de bordes libres de resección durante el procedimiento quirúrgico. El tratamiento para tumores voluminosos (tamaño tumoral > 4 cm) ha cambiado radicalmente durante la última década. Se han probado dos opciones de tratamiento en estos casos: Quimio-radioterapia o quimioterapia neoadyuvante. Los esquemas de tratamiento han sido muy variables en cuanto a la dosis, combinación de agentes empleados y el número de ciclos administrados. En general, se han usado esquemas combinados que incluyen agentes que han demostrado ser más activos, como son el cisplatino, ifosfamida, alcaloides de la vinca, metrotexate y bleomicina. Algunos esquemas, especialmente a base de platinos, también actúan como radio-potenciadores. En este tipo de tumores se han descrito diversos factores pronósticos que influyen tanto en la tasa de éxito del tratamiento, como en la probabilidad de presentar recurrencia, como son: tamaño tumoral, estirpe histológica, grado de invasión del estroma cervical y presencia de ganglios linfáticos pélvicos positivos, siendo éstos factores los que influyen en la tasa de recurrencia en etapas tempranas. Lo anterior no es válido para tumores mayores, donde la carga tumoral parece ser el factor más importante en la recaída. Recientemente se han introducido otros factores como la muco-producción, la sobreexpresión de oncogenes como *C-MYC*, *K-ras* y *HER-2/neu* y la angiogénesis tumoral. La determinación de Enfermedad residual mínima (ERM) mediante histología de rutina y citología, es subóptima debido a la baja sensibilidad. La utilización de métodos ultrasensibles como tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es de vital importancia para detectar en forma segura la presencia de micro-metástasis. La presencia de un aumento en la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor primario se asocia con un aumento en la incidencia de la enfermedad metastásica, por cual los compuestos anti-angiogénicos pueden jugar un papel importante en el manejo de la ERM.

Hipótesis: La presencia de ADN de VPH en los bordes quirúrgicos de resección histológicamente negativos es un factor de mal pronóstico que correlaciona con el aumento de la tasa de recurrencia tumoral.

Objetivo general: Determinar la presencia de ADN de VPH mediante PCR en los bordes parametriales histológicamente negativos de pacientes tratadas con histerectomía radical por carcinoma cervicouterino.

Material y Métodos: Se trata de un estudio ambispectivo observacional y analítico.

Se revisaron los expedientes clínicos de todas aquellas pacientes con el diagnóstico de cáncer cervicouterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología durante el período de enero de 1999 a diciembre del 2000. Se seleccionaron aquellos casos con cáncer cervicouterino en estadios clínicos localmente avanzados que recibieron quimioterapia neoadyuvante y que posteriormente fueron sometidas a histerectomía radical tipo III + linfadenectomía pélvica bilateral (LPB). El reporte de patología de las piezas quirúrgicas de todas las pacientes incluidas en el presente estudio, incluyó el reporte de bordes parametriales negativos. Se formaron dos grupos de pacientes, el primero de ellos que cumplía con las características ya mencionadas (criterios de inclusión) y que hubieran presentado **recurrencia** dentro del período de 6 meses del diagnóstico y posterior al procedimiento quirúrgico, el cual fue catalogado como **Casos** y el segundo grupo con las mismas características (criterios de inclusión), pero **sin evidencia de recurrencia** clínica en el mismo período de 6 meses del diagnóstico y posterior al procedimiento quirúrgico, catalogado como **Controles**. En ambos grupos se evaluaron características clínicas como edad, tabaquismo, número de compañeros sexuales y tamaño tumoral; así como características histológicas como grado de diferenciación, queratinización, muco-producción, permeación linfovascular y densidad microvascular o angiogénesis.

Resultados: Se revisaron los expedientes clínicos de 75 pacientes a las cuales se les realizó el diagnóstico de cáncer cervicouterino, seleccionando solo 65 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y que contaban con bloques de parafina para la obtención de las muestras tanto de inmuno-histoquímica como de PCR. De los 65 pacientes, 18 se catalogaron como casos (recurrencia corroborada clínica e histológicamente) y 47 como controles (sin recurrencia clínica ni histológica). La edad promedio en los casos fue de 45 años (DE de 9.79 años), y en los controles de 46 años (DE 8.62 años). El inicio de la menarca en los casos fue similar en ambos grupos, 12 años para los casos y 13 años para los controles. El inicio de la vida sexual activa no varía mucho en ambos grupos, 16 años para los casos y 18 años para los controles. El número de gestas a la vez es similar en ambos grupos, 5 para los casos

y 6 para los controles. El número de compañeros sexuales en el grupo de los casos fue: 56% un solo compañero, 33% dos compañeros y 11% tres o más compañeros sexuales, en el grupo de los controles: 62% tuvieron un solo compañero, 30% dos compañeros y 8% tres o más compañeros sexuales. El seguimiento en ambos grupos fue similar, con un promedio de 16.11 meses (DE 7.26) para los casos y 15.61 meses (DE 6.79) para los controles. El tiempo promedio de recurrencia en el grupo de los casos fue de 7.78 meses (DE 4.47). Los estadios clínicos encontrados en el grupo de casos fueron de 17% EC IB2, 11% EC IIA, 44% EC IIB, ningún EC IIIA y 28% EC IIIB. En el grupo de los controles fue 15% EC IB2, 15% EC IIA, 58% EC IIB, 2% EC IIIB, y 10% EC IIIB. En el tamaño tumoral, hubo una reducción significativa posterior a la administración de la quimioterapia en ambos grupos, en los casos de 6.17 cm a 3.28 cm y en los controles de 5.62 cm a 2.32 cm, obteniendo una significancia estadística al comparar el tamaño inicial y el tamaño final en ambos grupos con valor de $p < 0.0001$. La mayoría de los pacientes tenían tumores pobremente diferenciados en ambos grupos, 78% en el grupo de casos y 66% en el grupo de controles. La queratinización y la permeación vascular-linfática no demostraron tener alguna intervención como factores de mal pronóstico en ambos grupos de pacientes. La mucoproducción demostró una relación inversa en ambos grupos, encontrándose presente en el 67% de los casos y solo el 36% de los controles, logrando una significancia estadística ($p < 0.004$). La presencia de angiogénesis (MVD) en el grupo de casos también reveló una asociación significativa con mal pronóstico, ya que el grupo de casos tuvo mayor producción de vasos que el grupo control ($p < 0.0001$). Al analizar los resultados de la determinación de VPH a través de la técnica de PCR, encontramos que en el 55.6% en el grupo de casos (10 pacientes) tuvieron positiva la prueba. En el grupo de controles solo el 21.3% (10 pacientes) la presentaron positiva, siendo en este grupo control, mayor el porcentaje de pacientes que la tuvieron negativa (78.7%). Al analizar el riesgo relativo, se obtuvo un odds ratio de 4.6 (IC 95% 1.44-14.79). Se realizó un análisis multivariado incluyendo tres variables que han sido significativas hasta el momento: VPH por PCR, mucoproducción y densidad microvascular (Angiogénesis). Solo la determinación de VPH por PCR y la mucoproducción se mantuvieron con significancia estadística: VPH por PCR ($p < 0.014$) y mucoproducción ($p < 0.006$).

Discusión: El carcinoma cervicouterino invasor continúa siendo una de las neoplasias más prevalentes en nuestro país. A lo largo del tiempo se han buscado identificar factores de pronóstico que puedan modificar la recurrencia o que puedan predecir que pacientes pueden tener una recurrencia más temprana de la enfermedad. Con la prueba de VPH, se detecta ADN de los tipos de virus del papiloma humano que causan casi todos los cánceres cervicouterinos. Esta prueba podría ser valorada como un complemento a la evaluación histopatológica realizada, con la finalidad de establecer una correlación directa de la presencia del VHP desde las pruebas iniciales del diagnóstico y que nos sirvan para predecir si en la pieza quirúrgica se encuentra positivo a VPH, tratando de esta manera de implementar tratamientos multimodales más agresivos, en un afán de controlar la enfermedad. Se puede considerar este estudio después del análisis de los datos, como un estudio generador de hipótesis que permitirá realizar estudios para la identificación de algunos otros factores que puedan ser candidatos como marcadores de recurrencia temprana que puedan ser utilizados para individualizar el tratamiento de las pacientes.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, Reacción en cadena de la polimerasa, enfermedad residual mínima

TITULO: AMPLIFICACIÓN DEL DNA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN LOS BORDES NEGATIVOS DE LA PIEZA QUIRÚRGICA DE PACIENTES CON CARCINOMA CERVICO UTERINO SOMETIDAS A HISTERECTOMÍA RADICAL

ANTECEDENTES

EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES RELEVANTES

En épocas recientes, las neoplasias se han clasificado como las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Para 2012, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés "*International Agency for Research on Cancer*") reportó 14.1 millones de nuevos casos, 4.6 millones de muertes y una prevalencia de 32.6 millones de personas, cifras que se pueden incrementarse en años subsecuentes [1]. En América Latina y el Caribe, la incidencia de cáncer reportada por IARC en 2012, fue de 1.1 millones, con más de 600,00 muertes y una prevalencia de 2.6 millones de personas con cáncer, siendo las causas más frecuentes, próstata, mama, colon, pulmón y cáncer cérvicouterino [1, 2].

