



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Cancerología
Campo del Conocimiento de las Ciencias Médicas

“Perfil de expresión de miRNAs asociado a la histología en
pacientes con cáncer epitelial de endometrio”

Tesis para optar por el grado de
Doctor en Ciencias Médicas

Presenta:

Salim Abraham Barquet Muñoz

Tutor

Dr. David Francisco Cantú de León
Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México, octubre del 2023



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.

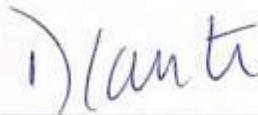
Salim Abraham Barquet Muñoz
Alumno
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. David Francisco Cantú de León
Tutor principal
Instituto Nacional de Cancerología

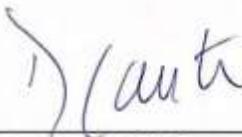
Dr. David Cantú de León
Responsable de Entidad Académica
Instituto Nacional de Cancerología



Salim Abraham Barquet Muñoz
Alumno
Instituto Nacional de Cancerología



Dr. David Francisco Cantú de León
Tutor principal
Instituto Nacional de Cancerología



Dr. David Cantú de León
Responsable de Entidad Académica
Instituto Nacional de Cancerología

Nombre del proyecto

Perfil de expresión de miRNAs asociado a la histología en pacientes con cáncer epitelial de endometrio.

Alumno

Salim Abraham Barquet Muñoz
Maestro en Ciencias
Instituto Nacional de Cancerología
Adscrito al departamento de Ginecología Oncológica

Tutor

David Francisco Cantú de León
Doctor en Ciencias Médicas
Director de la Subdirección de Investigación
Instituto Nacional de Cancerología

Comité tutor

1. Diddier Giovanni Prada Ortega
Doctor en Ciencias Biomédicas
Investigador en Ciencias Médicas E
Instituto Nacional de Cancerología
2. Luis Alonso Herrera Montalvo
Doctor en Ciencias Biomédicas
Dirección General
Instituto Nacional de Medicina Genómica
3. Alfredo Hidalgo Miranda
Doctor en Ciencias Biomédicas
Jefe de Laboratorio de Genómica en Cáncer
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Índice

1. Resumen	6
2. Abreviaturas	7
3. Marco teórico	8
4. Problema y pregunta de investigación	27
5. Justificación	28
6. Hipótesis y objetivos	29
7. Material y métodos	30
8. Resultados	39
9. Discusión	57
10. Conclusiones	62
11. Referencias	63
12. Anexos	71

1. Resumen

Antecedentes: El cáncer epitelial de endometrio (CEE) es una neoplasia maligna originada de las células epiteliales endometriales. Su incidencia va en aumento a nivel mundial, por el incremento en la expectativa de vida. Entre los factores pronósticos más importantes se encuentra la histología. Los miRNAs son secuencias de RNA de entre 20-25 ácidos nucleicos que suprimen la transcripción del RNA mensajero y que se relacionan fuertemente con la biogénesis del cáncer, particularmente con el CEE. Sin embargo, hay poca información en relación con los miRNAs y las distintas histologías. El conocer los miRNAs asociados a histologías de mal pronóstico ayudarán en un futuro determinar potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos en las distintas histologías de los CEE.

Objetivo: Identificar un perfil de miRNAs asociado a cada una de las histologías en el CEE.
Métodos: Se realizó una fase de descubrimiento en una cohorte retrospectiva con bloques de parafina de pacientes con CEE estratificados por histologías incluyendo carcinoma endometriode G1-2, carcinoma endometriode G3, carcinoma seroso papilar, carcinoma de células claras y carcinosarcoma. Se llevó a cabo miRNA-seq por medio de la plataforma Illumina y se obtuvo un perfil de miRNA por cada histología de CEE. En una segunda fase de validación se incluyeron mujeres mayores de 18 años con diagnóstico CEE identificadas en el departamento de Ginecología Oncológica del INCa de forma prospectiva. Las muestras de tejido tumoral fueron recolectadas en el estudio transoperatorio de la histerectomía realizada; posteriormente con qPCR se compararon las expresiones de los miRNAs en las histologías de mal pronóstico. Se realizará análisis estadístico descriptivo incluyendo de tendencia central. Se calculará la sobrevida global y la supervivencia libre de enfermedad con método de Kaplan Meier y se comparará con prueba de log-rank. Se tomará el valor $p < 0.05$ como significancia estadística.