En 2012, a nivel mundial, de acuerdo con el reporte de GLOBOCAN, el cáncer cérvicouterino (Ca Cu), fue la cuarta causa más común de cáncer en la mujer con 528,000 nuevos casos y 266,000 muertes [2]. Más de 85% de estos casos, ocurren en países en desarrollo [2, 4]. Este, afecta predominantemente a mujeres con desventajas culturales, económicas y sociales, de tal forma que es mucho más común en los países en desarrollo, donde la incidencia es del 85% de los casos nuevos, a diferencia de los países desarrollados, en los que solo se registra el 3,6% de estos casos [3].

El cáncer cérvicouterino, la cuarta causa de cáncer en mujeres alrededor del mundo, representa más del 85% de mortalidad en países en vías de desarrollo y el 15% de estas muertes, ocurren en Latinoamérica [4]. En México, solo el 15% de los casos son detectados en etapas tempranas. A pesar de los esfuerzos realizados a lo largo del tiempo, la carga general de la enfermedad, los resultados del tratamiento y el número de mujeres que buscan atención siguen rezagados en comparación con los países más desarrollados, dando como resultado una alta mortalidad en estos casos [4].

En muchos países, incluidos los Estados Unidos (EE. UU) y países de Europa Occidental, la incidencia del Ca Cu recientemente ha disminuido debido a las pruebas citológicas de detección y pruebas de detección de los tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo [4].

El cáncer cérvicouterino es el segundo cáncer más común en mujeres en nuestro país, y las tasas de mortalidad a pesar de tener un decremento del 2000 a 2013 (Tabla 1), no han sido sustanciales en disminuir sustancialmente la mortalidad en nuestra población (Figura 1) [5].

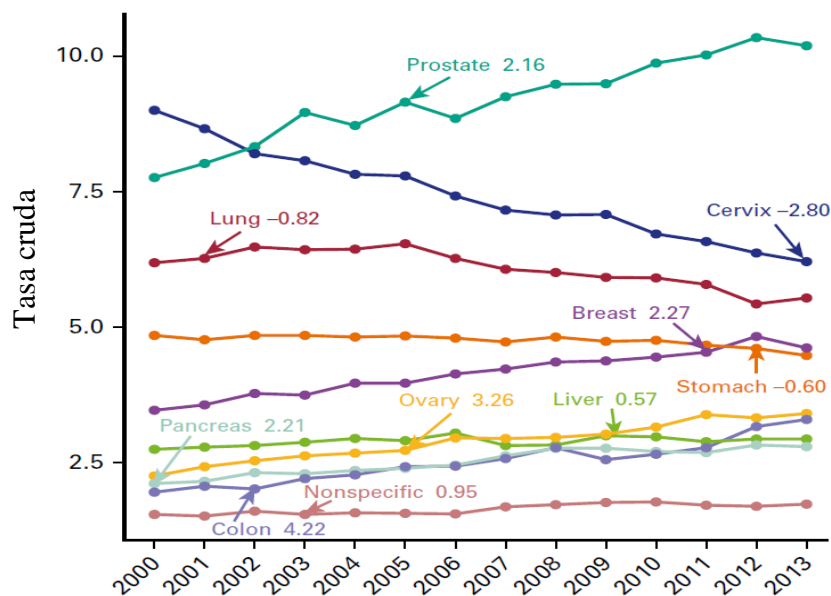
Tabla 1. Causas principales de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (2000-2013).

Tasa de mortalidad por año														
Localización del cáncer	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Mama	6.77	6.93	7.33	7.28	7.71	7.71	8.04	8.21	8.48	8.50	8.65	8.81	9.36	8.94
Cervical	9.00	8.66	8.20	8.07	7.82	7.79	7.42	7.16	7.07	7.08	6.72	6.58	6.37	6.21
Estómago	4.32	4.42	4.46	4.44	4.45	4.54	4.40	4.34	4.41	4.29	4.36	4.41	4.24	4.16
Pulmón	3.92	3.87	4.07	4.00	4.13	4.06	4.12	4.01	3.96	3.94	4.04	4.08	3.72	3.94
Hígado	2.94	3.06	2.97	3.04	3.09	3.01	3.18	2.94	3.02	3.18	3.06	2.97	2.99	3.04
Ovario	2.26	2.43	2.54	2.63	2.68	2.73	2.96	2.95	2.97	3.03	3.16	3.39	3.33	3.41
Páncreas	2.23	2.23	2.39	2.37	2.42	2.47	2.51	2.72	2.83	2.82	2.83	2.86	2.85	2.96
Colon	1.96	2.13	2.01	2.27	2.33	2.41	2.39	2.62	2.62	2.34	2.48	2.58	2.96	3.10
No especificado	1.58	1.57	1.64	1.63	1.59	1.61	1.59	1.72	1.75	1.84	1.80	1.68	1.65	1.76
Linfoma No Hodgkin	1.08	1.14	1.22	1.30	1.16	1.25	1.32	1.37	1.35	1.41	1.36	1.44	1.50	1.34
Total	60.22	60.66	61.51	62.18	63.23	64.16	64.93	65.71	66.75	67.80	68.94	69.94	70.70	64.71

Nota: Tasa cruda por 100,000 mujeres mexicanas. Datos usados con permiso.

Tabla obtenida de: Mohar Betancourt Alejandro, Reynoso Noveron Nancy, Armas Texta Daniel, Gutiérrez Delgado Cristina, Torres Domínguez Juan A. "CANCER TRENDS IN MEXICO: ESSENTIAL DATA FOR THE CREATION AND FOLLOW-UP OF PUBLIC POLICIES". Journal of Global Oncology 2017 Dec; Vol 3(Issue 6):740-8

Figura 1. Tendencias de mortalidad por tipo de cáncer por 100,000 habitantes en México, 2000-2013.



En el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCAN) el número de pacientes con este tumor se ha reportado con una tasa de 7.3 en el año 2016 [6].

El virus del papiloma humano (VPH) es catalogado como el agente etiopatogénico del cáncer cérvicouterino (Ca Cu) y la presencia de este en los bordes quirúrgicos de resección puede ser un factor predictor de recurrencia [7].

Uno de los factores pronósticos más importantes en los tumores sólidos, es la presencia de bordes libres de resección durante el procedimiento quirúrgico. Sin embargo, en Cáncer cérvicouterino (Ca Cu), el hecho que microscópicamente los bordes quirúrgicos se encuentren libres de neoplasia, no necesariamente indica que el tejido no se encuentra infectado por el VPH, ya que por métodos moleculares se puede hacer evidente la presencia de células infectadas residuales [7].

Cuando el tumor se encuentra localizado solo en el cérvix es curable en un porcentaje importante de casos (supervivencia a 5 años en Estadio Clínico [EC 1] I de 91.5%) no importando el tratamiento administrado. La cirugía radical es el método de elección en el manejo inicial de las pacientes con carcinoma cérvicouterino confinado al cérvix, siendo las pacientes con tumores menores de 4cm [EC IB1] las candidatas ideales para este manejo, ya que la probabilidad de presentar enfermedad ganglionar es aproximadamente de 15%, haciendo que el procedimiento quirúrgico sea la mejor modalidad terapéutica [7].

El tratamiento para tumores voluminosos (tamaño tumoral > 4 cm) ha cambiado radicalmente durante la última década. Se han probado dos opciones de tratamiento en estos casos: Quimio-radioterapia o quimioterapia neoadyuvante. Existen varios grupos colaborativos americanos y europeos que han probado que la combinación de quimioterapia con radioterapia sea considerada como el estándar de tratamiento en estadios con tumores voluminosos [7, 8] (Estadios IB2 o más de acuerdo a la Clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia [FIGO]) (En la Tabla 2 se muestra la clasificación del cáncer cérvicouterino según la FIGO), esto debido a la mayor probabilidad de presentar enfermedad ganglionar y compromiso parametrial, lo que hace que la cirugía de inicio no sea el tratamiento ideal. En la actualidad esta modalidad terapéutica está cambiando y se ha tratado de probar que la quimioterapia neoadyuvante o en combinación con radioterapia seguida de tratamiento quirúrgico es de utilidad en el tratamiento de este grupo de pacientes [7, 8].

La tasa de recurrencia para las pacientes con Ca Cu en general es del 35% y en EC IB1 es de aproximadamente 13%, en pacientes sometidas a procedimiento quirúrgico o tratadas con radioterapia [7, 8].

Tabla 2. Clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) para Cáncer Cervical.

Appendix 1 / FIGO staging of Cervical carcinomas

Stage I Stage I is carcinoma strictly confined to the cervix; extension to the uterine corpus should be disregarded. The diagnosis of both Stages IA1 and IA2 should be based on microscopic examination of removed tissue, preferably a cone, which must include the entire lesion.

- **Stage IA:** Invasive cancer identified only microscopically. Invasion is limited to measured stromal invasion with a maximum depth of 5 mm and no wider than 7 mm.
- **Stage IA1:** Stage IA1: Measured invasion of the stroma no greater than 3 mm in depth and no wider than 7 mm diameter.
- **Stage IA2:** Stage IA2: Measured invasion of stroma greater than 3 mm but no greater than 5 mm in depth and no wider than 7 mm in diameter.
- **Stage IB:** Stage IB: Clinical lesions confined to the cervix or preclinical lesions greater than Stage IA. All gross lesions even with superficial invasion are Stage IB cancers.
- **Stage IB1:** Stage IB1: Clinical lesions no greater than 4 cm in size.
- **Stage IB2:** Stage IB2: Clinical lesions greater than 4 cm in size.

Stage II Stage II is carcinoma that extends beyond the cervix, but does not extend into the pelvic wall. The carcinoma involves the vagina, but not as far as the lower third.

- **Stage IIA:** No obvious parametrial involvement. Involvement of up to the upper two-thirds of the vagina.
- **Stage IAB:** Obvious parametrial involvement, but not into the pelvic sidewall.

Stage III Stage III is carcinoma that has extended into the pelvic sidewall. On rectal examination, there is no cancer-free space between the tumour and the pelvic sidewall. The tumour involves the lower third of the vagina. All cases with hydronephrosis or a non-functioning kidney are Stage III cancers.

- **Stage IIIA:** No extension into the pelvic sidewall but involvement of the lower third of the vagina.
- **Stage IIIB:** Extension into the pelvic sidewall or hydronephrosis or non-functioning kidney.

Stage IV Stage IV is carcinoma that has extended beyond the true pelvis or has clinically involved the mucosa of the bladder and/or rectum.

- **Stage IVA:** Spread of the tumour into adjacent pelvic organs.
- **Stage IVB:** Spread to distant organs.

Source: TNM Classification of malignant tumours. L. Sobin and Ch Wittekind (eds.), UICC International Union against Cancer, Geneva, Switzerland. pp155-157; 6th ed. 2002

QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE SEGUIDO DE CIRUGIA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO LOCALMENTE AVANZADO

Los resultados adversos obtenidos en los estudios en los que se administró radioterapia como consolidación local posterior a la quimioterapia, llevó a pensar que la quimioterapia seguido de radiación no parecía ser la combinación terapéutica óptima; por lo que se iniciaron los ensayos de quimioterapia neoadyuvante seguido de cirugía con o sin radioterapia adicional dependiendo de los factores de mal pronóstico encontrados en la pieza quirúrgica. Así, es esperable que aun con respuestas parciales a la quimioterapia el tumor residual puede ser eliminado por la cirugía y de administrarse radioterapia postoperatoria la posibilidad de erradicar completamente las células tumorales residuales podría ser mayor, al reducirse la carga tumoral [14]. Los esquemas de tratamiento han sido muy variables en cuanto a la dosis, combinación de agentes empleados y el número de ciclos administrados. En general, se han usado esquemas combinados que incluyen agentes que han demostrado ser más activos, como son el cisplatino, ifosfamida, alcaloides de la vinca, metrotexate y bleomicina [8, 10].

Eddy y colaboradores en un estudio fase II, incluyó 35 pacientes y usando vincristina y cisplatino seguido de histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral en pacientes con estadios IB de la

FIGO, observó que la mayoría de los pacientes con tumores voluminosos pueden ser susceptibles a resección quirúrgica (32 pacientes de 35 pacientes fueron sometidos a cirugía) o bien alcanzar respuestas parciales o completas posterior a la quimioterapia (6% respuesta completa, 76% respuesta parcial, 15% respuesta estable y 3% progresión de la enfermedad) y que en ambos casos, comparados con controles históricos, se ha observado un efecto favorable sobre la supervivencia libre de progresión (74%) [9].

Hasta 1996, se publicaron 18 estudios fase II con esta modalidad de quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía radical para pacientes con carcinoma cérvicouterino. Todos los regímenes probados fueron a base de cisplatino con o sin otras combinaciones de medicamentos. Estos estudios han sido útiles para determinar la factibilidad de esta modalidad de tratamiento, así como para evaluar los porcentajes de respuesta y toxicidad. En general, estos estudios fase II han demostrado que:

- 1) Las respuestas globales dependen del estadio clínico de presentación inicial, siendo del 85% para pacientes con Estadios clínicos IB y IIA, 88% para los estadios IIB, 74% para el estadio clínico III y 47% para estadios clínicos IV;
- 2) Existe una clara correlación negativa entre el estadio de la enfermedad y las respuestas clínicas completas que van del 28% al 7% acordes al estadio clínico IB al IV;
- 3) La operabilidad también depende del estadio clínico, 94% para estadios IB y IIA, 74% para el IIB y 58% para los III y IV.

Muchos de estos estudios fase II, usaron controles históricos y demostraron supervivencias comparables. Pocos estudios mostraron una mejoría en la supervivencia global con el uso de quimioterapia neoadyuvante antes de la cirugía radical [10].

Benedetti Panici y colaboradores, estudiaron 130 pacientes en EC IB2 a III, quienes recibieron quimioterapia neoadyuvante a base de cisplatino en dos regímenes (primer régimen Cisplatino, Bleomicina y Metrotexate y el segundo régimen cisplatino y bleomicina a altas dosis). El análisis de regresión logística demostró que el estadio clínico (FIGO), el tamaño tumoral, el compromiso parametrial y el tipo histológico, son altos predictores de respuesta. El 83% de los casos respondieron a la quimioterapia y de estos, 15% tuvieron respuesta completa. La supervivencia global estimada a 10 años fue de 91%, 80% y 34-5% para estadios clínicos IB2-IIA voluminosos, IIB y III respectivamente ($p < 0.001$) [11].

Hasta el momento se han publicado dos estudios aleatorizados en los cuales se ha administrado quimioterapia neoadyuvante seguido de cirugía. Sardi y colaboradores, aleatorizaron 150 pacientes en estadios IIB en tres brazos: a) radioterapia a las pacientes del primer brazo, b) quimioterapia seguido de cirugía al segundo y c) quimioterapia seguido de radioterapia al tercer grupo. En el brazo de cirugía, la respuesta global fue del 87% y el 77% de las pacientes pudieron ser resecadas. La supervivencia a 4 años de seguimiento fue de 37, 63 y 53% respectivamente [12].

En un estudio aleatorizado, multicéntrico (14 centros participantes) publicado en 2002, se incluyeron 441 pacientes en estadios clínicos de IB2 a III, quienes fueron aleatorizados a: a) quimioterapia seguida de cirugía (histerectomía tipos III o IV) (se incluyeron 201 pacientes) y b) radioterapia sola (Radioterapia externa 45 a 50 Gy, seguida de braquiterapia 20 a 30 Gy) (se incluyeron 199 pacientes). Los esquemas utilizados fueron varios, pero todos a base de cisplatino. La supervivencia global y la supervivencia libre de progresión a 5 años fue de 58.9% y 55.4% para el primer grupo y 44.5% y 41.3% para el segundo grupo ($p=0.007$). El análisis de supervivencia por subgrupos global y libre de progresión mostró una tasa de supervivencia de 64.7% y 59.7% para los estadios IB2.IIB del grupo de quimioterapia seguido de cirugía, comparado con 46.4% y 46.7% para los mismos estadios del grupo de Radioterapia ($p=0.005$). Para las pacientes en estadios III la diferencia no alcanzó a tener significancia estadística (41.6 versus 36.7% con $p=0.36$). Esta falta de significancia podría explicarse por un número insuficiente de pacientes con estadios III incluidas. En conclusión, la adición de la quimioterapia incrementa significativamente la tasa de control pélvico y consecuentemente la supervivencia de los pacientes, sugiriendo que este tipo de terapia combinada puede ser el tratamiento estándar de pacientes con carcinoma cérvicouterino localmente avanzado [13].

Los resultados de los dos estudios anteriores confirman que el mejor tratamiento loco-regional después de quimioterapia neoadyuvante es la cirugía. Sin embargo, este último estudio no fue concluyente sobre la superioridad del tratamiento experimental debido a que la radioterapia administrada al grupo control se puede considerar subóptima de acuerdo con los patrones de tratamiento actuales y, además, el tratamiento estándar hasta antes del 2002 era radioterapia concomitante con quimioterapia.

En 2007, una revisión sobre la quimioterapia neoadyuvante en cáncer cérvicouterino (Ca Cu), reportó que los fundamentos para el uso de quimioterapia neoadyuvante son: 1) La reducción del tamaño tumoral, puede reducir la distorsión pélvica por el tamaño tumoral y facilitar el uso de radioterapia (RT) subsecuente. 2) La reducción del tamaño tumoral tiene como objetivo facilitar los procedimientos quirúrgicos y la posible transformación de un tumor inoperable en un tumor radicalmente resecable. 3) La quimioterapia puede incrementar la radio-sensibilidad y disminuir la fracción de células hipóxicas. Algunos esquemas, especialmente a base de platinos, también actúan como radio-potenciadores. Una ventaja adicional es que la vascularización y la consecuente distribución de la droga, es mejor en un tejido no dañado comparado con uno previamente dañado. Se concluye en esta revisión, que la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante es un importante factor pronóstico y ayuda en la decisión de abordajes terapéuticos futuros [14]. Se realizaron varios estudios utilizando la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con carcinoma cérvicouterino; varios estudios aleatorizados que evaluaron la quimioterapia neoadyuvante seguida de radioterapia no demostraron beneficio al compararla con radioterapia sola [14]. Otros estudios que compararon la quimioterapia neoadyuvante seguida de radioterapia, si encontraron

beneficio al usar este régimen. Incluso, muchos estudios demostraron un incremento en la supervivencia de los pacientes sujetos a quimioterapia neoadyuvante cuando se comparó con radioterapia sola [14]. Los resultados reportados por el metaanálisis llevado a cabo por el Grupo Colaborativo de estudio del Cáncer Cervical Localmente Avanzado fueron analizados a detalle. En este análisis, se realizaron dos diferentes comparaciones: a) quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía y b) radioterapia radical sola. Este estudio, demostró que usando quimioterapia con ciclos de duración de 14 días o menos o dosis de cisplatino más intensas (25 mg/m²) por semana mostraron una ventaja en la supervivencia, contrario a estudios en donde se usaron esquemas con una duración mayor de 14 días o una intensidad de dosis menor que la reportada previamente. La segunda comparación evidenció una reducción significativa en el riesgo de muerte en el grupo de quimioterapia seguida de cirugía [14].