Resultados: Se identificó un perfil de expresión para cada histología estudiada. Para el CEE endometriode G1-2 los miRNAs expresados que se seleccionaron para el perfil fueron miRNA-379 ($p < 0.001$), miRNA-455 ($p < 0.001$) y el miRNA-542 ($p < 0.001$); para endometriode G3 miRNA-187 ($p < 0.001$), miRNA-582 ($p < 0.001$) y el miRNA-675 ($p < 0.001$); para el seroso papilar los miRNA-129-1 ($p < 0.001$), miRNA196a-1 ($p < 0.001$) y miRNA-485 ($p < 0.001$); para células claras los miRNA-99a ($p < 0.001$), miRNA-100 ($p < 0.001$) y miRNA-133a ($p < 0.001$); finalmente, para el carcinosarcoma se identificaron miRNA-139 ($p < 0.001$), miRNA-143 ($p < 0.001$) y miRNA-424 ($p < 0.001$). En la etapa de validación con muestras independientes se identificó que el miRNA-424 estaba subexpresado en carcinosarcoma en comparación con tejido sano ($p = 0.044$).

Conclusiones: Se identificaron un perfil de expresión de miRNAs para cada histología del CEE. En una validación independiente se identificó que el miRNA-424 estaba subexpresado en la histología carcinosarcoma. Estos resultados pueden contribuir a la identificación y posteriormente a su validación clínica de biomarcadores, así como potenciales blancos terapéuticos asociados en las vías de señalización en donde están involucrados los perfiles de miRNAs descritos.

2. Abreviaturas

CEE: cáncer epitelial de ovario

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

HR: Hazard Ratio

miRNA: microRNA

AGO: proteína tipo argonauta

RISC: Complejo de silenciamiento

isomiR: isoformas de miRNA

qRT-PCR: reacción en cadena con polimerasa- transcriptasa reversa cuantitativa

IMC: índice de masa corporal

MAP2K1: quinasa quinasa específica dual 1

3. Marco teórico

Introducción

El cáncer epitelial de endometrio (CEE) es una neoplasia maligna que se origina de las células epiteliales endometriales.¹ En México su incidencia es de 2,606 casos al año siendo 2do cáncer ginecológico, con una mortalidad de 1,142 casos al año, siendo 3ro cáncer ginecológico.² La incidencia de esta neoplasia va en aumento a nivel mundial, especialmente debido tanto al aumento en la expectativa de vida como a la prevalencia de obesidad.³ El CEE representa el 90% de las neoplasias malignas de útero.⁴

El abordaje inicial es con una estadificación quirúrgica y establecer posteriormente los factores de riesgo de recurrencia para el tratamiento adyuvante.⁵ El pronóstico de las paciente con CEE dependerán de la histología, la afección ganglionar, la presencia de permeación linfovascular, entre otros factores.⁶ La histología no endometriode se considera uno de los factores pronóstico más importantes y que se asocia a una disminución en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global, siendo en etapas avanzadas menor al 50%.

A pesar de que las causas exactas de la carcinogénesis endometrial permanecen inciertas, diversas mutaciones en genes, cambios epigenéticos y cambios post-transcripcionales han sido descritos en líneas celulares y pacientes con CEE.¹ Dada la relación de los distintos tipos histológicos con la etapa de presentación y la supervivencia de las pacientes con CEE, es necesario encontrar biomarcadores, como los miRNAs, que predigan el curso clínico de la enfermedad y detectar de forma temprana a aquellas pacientes con un fenotipo tumoral más agresivo.

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes de 22 nucleótidos con capacidad de inhibir la expresión génica a través de la complementariedad de bases. Los miRNAs regulan a través de este mecanismo post-transcripcional una gran variedad de procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación celular y la apoptosis; y su expresión está asociada a diversos tipos de cáncer.⁷ En cáncer de endometrio, ha sido posible determinar una sobreexpresión de diversos miRNAs tales como miRNA-185, miRNA-106a, miRNA-181a, miRNA-210, miRNA-423, miRNA-107, miRNA-let7c, miRNA-205; mientras que miRNA-let7e, miRNA-152, miRNA-193, miRNA-204, miRNA-99b y miRNA-193b como subexpresados.⁸ El hallazgo de perfiles de miRNAs asociados a las histologías de mal pronóstico en el CEE pueden ayudar a crear líneas de investigación que ayuden a predecir el pronóstico clínico, pruebas diagnósticas y blancos terapéuticos.

Cáncer epitelial de endometrio

El CEE es una neoplasia maligna que se origina de las células epiteliales endometriales.¹ En México su incidencia es de 2,606 casos al año, ubicándolo en el 2do cáncer ginecológico, con una mortalidad de 1,142 casos al año, ubicándolo en el 3er cáncer ginecológico.² La incidencia de esta neoplasia va en aumento a nivel mundial, especialmente debido tanto al aumento en la expectativa de vida como a la prevalencia de obesidad.³ El CEE representa el 90% de las neoplasias malignas de útero.⁴

Definición del cáncer epitelial de endometrio

El CEE es una neoplasia maligna que se origina de las células epiteliales endometriales.¹ Es una entidad muy frecuente en países desarrollados, ocupando el primer lugar en incidencia en cáncer ginecológico.⁹ Debido a que sus síntomas, como el sangrado transvaginal, aparecen desde una etapa temprana, su tasa de curación es relativamente frecuente, con un pronóstico favorable en comparación con otras malignidades.

Epidemiología del cáncer epitelial de endometrio

A nivel mundial la incidencia del CEE es de 382, 069 casos al año, con una mortalidad de 89, 929 muertes al año.¹⁰ Su incidencia y mortalidad se han incrementado 1.2% y 1.1% respectivamente por año entre el 2005 al 2014.¹¹ Si se compara los países de ingreso alto con los de ingreso medio alto (como México) la incidencia anual es de 173,957 (2.4%) y 146,537 (2.1%) respectivamente; y la mortalidad anual es de 36,911 (1.3%) y 31,725 (0.74%) respectivamente. En México ocupa el 4to lugar en incidencia en neoplasias malignas en la mujer con un total de 7,266 (6.9%) casos, con una mortalidad de 1,128 casos al año.² La mediana de edad en que se diagnostica son los 61 años y la mayoría de los casos ocurren en mujeres entre los 50 y 69 años de edad.¹² Noventa por ciento de los casos ocurren en mujeres mayores de 50 años.¹³

Clasificación histológica y molecular del cáncer epitelial de endometrio

El CEE representa el 90% de las neoplasias malignas de útero. La Organización Mundial de la Salud, en su edición del 2014, establece una clasificación basada en el subtipo histológico. Entre éstos se encuentran el endometriode puro (60-65%) con sus variedades como el ciliado, secretor, villoglandular y con diferenciación escamosa; y las histologías desfavorables, que se consideran de alto grado, como el carcinoma seroso papilar (4.5%), células claras (2.5%), el desdiferenciado y el mixto (0.04%).^{4,14} El subtipo endometriode se debe gradificar para establecer su pronóstico. Su gradificación se basa en el porcentaje del patrón de crecimiento no escamoso o sólido no morular, siendo el grado 1 si existe $\leq 5\%$, grado 2 con 6-50%, y grado 3 con $>50\%$. Si hay atipia notable o arquitectura inapropiada o histologías desfavorables se considera G3.^{15,16}

Anteriormente Bokhman clasificaba en CEE según las características clínicas, patológicas y moleculares en 2 subtipos (Tabla 1). El tipo I es el más común, presentándose en un 80% y está asociado a exposición de estrógenos, bajo grado (histología endometriode), mutaciones *PTEN*, inestabilidad microsatelital. El tipo II no se relaciona con exposición hormonal, y generalmente son de alto grado (como el carcinoma seroso papilar) y presentan mutaciones en *p53*.¹⁷

	Tipo I	Tipo II
Impacto hormonal	Dependiente de estrógenos	Independiente de estrógenos
Subtipo histológico	Adenocarcinoma endometriode	Células claras, seroso-papilar, carcinosarcoma de útero
Población de pacientes	Jóvenes, perimenopáusicas	obesas, Ancianas, delgadas, postmenopáusicas
Distribución	85%	15%
Pronóstico	Bien diferenciado	Proporcionalmente mayor mortalidad
Mutaciones genéticas	<i>KRAS, PTEN, MLH1</i>	<i>p53, erbB2</i>

Se ha estudiado también las alteraciones genéticas asociadas al subtipo histológico, asociando en la mayoría de los casos a mutaciones de *p53* con los subtipos carcinoma seroso papilar y carcinosarcomas, y la mutación con *PTEN*, y alteraciones *PIK3* con carcinomas tipo endometrioides. En la tabla 2 se muestran las mutaciones más frecuentes asociadas por histología.