En nuestra experiencia, en un estudio fase II con cisplatino y gemcitabine, realizado por Dueñas-González y colaboradores [15], se incluyeron 41 pacientes con diagnóstico de carcinoma cérvicouterino (Ca Cu) en estadios clínicos IB2 a IIIB de la FIGO. La quimioterapia neoadyuvante fue a base de cisplatino y gemcitabine, seguidos de tratamiento loco-regional ya sea con cirugía versus quimio-radioterapia. Cuarenta pacientes fueron evaluados para respuesta; la respuesta objetiva global fue del 95% lo que permitió realizar la cirugía al 57.5% de los pacientes, observando que tenían tiempo quirúrgico y complicaciones similares al obtenido con cirugía sola en etapas tempranas [16]. Interesantemente, de 23 pacientes que fueron llevadas a cirugía, se obtuvieron respuestas patológicas completas en 26% de ellas [15].

Por lo anterior, se deben realizar estudios fase III comparando quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía contra un grupo control tratado con radioterapia concomitante con quimioterapia. Sin embargo, antes de realizar este tipo de estudios fase III es importante realizar estudios fase II de quimioterapia seguida de cirugía incorporando esquemas potencialmente más activos.

FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER CERVICOUTERINO (CA CU)

En este tipo de tumores se han descrito diversos factores pronósticos que influyen tanto en la tasa de éxito del tratamiento, como en la probabilidad de presentar recurrencia. Diversos autores han demostrado que el tamaño tumoral, así como la estirpe histológica, el grado de invasión del estroma cervical y la presencia de ganglios linfáticos pélvicos positivos son los factores más importantes que influyen en la tasa de recurrencia en pacientes con tumores en etapas tempranas. Lo anterior no es válido para tumores mayores, en los cuales la carga tumoral parece ser el factor más importante en la recaída [8, 17].

En el Instituto Nacional de Cancerología se han realizado diversos estudios para determinar qué factores son importantes en el pronóstico de estas enfermas, así tenemos que, en el análisis de Barragán y

colaboradores, el tamaño tumoral y número de ganglios linfáticos afectados son los factores más importantes en la recurrencia de las pacientes, llegando a tener una tasa de hasta 20% en aquellas pacientes con ganglios positivos [18].

Se han estudiado algunos otros criterios que pudiesen ser tomados como factores pronósticos, entre ellos se incluye la edad de la paciente, el nivel de hemoglobina y estirpe histológica. Recientemente se han introducido otros factores como la muco-producción, la sobreexpresión de oncogenes como *C-MYC*, *K-ras* y *HER-2/neu* y la angiogénesis tumoral [8].

En algunos tumores como cáncer de mama, próstata, melanoma y cérvix, las propiedades angiogénicas se relacionan con la agresividad del tumor. De tal manera que algunos estudios como los de Satfl y Mattingly [19], sugieren que la neovascularización es observada en aquellos casos de cáncer *in situ* que progresan a cáncer invasor y los autores consideran que la densidad microvascular (MVD por sus siglas en inglés (*Microvessel density*)) es un parámetro pronóstico independiente para el período libre de enfermedad en pacientes con Ca Cu estadios clínicos IB y IIA. Dinh [20], estudió 22 pacientes con cáncer cervical estadio clínico Ib y encontró que el tamaño tumoral y el número de microvasos son predictores de recurrencia temprana, al igual que lo encontrado por Cooper y colaboradores [21] y Cantú y colaboradores [22].

ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA (ERM)

Hay evidencia suficiente para mencionar que los tumores sólidos pueden ser divididos en tumores de bajo, mediano y alto riesgo de recurrencia, en relación con el perfil pronóstico que consiste en: estadio clínico de la enfermedad, tamaño y grado tumoral, compromiso ganglionar y diversos marcadores genéticos y moleculares. Por lo que, con el fin de proporcionar la terapia más adecuada, es de vital importancia poder identificar en qué grupo se clasificaría cada paciente [23]. Esta asociación se ha documentado en una amplia variedad de neoplasias malignas de cabeza y cuello, mama, melanoma, pulmón, etc. [23, 24].

La determinación de ERM mediante histología de rutina y citología es subóptima debido a la baja sensibilidad. La utilización de métodos ultrasensibles como tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es de vital importancia para detectar en forma segura la presencia de micro-metástasis [23].

La evaluación rutinaria de los ganglios linfáticos por medio de microscopía de luz no es adecuada para la detección de micro-metástasis. La inmunohistoquímica y los métodos moleculares han tenido un éxito importante, logrando sobre-estadificar los ganglios entre el 9-60% de los casos, lo cual hace que esta evaluación sea útil para el planteamiento del tratamiento. Por otro lado, la PCR permite la detección de una célula tumoral entre 1×10^6 células normales [23, 24].

En la actualidad, se sabe que la presencia de micro-metástasis tanto en ganglios linfáticos como en médula ósea se presenta en forma regular sin importar el tipo de neoplasia. Lo que parece jugar un papel importante en la presencia de ERM son los factores biológicos que permiten que las células malignas puedan en un momento dado iniciar el crecimiento de una lesión metastásica [24]. Dentro de los múltiples factores que afectan este potencial, también se encuentra la capacidad de adhesión de la célula tumoral [23]. Asimismo, la expresión de oncogenes puede jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedad metastásica [17].

La presencia de un aumento en la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor primario se asocia con un aumento en la incidencia de la enfermedad metastásica [25], por cual los compuestos anti-angiogénicos pueden jugar un papel importante en el manejo de la ERM.

La finalidad de la determinación de ERM es proveer al clínico de datos pronósticos suficientes que le permitan tomar decisiones terapéuticas individualizadas de acuerdo con las características de cada paciente [23].

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN cuyas partículas de forma icosaédrica miden aproximadamente 54 nm de diámetro. El genoma viral está constituido aproximadamente por 8,000 nucleótidos en forma de ADN circular de doble cadena. Con base a su secuencia génica se clasifican en más de 100 tipos virales que infectan tanto animales como humanos [26].

Durante la década pasada, el VPH ha emergido como un factor principal en la patogénesis de Ca Cu [27, 28, 29]. Los genes E6 y E7 de tipos de VPH de alto riesgo (serotipos 16 y 18), son los que participan en la iniciación y mantenimiento del fenotipo maligno y su interacción con productos de genes supresores de tumores como *p53* y *pRb* ha sido ampliamente discutida [27].

Desde que la presencia de ADN del VPH en muestras de Papanicolaou se ha asociado con un riesgo relativo alto (mayor de 50) de neoplasia intraepitelial cervical existente o cáncer cérvicouterino, las pruebas para detectar la presencia de VPH se han propuesto como un complemento de la citología en la evaluación cervical [28].

El 99.7% de todos los carcinomas cérvicouterinos invasores están asociados al VPH, el resto pueden no estarlo; sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que la sensibilidad de la prueba de detección del VPH sea baja [30]. El ADN de VPH puede ser determinado en 68% de las muestras de citología cérvicovaginal en mujeres con displasia leve y en hasta el 85% de las pacientes con displasia severa y Ca Cu *in situ*. Adicionalmente, 95% de éstos se han encontrado en material de biopsias de CaCu

después de la extracción de ADN [31]. Sin embargo, se deben de tomar en cuenta otros factores como el tabaquismo, la utilización de anticonceptivos orales, la paridad, el inmuno-compromiso, etc. [31, 32].

Los resultados de estudios prospectivos realizados a la fecha apoyan el concepto que la neoplasia intraepitelial cervical, es precedida por la presencia persistente de ADN de VPH detectada en mujeres sanas [28, 33, 34].

Aproximadamente 30 tipos de VPH se han identificado en el tracto genital, el VPH 6, 11 y 12 se asocian a Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de bajo grado, mientras que NIC de alto grado y carcinomas invasores se asocian a VPH 16 y 18 [38, 39]. El serotipo de VPH se ha asociado con la histología de la lesión, así tenemos que el VPH 16 prevalece en carcinoma de células escamosas, mientras que el VPH 18 con adenocarcinomas. Además, el ADN del VPH se ha encontrado tanto en líneas celulares derivadas de carcinoma cérvicouterino (HeLa), como en metástasis en ganglios linfáticos pélvicos [27, 35, 36, 37, 38].

La PCR es una técnica versátil, ya que es aplicable a especímenes clínicos, tales como sedimento urinario, leucocitos, vellosidades coriónicas y otros tejidos o células [31]. La PCR se utiliza para amplificar la secuencia molecular de ADN del VPH contenida en muestras tisulares [27, 31].

Sin embargo, por ser la PCR un método sensible, debe de ser realizada en forma cuidadosa, ya que, si no se toman las medidas pertinentes para evitar la detección de contaminantes como plásmidos de VPH clonados y productos propios de la PCR, se obtendrán resultados falsos. Una característica importante de la determinación de PCR en tejido en parafina es tener cuidado de que la reacción no sea inhibida por ninguno de los agentes fijadores [31]. Cuando se realiza PCR en muestras de tejidos, se debe tomar en cuenta que cada corte de tejido es diferente del anterior y del posterior por lo que se debe incluir una tinción con Hematoxilina y Eosina (HE) para cada muestra analizada [31].