Tabla 2. Mutaciones asociadas por el subtipo histológico en cáncer epitelial de endometrio.¹⁸

Histología	Endometriode	Seroso	Carcinosarcoma	Células claras
Subtipo Bokhman	I	II	II	II
Mutación <i>TP53</i>	Raro	> 90%	60-90%	35%
Alteraciones <i>PI3K</i>	<i>PTEN</i> mutación (75-80%) <i>PIK3CA</i> mutación (50-60%) <i>PIK3R1</i> mutación (40-50%)	<i>PTEN</i> mutación (11%) <i>PIK3CA</i> amplificación (45%) <i>PIK3CA</i> mutación (35%) <i>PIK3R1</i> mutación (12%)	<i>PTEN</i> mutación (19%) <i>PIK3CA</i> amplificación (14%) <i>PIK3CA</i> mutación (35%)	<i>PTEN</i> perdida (80%) <i>PIK3CA</i> mutación (18%)
Mutación <i>KRAS</i>	20-30%	3%	17%	0%
Alteraciones <i>ERB</i>	Ninguna	<i>ERBB2</i> amplificado (25-30%)	<i>ERBB2</i> amplificado (13-20%) <i>ERBB3</i> alterado (13%)	<i>ERBB2</i> mutado (12%) <i>ERBB2</i> amplificado (16%)
<i>FGFR</i>	<i>FGFR2</i> mutado (12%)	<i>FGFR2</i> mutado (5%) <i>FGFR1</i> y 2 amplificados	<i>FGFR3</i> amplificado (20%)	--
Amplificado o mutado				
Wnt/ β catenina	<i>CTNNB1</i> mutado (12%)	<i>CTNNB1</i> mutado (3%)	--	--
Otros	<i>ARID1A</i> mutado (35-40%)	<i>PPP2R1A</i> mutado (20%) <i>FBXW7</i> mutado (20%) Deleción <i>LRPB1</i> Amplificación de <i>MYC</i> , <i>CCNE1</i> y <i>SOX17</i>	<i>PPP2R1A</i> mutado (28%) <i>FBXW7</i> mutado (35-40%) <i>ARID1A</i> mutado (25%) <i>CCNE1</i> amplificado (42%) <i>SOX17</i> amplificado (25%)	<i>ARID1A</i> (25%) Promotor <i>TERT</i> mutado

Actualmente, se está proponiendo el uso de una clasificación molecular basado en el *The Cancer Genome Atlas*, clasificándolo en 4 tipos genómicos de CEE. Estas categorías se basan en las características genómicas arquitecturales. Estas incluyen *POLE* mutado/ultramutado; alta inestabilidad microsatelital (MSI-H)/hipermutado; bajo número de copias (conceptualmente similar al carcinoma endometrial “tipo I”); y alto número de copias (presencia de muchas amplificaciones y deleciones genómicas) y conocido también como “similar a seroso” o al “tipo II” (Tabla 3).¹⁹

Tabla 3. Clasificación molecular del cáncer epitelial de endometrio según The Cancer Genome Atlas

Clasificación molecular	Definición
Ultramutado/ <i>POLE</i>	Alta tasa de mutación, siendo la mayoría en <i>POLE</i> .
Hypermutado/IMS	IMS, la mayoría en el promotor de metilación <i>MLH1</i> .
Anormalidades en el número bajo de copias	Estabilidad microsatelital, alta frecuencia de mutaciones de <i>CTNNB</i> .
Anormalidades en el número alto de copias	Mutación <i>TP53</i> .

IMS: inestabilidad microsatelital.

Diagnóstico y estadificación del cáncer epitelial de endometrio

En el 75% de los casos, las pacientes con CEE se presentan con sangrado uterino anormal, flujo o dolor pélvico. En casos avanzados, puede haber rectorragia y hematuria. En una etapa metastásica hay pérdida de peso, anorexia, lumbalgia, ascitis, tos y disnea.^{20,21} Dentro de la evaluación, el ultrasonido nos permite discriminar a las pacientes que son sujetas a la realización de biopsia endometrial; la cual se recomienda si el grosor endometrial es de ≥ 8 mm en pre menopáusicas, y ≥ 4 mm en postmenopáusicas.²² La biopsia endometrial nos dará un diagnóstico inicial; sin embargo, se correlaciona mal con el grado y profundidad definitivos.²³ Los estudios de imagen como la tomografía o resonancia magnética sirve para evaluar la sospecha sobre la extensión extrauterina, cervical, ganglionar, ascitis, enfermedad metastásica en hígado y pulmón.^{24,25}

Una vez realizado el diagnóstico, se requiere estadificar para conocerla extensión de CEE. Se utiliza el sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) 2009 (Tabla 4).¹⁶ La estadificación es quirúrgica, ya que se ha demostrado una infraestadificación clínica en 15-20% de los casos.¹⁶ La etapa I se refiere a la afección exclusiva del cuerpo uterino. La invasión glandular exclusiva del cérvix sigue siendo etapa I, se requiere afección estromal para considerarse etapa II.²⁶⁻²⁸ En caso de que la enfermedad se extienda a órganos pélvicos o ganglios linfáticos, se asigna una etapa III. Metástasis a mucosas de vejiga o recto o metástasis a distancia es etapa IV.