La positividad para VPH en un tumor metastásico de origen no determinado indica la posibilidad de un primario en el cérvix. Por otro lado, el análisis de estas metástasis por PCR no difiere del VPH encontrado en metástasis de carcinoma cérvicouterino. Por lo que la PCR puede ser una importante herramienta en el análisis patológico de tumores primarios y metastásicos [31, 38].

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervical es el tumor ginecológico más frecuente en las mujeres mexicanas (34.5%), un grupo de pacientes se encuentra en etapas tempranas. No obstante que la tasa de recurrencia en este último grupo no es mayor de 13%, es importante identificar a las pacientes que requerirán una terapia más agresiva mediante la determinación de Enfermedad Residual Mínima. La determinación de ADN de VPH en los bordes quirúrgicos de resección reportados como negativos (tumor primario) puede ser utilizado como un

método eficaz en la determinación de enfermedad residual mínima y de esta manera identificar aquellas pacientes que tengan una mayor probabilidad de recurrencia temprana.

HIPÓTESIS

La presencia de ADN de VPH en los bordes quirúrgicos de resección histológicamente negativos es un factor de mal pronóstico que correlaciona con el aumento de la tasa de recurrencia tumoral.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de ADN de VPH mediante PCR en los bordes parametriales histológicamente negativos de pacientes tratadas con histerectomía radical por carcinoma cérvicouterino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar si la presencia de ADN del VPH amplificado por PCR de las piezas quirúrgicas de histerectomía radical es un factor de mal pronóstico para recurrencia.
- 2.- Demostrar si la presencia de otros factores como grado histológico, queratinización, muco-producción, permeación vascular y linfática (PVL), angiogénesis (MVD por sus siglas en inglés “*microvessel density*” o densidad microvascular), son factores de mal pronóstico para recurrencia en estas pacientes.

MATERIALES Y METODOS

Diseño

Se trata de un estudio ambispectivo observacional y analítico.

Población (pacientes)

Se revisaron los expedientes clínicos de todas aquellas pacientes con el diagnóstico de cáncer cérvicouterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología durante el período de enero de 1999 a diciembre del 2000. Se seleccionaron aquellos casos con cáncer cérvicouterino en estadios clínicos localmente avanzados que recibieron quimioterapia neoadyuvante y que posteriormente fueron sometidas a histerectomía radical tipo III + linfadenectomía pélvica bilateral (LPB). El reporte de patología de las piezas quirúrgicas de todas las pacientes incluidas en el presente estudio, incluyó el reporte de bordes parametriales negativos. Todos los casos incluidos contaban con bloques de parafina tanto de la biopsia inicial como de la pieza quirúrgica para estudio.

Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación tomados en cuenta en todas las pacientes son los siguientes:

Criterios de Inclusión.

- Diagnóstico confirmado de cáncer cérvicouterino
- Estirpe histológica carcinoma epidermoide o adenoescamoso
- Estadios clínicos Ib2, IIa, IIb, IIIa y IIIb según la FIGO
- Que hubieran recibido quimioterapia neoadyuvante
- Que se hayan sido sometidas a histerectomía radical tipo III
- Que presentara parametrios histológicamente negativos reportado en pieza quirúrgica
- Que hubiera disponibilidad de los bloques de parafina
- Que se contara con un seguimiento mínimo de 6 meses

Criterios de Exclusión.

- Pacientes que hubieran sido tratadas fuera del Instituto Nacional de Cancerología
- Pacientes con diagnóstico de un doble primario
- Pacientes positivos para el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia humana)
- Pacientes en los que los bloques de parafina no contaran con material suficiente para la extracción de DNA y, por consiguiente, para la determinación de VPH.

Criterios de Eliminación.

- Pacientes en los que el DNA obtenido de las muestras, no hubieran sido de calidad o cantidad suficiente para la realización de la determinación de VPH
- Pacientes en los que el expediente clínico no hubiera estado completo para la obtención de los datos requeridos.

Métodos

Se formaron dos grupos de pacientes, el primero de ellos que cumplía con las características ya mencionadas (criterios de inclusión) y que hubieran presentado **recurrencia** dentro del período de 6 meses del diagnóstico y posterior al procedimiento quirúrgico, el cual fue catalogado como **Casos** y el segundo grupo con las mismas características (criterios de inclusión), pero **sin evidencia de recurrencia** clínica en el mismo periodo de 6 meses del diagnóstico y posterior al procedimiento quirúrgico, catalogado como **Controles**.

En ambos grupos se evaluaron características clínicas como edad, tabaquismo, número de compañeros sexuales y tamaño tumoral; así como características histológicas como grado de diferenciación, queratinización, muco-producción, permeación linfovascular y densidad microvascular o angiogénesis (MVD). A las pacientes de ambos grupos, se les realizó un seguimiento estrecho acorde al tipo de quimioterapia que recibieron, para valorar efectos secundarios de la misma. Como parte del seguimiento, se realizaron evaluaciones del tamaño tumoral previo al inicio de la quimioterapia y posterior a la administración del tercer ciclo, previo a ser sometidas al procedimiento quirúrgico. A todas las pacientes se les realizó una histerectomía radical tipo 3 con linfadenectomía pélvica bilateral. El procedimiento quirúrgico fue realizado por el mismo cirujano para evitar modificaciones en el procedimiento mismo. La primera evaluación se realizó al mes de post-operada y posteriormente cada 3 meses durante los dos primeros años. Si antes de cumplir los tres meses de periodo de seguimiento entre visita y visita la paciente presentaba alguna alteración como dolor pélvico, sangrado, exudado vaginal, etc., podía acudir a consulta de manera abierta.

Se tomaron muestras de tejido embebido en parafina tanto de la biopsia inicial al diagnóstico de carcinoma cérvicouterino, así como de los bordes parametriales para la realización de PCR.

Se obtuvo una muestra de tejido cervical normal sin evidencia de cáncer ni VPH en las piezas quirúrgicas de las pacientes que se incluyeron en el estudio, para ser examinadas por Hematoxilina y Eosina (H&E) como control para el procesamiento de las muestras de PCR.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de patología (H&E) fueron evaluadas por un solo patólogo experto para garantizar homogeneidad en los diagnósticos y muestras seleccionadas. De todas las muestras obtenidas (bloques de parafina) se obtuvieron 5-6 cortes de 7 μ m, de los cuales 2 de ellos se montaron en laminillas y se les realizó preparación especial para las tinciones de inmuno-histoquímica (CD-34).

Se obtuvieron de 3 a 5 cortes de tejido de 7 μ m y de 2 a 4 muestras se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Previo a un período de entrenamiento de aproximadamente 4 meses, se realizó la extracción del DNA mediante la técnica ya descrita y una vez cuantificado por espectrofotometría se llevó a cabo la amplificación específica de la secuencia de 240pb para la detección de VPH.

El tejido se desparafinó con 1 ml de N-octano. La suspensión se mezcló por 2 minutos y se centrifugó por 5 minutos en una centrífuga Eppendorf (Merck, Darmstadt, FRG) a 1200 rpm. La muestra de tejido fue

lavada en dos ocasiones con 1 ml de etanol al 100% y una vez con 0.5 ml de acetona. El sobrenadante se decantó y el botón se secó al vacío. La muestra obtenida se resuspendió con 65 µl de agua destilada.

La primera y la última muestra de cada tejido fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) con el fin de ser empleados como controles histo-morfológicos [31].

EXTRACCIÓN DE ADN

Al botón de tejido de las muestras de tejido tumoral cervical y bordes parametriales, se suspendió en agua destilada y se le agregaron 400 µl de una solución amortiguadora (Tris 50mM + EDTA 1 mM), 12 µl de SDS al 20% y 6 µl de proteinasa K (20µg/ml). La digestión se realizó a 55 °C durante la noche. Después de la digestión se realizó la extracción del ADN mediante etanol-fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La precipitación del ADN se realizó con etanol, y el botón se resuspendió en 50 µl de agua destilada. Finalmente, el ADN fue cuantificado por espectrofotometría.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Amplificación del gen de β-globina (control): Las muestras de ADN extraído se amplificaron para determinar la presencia de un fragmento de 268 pares de bases (pb) del gen de la β-globina (gen constitutivo “housekeeping gen”) utilizando los oligonucleótidos descritos por Resnick [42].

Amplificación de la región L1 de VPH: Para llevar a cabo la amplificación del VPH se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

L1C1: 5'- CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT - 3'

L1C2: 5'- TACCCTAAATACTCTGTATTG - 3'

Estos oligonucleótidos pueden identificar al menos 25 tipos de VPH (tipos 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33,-35, 42-45, 51-56, 58, 59, 61, 66, 68 y 70) [43]. Todas las muestras se amplificaron con los oligonucleótidos universales descritos previamente, localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH. Estos oligonucleótidos generan un fragmento de 240 pares de bases que detectan un gran número de las secuencias de virus del papiloma humano. En el laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología, la sensibilidad de esta prueba usando estos oligonucleótidos es del 95%. Dadas las características de la prueba, la especificidad es del 100% ya que en todos los casos se utilizan los controles apropiados para descartar falsos positivos.

La reacción de PCR se realiza en un volumen de 20 µl conteniendo 20 pmoles para cada uno de los oligonucleótidos; 2 µl de amortiguador para PCR 10 X, 2 µl de una solución a 200 mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl a una concentración final de 2 mM y 0.15 µl (0.75 U) de polimerasa Taq Gold (Perkin Elmer). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo 480.

La reacción de PCR consistió en: desnaturalización por 12 minutos a 94°C seguido de 38 ciclos de un minuto a 94 °C; un minuto a 48°C y un minuto a 72°C seguido de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Secuencia del DNA de los productos de la PCR de L1: Para confirmar que los productos de la PCR corresponden a la región L1 del genoma del VPH, la amplificación se secuenció con un método de secuenciación directa según las indicaciones del proveedor. Posteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para el cálculo de tamaño de muestra tenemos:

- 1) Basándonos en los resultados de un estudio piloto realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de determinación de VPH mediante PCR en bordes quirúrgicos de piezas de histerectomía radical de pacientes con carcinoma cérvicouterino EC 1B1, tenemos:

Recurrencia	PCR		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	7	0	7
Negativa	1	6	7
Total	8	6	14

Usando la siguiente fórmula:

$$N = [2PQ(Z\alpha + Z\beta)^2] / \Delta^2$$

P1= 0.5 (total de éxitos en el primer grupo)

P2=0.07 (total de éxitos en el segundo grupo)

$\Delta = 0.43$

Resultado: 17 sujetos para cada grupo (casos y controles)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la distribución de frecuencia de cada una de las variables. Se realizó determinación de Chi cuadrada, Odds Ratio (RR) para el análisis de resultado de PCR en ambos grupos de casos y controles.

Se realizó un análisis bivariado en las variables dicotómicas para determinar cuáles variables se asociaban estadísticamente, para posteriormente incluirlas en el análisis multivariado. Todas las pruebas se evaluaron a un 95% del nivel de confianza ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Se revisaron los expedientes clínicos de 75 pacientes a las cuales se les realizó el diagnóstico de cáncer cérvicouterino, seleccionando solo 65 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y que contaban con bloques de parafina para la obtención de las muestras tanto de inmuno-histoquímica como de PCR.

De los 65 pacientes, 18 se catalogaron como casos ya que cumplían con todos los criterios además de recurrencia corroborada clínica e histológicamente. Cuarenta y siete pacientes fueron catalogados como controles ya que hasta la última evaluación clínica dentro del periodo de seguimiento no habían presentado recurrencia ni clínica ni histológica.

La edad promedio en el grupo 1 (casos) fue de 45 años con una desviación estándar (DE) de 9.79 años, y en el grupo 2 (controles) de 46 años (DE 8.62 años). El inicio de la menarca en los casos fue similar en ambos grupos, 12 años para los casos y 13 años para los controles. El inicio de la vida sexual activa no varía mucho en ambos grupos, 16 años para los casos y 18 años para los controles. El número de gestas a la vez es similar en ambos grupos, 5 para los casos y 6 para los controles. El número de compañeros sexuales en el grupo de los casos fue: 56% un solo compañero, 33% dos compañeros y 11% tres o más compañeros sexuales, en el grupo de los controles: 62% tuvieron un solo compañero, 30% dos compañeros y 8% tres o más compañeros sexuales (*ver Tabla 3*).

El seguimiento en ambos grupos fue similar, con un promedio de 16.11 meses (DE 7.26) para los casos y 15.61 meses (DE 6.79) para los controles. El tiempo promedio de recurrencia en el grupo de los casos fue de 7.78 meses (DE 4.47) (*ver Tabla 3*).

Los estadios clínicos encontrados en el grupo de casos fueron de 17% EC IB2, 11% EC IIA, 44% EC IIB, ningún EC IIIA y 28% EC IIIB. En el grupo de los controles fue 15% EC IB2, 15% EC IIA, 58% EC IIB, 2% EC IIIB, y 10% EC IIIB (*ver Tabla 4*).

Los esquemas de quimioterapia que recibieron las pacientes en ambos grupos pueden visualizarse en la *Tabla 5*.

En relación con el tamaño tumoral, hubo una reducción significativa posterior a la administración de la quimioterapia en ambos grupos, en los casos de 6.17 cm a 3.28 cm y en los controles de 5.62 cm a 2.32 cm, obteniendo una significancia estadística al comparar el tamaño inicial y el tamaño final en ambos grupos con valor de $p < 0.0001$ (*ver Tabla 6*).

Las características patológicas demuestran que la mayoría de los pacientes tenían tumores pobremente diferenciados en ambos grupos, 78% en el grupo de casos y 66% en el grupo de controles. La queratinización y la permeación vascular-linfática no demostraron tener alguna intervención como factores de mal pronóstico en ambos grupos de pacientes. La mucoproducción demostró una relación inversa en ambos grupos, encontrándose presente en el 67% de los casos y solo el 36% de los controles, logrando una significancia estadística ($p < 0.004$), lo cual tiene una tendencia significativa a que la mucoproducción puede ser considerada un factor de mal pronóstico en nuestro grupo de casos para recurrencia locorregional. La presencia de angiogénesis (MVD) en el grupo de casos también reveló una asociación significativa con mal pronóstico, ya que el grupo de casos tuvo mayor producción de vasos que el grupo control ($p < 0.0001$) (*ver Tabla 7*).

Al analizar los resultados de la determinación de VPH a través de la técnica de PCR, encontramos que en el 55.6% en el grupo de casos (10 pacientes) tuvieron positiva la prueba. En el grupo 2 de controles solo el 21.3% (10 pacientes) la presentaron positiva, siendo el este grupo 2 mayor el porcentaje de pacientes que la tuvieron negativa (78.7%). Al analizar el riesgo relativo comparando ambos casos, se obtuvo un odds ratio de 4.6 (IC 95% 1.44-14.79). (*ver Tabla 8*).

Se realizó un análisis multivariado incluyendo tres variables que han sido significativas hasta el momento: VPH por PCR, mucoproducción y densidad microvascular (Angiogénesis). Se obtuvieron los siguientes resultados: Solo la determinación de VPH por PCR y la mucoproducción se mantuvieron con significancia estadística: VPH por PCR ($p < 0.014$) y mucoproducción ($p < 0.006$) (*ver Tabla 9*).

DISCUSION

El carcinoma cérvicouterino invasor continúa siendo una de las neoplasias más prevalentes en nuestro país. A lo largo del tiempo se han buscado identificar factores de pronóstico que puedan modificar la recurrencia o que puedan predecir que pacientes pueden tener una recurrencia más temprana de la enfermedad.

En el Instituto Nacional de Cancerología se han realizado diversos estudios para determinar qué factores son importantes en el pronóstico de estas enfermas, así tenemos que, en el análisis de Barragán y colaboradores, el tamaño tumoral y número de ganglios linfáticos afectados son los factores más importantes en la recurrencia de las pacientes, llegando a tener una tasa de hasta 20% en aquellas pacientes con ganglios positivos [18].

La presencia de micro metástasis tanto en ganglios linfáticos como en médula ósea se presenta en forma regular no importando el tipo de neoplasia. Lo que parece jugar un papel importante en la presencia de ERM son los factores biológicos que permiten que las células malignas puedan en un momento dado iniciar el crecimiento de una lesión metastásica [24]. Dentro de los múltiples factores que afectan este potencial se encuentra la capacidad de adhesión de la célula tumoral [23]. Así mismo la expresión de oncogenes puede jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedad metastásica [17].

La presencia de un aumento en la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor primario se asocia con un aumento en la incidencia de la enfermedad metastásica [25], por lo cual los compuestos anti-angiogénicos pueden jugar un papel importante en el manejo de la ERM.

En el año 2017, Barquet y colaboradores., publicaron un estudio donde se evaluaba la histología como factor de mal pronóstico de recurrencia en un grupo de pacientes llevadas a cirugía, no pudiendo demostrar que ese sea un verdadero factor asociado a una recurrencia temprana en un grupo particular de pacientes que son llevados a cirugía de inicio [40]. En nuestro estudio, 78% de los casos y 66% de los controles, presentaron histologías pobremente diferenciadas, sin embargo, a pesar de este resultado, no se pudo demostrar que la histología pueda ser considerado un factor de mal pronóstico para este tipo de pacientes ($p=0.396$).

En el año 2017 se publicó un estudio por Ferrandina y cols., donde se explora la posibilidad de no realizar linfadenectomía en pacientes llevados a cirugía radical posterior a la administración de quimio-radioterapia preoperatoria y se muestra por estos autores que una buena evaluación prequirúrgica de la enfermedad residual puede evitar la realización del 40% de las linfadenectomías en este grupo particular de pacientes

en etapas IB2-IIB ya que solo una de las que tenían respuesta completa en el cérvix presentó enfermedad ganglionar pélvica y otra presentó enfermedad metastásica en ganglios para-aórticos [41].

En nuestro estudio logramos identificar que el factor pronóstico más importante de riesgo para presentar recurrencia temprana fue la positividad de VPH en los márgenes quirúrgicos de resección, lo que hace necesario la realización de un estudio de mayores dimensiones con un grupo más amplio de pacientes para poder confirmar los nuestros resultados. De igual manera, la presencia de la densidad microvascular y mucoproducción se asociaron con un incremento en el número de recurrencias. Como es sabido, la neovascularización del tumor y de las zonas circunvecinas, se considera un paso esencial para el crecimiento local del tumor y el desarrollo de metástasis a distancia. La arquitectura vascular y la densidad de los vasos son diferentes en varias zonas del cérvix asociadas al crecimiento tumoral. Existen varios reportes que indican que la presencia de angiogénesis puede influenciar el pronóstico de estos tumores cervicales.