Tabla 4. Estadificación del cáncer de endometrio según la AJCC 8,ed. 2018 y la FIGO 2009.²⁹

FIGO	AJCC	Características
----	TX	Tumor primario no evaluable
----	T0	Sin evidencia de tumor primario
----	Tis	Carcinoma in situ (para la AJCC es EC 0)
IA	T1a	Invade < 50% del miometrio
IB	T1b	Invade ≥ 50% del miometrio
II	T2	Invasión del estroma cervical
IIIA	T3a	Invasión de serosa y/ó anexos por extensión directa o metástasis
IIIB	T3b	Invasión de vagina o parametrios por extensión directa o metástasis
IIIC1	N1	Afección de ganglios pélvicos
IIIC2	N2	Afección de ganglios para-aórticos.
IVa	T4	Afección de mucosa de vejiga o recto
IVb	M1	Afección de órganos distantes
----	NX	GL no evaluables
----	N0	Sin evidencia de metástasis a GL regionales
----	M0	Sin evidencia de metástasis a distancia

Tratamiento del cáncer epitelial de endometrio

El abordaje terapéutico inicial consiste en establecer si la paciente es operable o no. En el primer caso, se debe realizar la estadificación quirúrgica (histerectomía, salpingooforectomía bilateral, linfadenectomía pélvica y para-aórtica), y posteriormente establecer los factores de riesgo de recurrencia para el tratamiento adyuvante en base a la estadificación, a la histología, y a los factores de pronósticos.^{5,30} En pacientes con sospecha de etapa I operables se debe realizar una cirugía estadificadora de endometrio.⁵ Si se sospecha de afección cervical (Etapa II), se debe realizar la cirugía estadificadora incluyendo histerectomía radical³. En el caso de que se sospeche de etapas I y II y que no sea operable por la edad y las morbilidades, se recomienda dar radioterapia dirigida al tumor y considerar resección quirúrgica posteriormente.³¹⁻³³ El tratamiento adyuvante en estas etapas es controversial. Se han realizado 4 estudios prospectivos aleatorizados y controlados que no demostraron un beneficio en la supervivencia global con la adyuvancia con radioterapia. Sin embargo, sí se demostró un mejor periodo libre de enfermedad. En pacientes con etapas IA de bajo riesgo se pueden dejar en observación posterior a la histerectomía. En general se recomienda la braquiterapia en pacientes con etapa I que tengan factores de alto riesgo como grado 3, permeación linfovascular, tamaño del tumor mayor de 2 cm, involucro glandular del cérvix o pacientes mayores de 70 años.⁵

El tratamiento con quimioterapia es estándar en etapas avanzadas y con los subtipos histológicos de mal pronóstico. La quimioterapia en etapas III y IV totalmente reseca los incrementa la supervivencia global y libre de recurrencias.^{5,34} En enfermedad diseminada la quimioterapia tiene respuestas mayores a 40%.³⁵

Los quimioagentes más efectivos son el cisplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel; siendo de preferencia regímenes con multiagentes.^{35,36}

En enfermedad metastásica inicial o como recurrencia se debe considerar resección total del tumor o radioterapia, presentando supervivencias a 5 años de 50%-70%.³⁷⁻³⁹ En el caso de metástasis diseminadas la mejor opción es la quimioterapia considerando la cirugía paliativa.⁴⁰ En histologías de bajo grado o asintomáticas se puede dar hormonoterapia en caso de pacientes con receptores de estrógeno y progesterona positivos.⁴¹ En pacientes sintomáticas, con tumores grado 2,3 o voluminosas se puede ofrecer quimioterapia y radioterapia paliativa.^{42,43}

Factores pronósticos del cáncer epitelial de endometrio

Los factores pronósticos el CEE sirven para evaluar la necesidad de adyuvancia y establecer las supervivencias. Existen varios factores pronósticos independientes descritos, entre los que se encuentran el subtipo histológico, el grado, el tamaño tumoral, la profundidad de invasión, invasión cervical, la presencia de permeación linfovascular, la afección ganglionar entre otros.⁶ El Ca 125 (>35ng/dl) puede correlacionar con recurrencias y supervivencia.¹⁶ La enfermedad residual se asocia a un pobre pronóstico.^{5,15,40} La mayoría de las recurrencias (87%) ocurren en los tres primeros años.⁴⁴ Las recurrencias a 5 años en EC I y II ocurren en el 15%⁹⁰, y en EC III y IV en 40-50%. En general la supervivencia global a 5 años en histologías endometrioides es de 83%, en células claras 62% y en carcinoma seroso papilar 53%.⁴⁷ La distribución y supervivencia por afección se muestra en Tabla 5.^{12,27}

Tabla 5. Distribución por etapas de cáncer de endometrio y supervivencia a 5 años.

Etapa	Distribución	Supervivencia a 5 años
Enfermedad local	68%	96%
Enfermedad regional	20%	67%
Enfermedad a distancia	8%	16%

Entre los factores pronósticos que se han evaluado está el grado histológico. Así mismo se asocia con la etapa, la afección ganglionar y la profundidad de invasión. Se ha visto que la supervivencia a 5 años es de 94% en pacientes con tumores grado 1, 84% en tumores grado 2 y 72% en grado 3.⁴⁵ La afección miometrial es otro predictor independiente de supervivencia. En un estudio con más de 400 pacientes con pacientes tipo endometrioides describió una supervivencia global a 5 años de 94% cuando había afección superficial, 91% cuando era afección al tercio interno del miometrio, 84% al tercio medio del miometrio y

59% cuando afectaba hasta el tercio externo del miometrio.⁴⁵ La permeación linfovascular también se ha asociado a un pobre pronóstico, encontrando una mayor cantidad de recurrencias cuando está presente (39% versus 19%).⁴⁶ Otro hallazgo patológico asociado a peor pronóstico es la afección cervical, siendo reportado una supervivencia global de 92.1% y una supervivencia libre de enfermedad de 89.9%.⁴⁷

Otros factores asociados al pronóstico son la afección anexial y la presencia de citología peritoneal positiva con células malignas. Entre los factores más importantes están la presencia de metástasis a ganglios linfáticos ya que representa un sitio común de enfermedad extrauterina. Se ha reportado una disminución de la supervivencia a 5 años de 80-91% para las etapas I y II hasta 44-52% cuando hay afección ganglionar.⁴⁸

Según el meta-análisis de Travaglino, el tipo molecular también influye en el pronóstico. Y esto se ve modificado aún más si se combina con el subtipo histológico. En su revisión sistemática, se incluyeron seis estudios con 2,818 pacientes. En el subgrupo de mutación de *p53*, los hazard ratio (HR) asociados a la supervivencia global fueron de 4.3 para todas las histologías, 2.5 para las histologías endometrioides y 4.93 para las histologías no endometrioides. En el subgrupo inestabilidad microsatelital, los HR fueron 1.965 para todas las histologías, 1.28 para los endometrioides y 6.36 para las histologías no endometrioides. En el subgrupo *POLE* mutado, los HR fueron 0.763 para todas las histologías, 0.481 para los endometrioides y 2.63 para los no endometrioides. Los resultados de los análisis adicionales fueron consistentes para todos los subgrupos, excepto para los carcinomas *POLE* mutados no endometrioides. Travaglino concluyó que el subtipo histológico del CEE muestra un valor pronóstico crucial independientemente del subgrupo molecular, con carcinomas no endometrioides que tienen un peor pronóstico en cada subgrupo.⁴⁹

El subtipo histológico se considera uno de los principales factores independientes asociados a la supervivencia de las pacientes con CEE. Si lo dividimos según la clasificación de Bokhman, el tipo I es caracterizado por ser tumores bien diferenciados y que presentan enfermedad localizada.

Generalmente tienen un pronóstico favorable y se diagnostica en etapa I con una supervivencia a 5 años de 86%. En contraste con el tipo II, que se caracteriza de un tumor más agresivo, de tipo no endometrioides, poco diferenciado, que se diagnostica en etapas avanzadas y con una pobre supervivencia. Además, hay que destacar que entre las histologías de mal pronóstico puede haber diferencias en el pronóstico. En un estudio realizado con 163 pacientes con CEE se encontró una supervivencia libre de progresión a 2 años fue peor para el subtipo carcinosarcoma (79.4%), seguida de los casos células claras (87.2%), carcinoma endometrioides grado 3 (92.2%) y carcinoma seroso papilar (95.5%), encontrando una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.015$). En cuanto a la supervivencia global a 2 años se encontró menor en los casos de células claras (70.0%), seguida de carcinosarcoma (76.7%), carcinoma serosos papilar (86.7%) y el tipo endometrioides grado 3 (87.9%); sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.071$).⁵⁰