Los resultados obtenidos en la determinación de VPH por PCR, podrían asociarse a los resultados obtenidos en las pruebas de Papanicolaou (pap), ya que es bien sabido que la prueba de pap es negativa a VPH, el riesgo de presentar cáncer cérvicouterino es sumamente bajo. Con la prueba de VPH, se detecta ADN de los tipos de virus del papiloma humano que causan casi todos los cánceres cérvicouterinos. Además, se detectan cambios anómalos en las células, los cuales se asocian a la presencia de cáncer. Esta prueba podría ser valorada como un complemento a la evaluación histopatológica realizada, con la finalidad de establecer una correlación directa de la presencia del VHP desde las pruebas iniciales del diagnóstico y que nos sirvan para predecir si en la pieza quirúrgica se encuentra positivo a VPH, tratando de esta manera de implementar tratamientos multimodales más agresivos, en un afán de controlar la enfermedad.

Se puede considerar este estudio después del análisis de los datos, como un estudio generador de hipótesis que permitirá realizar estudios para la identificación de algunos otros factores que puedan ser candidatos como marcadores de recurrencia temprana que puedan ser utilizados para individualizar el tratamiento de las pacientes.

BIBLIOGRAFIA.

1. **Reynoso Noveron Nancy**, Meneses García Abelardo, Erazo Valle Aura, Escudero de los Ríos Pedro, Kuri Morales Pablo Antonio, Mohar Betancourt Alejandro. CHALLENGES IN THEIR DEVELOPMENT AND IMPLEMENTATION OF THE NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER CONTROL PROGRAM IN MEXICO. *Salud Pública Mex* 2016; 58(2): Mar-Apr
2. **Ferlay J**, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Lyon, Fr: Int Agency Res Cancer (2013); [Last accessed on 2017 Jan 15]. GLOBOCAN 2012 v1.0, CANCER INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE: *IARC CancerBase* No. 11 [Internet] <http://globocan.iarc.fr>.
3. **Siegel R**, Jemal A, Ma Z, Zou Z. CANCER STATISTICS. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64:9–29.
4. **Ager BJ**, Gallardo-Rincón D, de León DC, Chávez-Blanco A, Chuang L, Dueñas-González A, Gómez-García E, Jerez R, Jhingran A, McCormack M, Mileshkin L, Pérez-Plasencia C, Plante M, Poveda A, Gaffney DK. ADVANCING CLINICAL RESEARCH GLOBALLY: CERVICAL CANCER RESEARCH NETWORK FROM MEXICO. *Gynecol Oncol Rep*. 2018 Jun 12; 25:90-93. doi: 10.1016/j.gore.2018.06.007. eCollection 2018 Aug.
5. **Mohar Betancourt Alejandro**, Reynoso Noveron Nancy, Armas Texta Daniel, Gutiérrez Delgado Cristina, Torres Domínguez Juan A. CANCER TRENDS IN MEXICO: ESSENTIAL DATA FOR THE CREATION AND FOLLOW-UP OF PUBLIC POLICIES. *Journal of Global Oncology* 2017 Dec; Vol 3(Issue 6):740-8
6. Instituto Nacional de Cancerología. DATOS OBTENIDOS DEL ARCHIVO CLÍNICO en el año 2016.
7. **Disaia PJ, Creasman WT**. CLINICAL GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 5a. edition 1999, ed. Harcourt Brace pp:51-106.
8. **Azria Elie**, MD, Morice Philippe, MD, Haie-Meder Christine, MD, Thoury Anne, MD, Pautier Patricia, MD, Lhomme Catherine, MD, Duvillard Pierre, MD, and Castaigne Damienne, MD. RESULTS OF HYSTERECTOMY IN PATIENTS WITH BULKY RESIDUAL DISEASE AT THE END OF CHEMORADIOTHERAPY FOR STAGE IB2/II CERVICAL CARCINOMA. *Annals of Surgical Oncology* 2005; 12(4):332-337. DOI: 10.1245/ASO.2005.05.020
9. **Eddy Gary L**, Manetta Alberto, Alvarez Ronald, Williams Laura, Creasman William. NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY WITH VINCRISTINE AND CISPLATIN FOLLOWED BY RADICAL HYSTERECTOMY AND PELVIC LYMPHADENECTOMY FOR FIGO STAGE IB BULKY CERVICAL CANCER: A GYNECOLOGIC ONCOLOGY GROUP PILOT STUDY. *Gynecologic Oncology* 1995; 57:412-416
10. **Eddy GL**, NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY BEFORE SURGERY IN CERVICAL CANCER. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1996; (21):93-6.

11. **Benedetti Panici P**, Greggi S, Scambia G, Amoroso M, Salerno MG, Maneschi F, Cutillo G, Paratore MP, Scorpiglione N, Mancuso S. LONG TERM SURVIVAL FOLLOWING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY AND RADICAL SURGERY IN LOCALLY ADVANCED CERVICAL CANCER. *European Journal of Cancer* 1998; Vol 34(3):341-346.

12. **Sardi J**, Giaroli A, Sananes C. RANDOMIZED TRIAL WITH NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN STAGE IIIB SQUAMOUS CARCINOMA CÉRVIX UTERI: AN UNEXPECTED THERAPEUTIC MANAGEMENT. *Int J Gynecol Cancer* 1996; 6: 85-93.

13. **Benedetti Panici P**, Greggi S, Colombo A, Amoroso M, Smaniotto D, Giannarelli D, Amunni G, Raspagliesi F, Zola P, Mangioni C, Landoni F. NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY AND RADICAL SURGERY VERSUS EXCLUSIVE RADIOTHERAPY IN LOCALLY ADVANCED SQUAMOUS CELL CERVICAL CANCER: RESULTS FROM THE ITALIAN MULTICENTER RANDOMIZED STUDY. *J Clin Oncol* 2002; Jan 1, 20(1):179-88.

14. **Benedetti Panici**, Bellati Filippo, Pastore Maria, Mancini Natalina, Musella Angela. AN UPDATE IN NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN CERVICAL CÁNCER. *Gynecologic Oncology* 2007; 107: S20-S22.

15. **Dueñas-Gonzalez A**, Lopez-Graniel C, Gonzalez A, Reyes M, Mota A, Muñoz D, Solorza G, Hinojosa LM, Guadarrama R, Florentino R, Mohar A, Meléndez J, Maldonado V, Chanona J, Robles E, De la Garza J. A PHASE II STUDY OF GEMCITABINE AND CISPLATIN COMBINATION AS INDUCTION CHEMOTHERAPY FOR UNTREATED LOCALLY ADVANCED CERVICAL CARCINOMA. *Ann Oncol*. 2001 Apr;12(4):541-7.

16. **Lopez-Graniel C**, Reyes M, Chanona G, Gonzalez A, Robles E, Mohar A, Lopez-Basave H, De La Garza JG, Dueñas-Gonzalez A. TYPE III RADICAL HYSTERECTOMY AFTER INDUCTION CHEMOTHERAPY FOR PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED CERVICAL CARCINOMA. *Int J Gynecol Cancer*. 2001 May-Jun;11(3):210-7.

17. **De Vita**. CANCER PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY. Lippincott, 1997.

18.- **Barragán CE, López-Graniel CM, Suchil BL, Chanona VG, Solorza LG**. FACTORES PRONOSTICO EN PACIENTES CON CANCER CERVICOUTERINO EPIDERMÓIDE TRATADAS CON HISTERECTOMIA RADICAL TIPO III. *Rev Inst Nal Cancerol* 1999; 45(4): 217-224.

19. **Staffl A**, Mattingly RF. ANGIOGENESIS OF CERVICAL NEOPLASIA. *Am J Obstet Gynecol*. 1975 Mar 15;121(6):845-52.

20.- **Dinh TV, Hannigan EV, Smith ER et al**. TUMOR ANGIOGENESIS AS A PREDICTOR DE RECURRENCE IN STAGE IB SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE CERVIX. *Obstetric Gynecol* 1996; 87:751-4.

- 21.- **Cooper RA, Wilks DP, Logue JP et al.** HIHG TUMOR ANGIOGENESIS IS ASSOCIATED WITH POORER SURVIVAL IN CARCINOMA OF THE CERVIX TREATED WITH RADIOTHERAPY. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2795-800.
- 22.- **Cantú De león D, López Graniel C, Frías Mendivil F, Chanona Vilchis G, Gómez C, De la Graza Salazar J.** SIGNIFICANCE OF MICROVASCULAR DENSITY (MVD) IN CERVICAL CENCER RECURRENCE. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13:856-862.
23. **Moss THJ.** CLINICAL RELEVANCE OF MINIMAL RESIDUAL CANCER IN PATIENTS WITH SOLID MALIGNANCIES. *Cancer and metastases review* 1999; 18:91-100.
24. **Brennan JA, Li Mao, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al.** MOLECULAR ASSESSMENT OF HISTOPATHOLOGICAL STAGING IN SQUAMOUS-CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK. *N Engl J med* 1995; 332:429-35.
25. **Folkman J.** TUMOR ANGIOGENENSIS. Saunders, 1995.
26. **Schlenger F.** TUMOR VASCULARITY – A NOVEL PROGNOSTIC FACTOR IN ADVANCED CERVICAL CARCINOMA. *Gynecol Oncol* 1995; 59:57 – 66.
27. **Ikenberg H, Hartmann M, Schmitt B, Göppinger A, Teufel G, Pflaiderer A.** HPV DNA IN AUTOPSY-DERIVED MATERIAL FROM MULTIPLE METASTASIS OF A CERVICAL CARCINOMA. *Gynecol Oncol* 1994; 54:316-320.
28. **Wallin KL, Wiklund F, Angström T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G et al.** TYPE-SPECIFIC PERSISTENCE OF HUMAN PAPILOMAVIRUS DNA BEFORE THE DEVELOPMENT OF INVASIVE CERVICAL CANCER. *N Engl J Med* 1999; 22 (341):1633-8.
29. **Cuzick PhD.** HUMAN PAPILOMAVIRUS TESTING FOR PRIMARY CERVICAL CANCER SCREENING. *JAMA* 2000; 283(1):108-9.
30. **Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al.** HUMAN PAPILOMAVIRUS IS A NECESSARY CAUSE OF INVASIVE CERVICAL CANCER WORLDWIDE. *J Pathol* 1999; 189:12-19.
31. **Claas ECJ, Melchers WJG, Vander Linden H, Lindeman J, Quint WGV.** HUMAN PAPILOMAVIRUS DETECTION IN PARAFFIN-EMBEDDED CERVICAL CARCINOMAS AND METASTASES OF THE CARCINOMAS BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION. *Am J Pathol* 1989; 135(4):703-709.
32. **Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Brudney K, Wright Jr TC.** INCIDENCE OF CERVICAL SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS IN HIV-INFECTED WOMEN. *JAMA* 2000; 283(8):1031-1037.