Las pacientes con carcinoma seroso papilar tienen una supervivencia global a los 5 años muy pobre de solo 18–27%. La mayoría de los carcinomas serosos papilares (69–87%) se diagnostican fuera del útero en el momento de la presentación e incluso en casos aparentemente confinados al útero, 31 a 80% de las pacientes desarrollan enfermedad recurrente. Muchos investigadores han demostrado que la supervivencia es de 35 a 50% para pacientes en estadio clínico o patológico I y II y de 0 a 15% para estadio III y IV.⁵¹

En cuanto a la histología de células claras, se ha descrito que su pronóstico es peor que en el tipo endometriode, pero mejor que las que tienen carcinoma seroso papilar. Abeler et al. revisaron 97 pacientes con carcinoma de células claras e informaron una supervivencia global a 5 años para todas las etapas es de 42%, en comparación con el 27% para el carcinoma seroso papilar uterino; con 59% de supervivencia para la enfermedad en etapa I y el 27% con la etapa II. La infiltración miometrial y la permeación linfovascular fueron factores pronósticos más importantes. En particular, el 90% de los pacientes sin invasión miometrial tuvieron una supervivencia a 5 años.⁵² Así mismo, en una revisión de 29 casos de células claras y 47 carcinomas serosos papilares en etapas tempranas reportaron una supervivencia a 5 años para el carcinoma de células claras en estadio I del 73% y para el carcinoma seroso papilar del 44%. La supervivencia a 5 años fue del 59% para pacientes con el subtipo de células claras en estadio II y del 32% para aquellos con carcinoma seroso papilar.⁵³ Por último, Creasman et al. revisó los datos del informe anual de FIGO y encontró una supervivencia a 5 años del 81% para el carcinoma de células claras en estadio I quirúrgicamente estadificado en comparación con el 72% para el carcinoma seroso papilar y el 76% para los cánceres endometrioides de grado 3.⁵⁴

Por último, los carcinosarcomas son tumores agresivos y de mal pronóstico, similar al de los leiomiomas, con una supervivencia global a 5 años para todas las etapas de aproximadamente el 35%.⁵⁵ Los carcinosarcomas generalmente son diagnosticados en mujeres mayores de 65 años y generalmente, al igual que los carcinomas de células claras, se presentan en etapas avanzadas.

A pesar de que las causas exactas de la carcinogénesis endometrial permanecen inciertas, diversas mutaciones, modificaciones epigenéticas y alteraciones post-transcripción han sido descritas en líneas celulares de CEE. Dada la relación entre la etapa de presentación, la respuesta al tratamiento y la supervivencia de las pacientes con CEE, es necesario encontrar biomarcadores que describa el curso clínico de la enfermedad y detectar de forma temprana a aquellas pacientes con un fenotipo tumoral más agresivo, como es el caso de los miRNAs.

MicroRNAs

Definición de miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de pequeños ácidos ribonucleicos (RNAs) no codificantes que se encuentran en los seres vivos y que regulan la expresión de genes en el RNA mensajero. Se han identificado miles de miRNAs en nematodos, insectos, pájaros,

anfibios, peces, plantas y mamíferos.⁵⁶ Su función se ha visto como reguladores importantes en la expresión de una gran gama de procesos fisiológicos y patológicos. En la actualidad se sabe que el papel específico de los miRNAs incluye la regulación de la proliferación celular y su metabolismo, la regulación del tiempo de desarrollo, la muerte celular, hematopoyesis, desarrollo neuronal, tumorigénesis, metilación del DNA y modificaciones en la cromatina.⁵⁷ Se ha visto que un miRNA individual puede ser capaz de regular docenas de distintos miRNAs, mientras que múltiples miRNAs pueden corregular un gen individual.⁵⁸

En 1993, Ambros y colegas descubrieron que *lin-4*, un gen que se conoce que controla el tiempo de desarrollo de la larva *C. elegans*, no codificaba para alguna proteína pero que en su lugar producía un par de pequeños RNAs, y que éstos tenían un complemento en múltiples sitios de 3' UTR del gen *lin-4*, controlando su tasa de expresión.⁵⁹ Actualmente se sabe que este RNA *lin-4* pertenece a la familia de una clase abundante de pequeños RNAs reguladores llamados miRNAs. Los miRNAs son cadenas solitarias de RNA constituidas de 21-23 nucleótidos.^{59,60} Se consideran como pequeños miRNAs no codificantes que pueden inhibir la expresión de genes a través de represión transcripcional o degradación del miRNA. Estos están presentes en animales, plantas y células eucariotas.⁶⁰ El principio se creía que el genoma humano estaba formado por 250 miRNAs. Sin embargo, actualmente se cree que hay más de 2,675 miRNAs encontrados en la regulación genómica del ser humano, constituyendo apenas entre el 1 al 3% del genoma.⁶¹