33. **Rozendaal L, Walboomers JMN, Vander Linden JC.** PCR-BASED HIGH-RISK HPV TEST IN CERVICAL CANCER SCREENING GIVES OBJECTIVE RISK ASSESSMENT OF WOMEN WITH CYTOMORPHOLOGICALLY NORMAL CERVICAL SMEARS. *J Int Cancer* 1996; 68:766-9.
34. **Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD.** NATURAL HISTORY OF CERVICOVAGINAL PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN YOUNG WOMEN. *N Engl J Med* 1998; 338:423-8.
35. **DeVilliers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Munz F, Miklaw H et. al.** HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA IN WOMEN WITHOUT AND WITH CYTOLOGICAL ABNORMALITIES: RESULTS OF A 5-YEAR FOLLOW-UP STUDY. *Gynecol Oncol* 1992; 44:33-39.
36. **Lancaster WD, Castellano C, Santos C, Delgado G, Kurman R, Jenson A.** HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA IN CERVICAL CARCINOMA FROM PRIMARY AND METASTASTIC SITES. *Am J Obstetric Gynecol* 1986; 154:115-118.
37. **Fuchs D, Girardi F, Pfister H.** HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 DNA IN CERVICAL CANCER AND IN LYMPH NODES OF CERVICAL CANCER PATIENTS. A DIAGNOSTIC MARKER FOR EARLY METASTASES. *Int J Cancer* 1989; 43:41-44.
38. **Mvula M, Iwasaka T, Matsuo N, Nakao Y, Kaku T, Hachisuga T, et al.** DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 PRIMARY AND IN METASTASES LESIONS OF CERVICAL CARCINOMAS. *Gynecol Oncol* 1994; 53:156-160.
39. **Ytalo N, Sorensen P, Josefsson A, Magnusson P, Andersen PK, Pontén J, et al.** CONSISTENT HIGH VIRAL LOAD OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 AND RISK OF CERVICAL CARCINOMA IN SITU: A NESTED CASE-CONTROL STUDY.
40. **Barquet-Muñoz SA, Cruz-Rodríguez E, Cantú De León DF, Isla-Ortiz D, Montalvo-Esquivel G, Herrera-Montalvo LA, Pérez-Plasencia C, Pérez-Montiel D, Herrera-Gómez Á.** HISTOLOGY AS PROGNOSTIC FACTOR IN EARLY-STAGE CERVICAL CARCINOMA. EXPERIENCE IN A THIRD-LEVEL INSTITUTION. *Rev Invest Clin.* 2017 Sep-Oct;69(5):286-292.
41. **Ferrandina G, Distefano M, Mascilini F, Gallotta V, Chiantera V, Cosentino F, Costantini B, Ercoli A, Pedone Anchora L, Fanfani F, Margariti AP, Valentini V, Scambia G.** COULD LYMPHADENECTOMY BE AVOIDED IN LOCALLY ADVANCED CERVICAL CANCER PATIENTS ADMINISTERED PREOPERATIVE CHEMORADIATION? A LARGE-SCALE RETROSPECTIVE STUDY. *Eur J Surg Oncol.* 2017 Dec;43(12):2270-2276. doi: 10.1016/j.ejso.2017.09.013.
42. **Resnick R, Cornelissen M, Wright D, Eichnigen GH, Fox HS, Schegget J et al.** DETECTION AND TYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN ARCHIVAL CERVICAL CANCER

SPECIMENS BY DNA AMPLIFICATION WITH CONSENSUS PRIMERS. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:1477-1484.

43. **Nakagawa S**, * Yano T, Nakagawa K, Takizawa S, Suzuki Y, Yasugi T, Huibregtse J M, and Taketani Y. ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND LOCALISATION OF A LAP PROTEIN, HUMAN SCRIBBLE, IN THE NORMAL AND NEOPLASTIC EPITHELIUM OF UTERINE CERVIX. *Br J Cancer*. 2004 Jan 12; 90(1): 194–199. Published online 2004 Jan 6. doi: [10.1038/sj.bjc.6601465].

ANEXOS

Tabla 3. Características clínicas de las pacientes en ambos grupos.

	CASOS (N=18) [28%]				CONTROLES (N=47) [72%]			
	Promedio	Min	Max	Desviación Estándar (DE)	Promedio	Min	Max	Desviación Estándar (DE)
Edad	45.17	24	67	9.799	46.17	27	65	8.626
Menarca	12.78	11	15	1.060	13.04	9	16	1.429
Inicio de Vida Sexual Activa (IVSA)	16.89	12	25	3.216	18.13	14	40	4.504
Gestas	5.33	0	10	2.449	6.17	0	15	3.273
Partos	4.78	0	10	2.415	5.34	0	13	3.157
Abortos	1	0	2	0.698	1	0	2	0.744
Cesáreas	1	0	2	0.514	1	0	2	0.530
Período Libre de Enfermedad	7.78	3	17	4.479	12.51	6	25	6.358
Supervivencia Global	16.11	6	28	7.267	15.62	6	28	6.791
Recurrencia	7.78			4.479				

		Casos (N=18) [28%]	Controles (N=47) [72%]
Compañeros sexuales	1 pareja	10 (56%)	29 (62%)
	2 parejas	6 (33%)	14 (30%)
	3 parejas	2 (11%)	4 (8%)

Tabla 4. Estadios clínicos en ambos grupos según la Federación Internacional de Gineco-obstetricia (FIGO).

Estadio Clínico	CASOS (N=18)		CONTROLES (N=47)		valor P
	No.	%	No.	%	
IB2	3	17	7	15	p=0.364
IIA	2	11	7	15	
IIB	8	44	27	58	
IIIA	0	0	1	2	
IIIB	5	28	5	10	

Tabla 5. Esquemas de Quimioterapia recibidos en ambos grupos.

Estadio Clínico	CASOS		CONTROLES		valor P
	No.	%	No.	%	
Cisplatino/Gemcitabina	9	50	13	27.7	p=0.126
Carboplatino/Paclitaxel	9	50	29	61.7	
Oxaliplatino/Gemcitabine	0	0	5	10.6	
Total	18	100	47	100	

Tabla 6. Tamaño tumoral inicial y pos-quimioterapia en ambos grupos.

		Inicial		Pos-Quimioterapia		Valor P
		Promedio (DE)	Min-Max	Promedio (DE)	Min-Max	
Tamaño tumoral	CASOS (N=18)	6.17 (1.24)	3 - 8	3.28 (1.84)	0 - 8	P<0.0001 (IC 2.07-3.70) *
	CONTROLES (N=47)	5.62 (1.55)	2 - 9	2.32 (1.44)	0 - 7	P<0.0001 (IC 2.77-3.82) *

*IC Intervalo de confianza 95%

Tabla 7. Características patológicas en ambos grupos

		CASOS (N=18)		CONTROLES (N=47)		Valor p
		No.	%	No.	%	
Grado histológico	Bien diferenciado	0	0	4	8	P=0.396
	Moderadamente diferenciado	4	22	12	25	
	Pobrementemente diferenciado	14	78	31	66	
Queratinización	Ausente	14	78	37	79	P=0.934
	Presente	4	22	10	21	
Permeación Linfovascular (PVL)	Ausente	0	0	14	30	P=0.070
	Leve	2	11	4	9	
	Moderada	11	61	18	38	
	Severa	5	28	11	23	
Mucoproducción	Ausente	6	33	30	64	P<0.004
	Presente	12	67	17	36	
		Promedio (DE)	Min-Max	Promedio (DE)	Min-Max	
Angiogénesis (MVD)*		40.56 (14.54)	23-87	28.91 (9.05)	20-75	P<0.000 (IC 5.65-17.63) **

*MVD (microvessel density por sus siglas en inglés, densidad microvascular

** IC Intervalo de Confianza 95%

Tabla 8. Resultados de PCR en ambos grupos

PCR	CASOS		CONTROLES		Valor p	Odds Ratio
	No.	%	No.	%		
PCR positivo	10	55.6	10	21.3	P=0.007	OR 4.6 (IC 95% 1.44 – 14.79)
PCR negativo	8	44.4	37	78.7		

Tabla 9. Análisis Multivariado

	Odds Ratio	IC	Valor p
Mucoproducción	5.2	1.62 – 16.85	P = 0.006
VPH por PCR	4.9	1.38 – 17.69	P = 0.014
MVD	1.053	0.94 – 1.17	P = 0.910