El descubrimiento de los miRNAs resultó en un cambio en el entendimiento de la regulación génica ya que regulan la expresión de miles de genes relacionados con procesos funcionales como desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis. Y algún cambio en su expresión pueden originar patologías como el cáncer.

Nomenclatura de los miRNAs

La nomenclatura de los miRNAs ha evolucionado con el transcurso del tiempo para evitar confusión (Tabla 6). La mayoría de los miRNAs son nombrados usando un prefijo de la especie y se le designa un número específico de miRNA. Sin embargo, no es indispensable el uso del prefijo. Los prefijos también pueden ser agregados para especificar si se trata de un miRNA maduro o bien un transcrito como pre-miRNA o pri-miRNA. La letra "R" mayúscula también puede ser usado para designar un miRNA maduro. Los sufijos son agregados para designar si el miRNA maduro proviene del brazo 3' o 5' del pre-miRNA.

Los miRNAs que pertenecen a una misma familia porque comparten alguna secuencia, pueden tener una letra minúscula seguido del nombre. En algunos casos, miRNAs con secuencia idéntica pueden estar transcritos de distintos loci en el genoma, en estos casos se agrega un sufijo numérico separado del miRNA por un guion para identificarlos de diferente origen. El "*" (star) que indica 2 miRNAs maduros que son de especies menores y que son producidos de los brazos 3' o 5' de un pre-miRNA duplicado, son funcionalmente iguales y presentes en concentraciones similares en las células, por lo que no se debe usar y se prefiere

usar los sufijos -3p y -5p. Por último, se puede usar el prefijo “iso” para designar una isoforma de algún miRNA específico.⁶¹

Tabla 6. Nomenclatura de los microRNAs.

Nomenclatura	Significado	Ejemplo
Prefijo de 3 letras	Identificación de la especie. En ocasiones no se usa.	hsa (humano) dme (mosca de la fruta)
Pre-mir o pre-mir (por no se maduró la letra “r” en minúscula.	Indica el transcrito del miRNA (pri-miRNA) o su precursor después del procesamiento Drosha	pri-miRNA-16 pre-miRNA-16
miR	miRNA madura	hsa-miRNA-16
-3p o -5p	miRNA maduro originado de 3’ o 5’ del pre-miRNA	hsa-miRNA-16-3p hsa-miRNA-16-5p
a o b	miRNAs que están relacionados por su secuencia y origen evolutivo	hsa-miRNA-16a-3p hsa-miRNA-16b-5p
-1 o -2	miRNAs maduros idénticos en su secuencia, pero tienen diferente origen.	hsa-miRNA-16-1 hsa-miRNA-16-2
miR* (star)	miRNA degradada. Ya no es aceptada	hsa-miRNA-9*
iso	Para designar una isoforma No es aceptada	hsa-isomiRNA-16-1-3p

Biogénesis de los miRNAs (Figura 1)

Vía canónica

Las secuencias de los miRNAs pueden estar localizados en los intrones y exones de los RNA no codificantes, pero la mayoría son localizados en los intrones (mirtron) (ver más adelante). La mayoría de los genes de los miRNAs son transcritos por Pol II como un RNA largo llamado pri-miRNA que contiene un bucle estructural. Todos los miRNAs canónicos tienen una 5’-cap. En el núcleo de la célula, el pri-miRNA se autoensambla en una estructura de tipo tallo de doble cadena-asa de 70 nucleótidos aproximadamente llamada pre-miRNA.

Este proceso es realizado por la enzima Drosha y la proteína Región Crítica del Gen 8 del Síndrome Di George (por sus siglas en inglés DGCRG8). Drosha es una enzima de tipo RNAasa III, que es una endoribonucleasa específica para separar la doble cadena de RNA. DGCRG8 es una proteína acopladora a la doble cadena de RNA que funciona como una unidad no catalítica en el complejo. El pre-miRNA es exportado al citoplasma por XPO5 y la proteína nuclear RAN (RAN por sus siglas en inglés), una proteína acopladora de tipo GTP. En el citoplasma, el pre-miRNA es seccionado cerca del asa para formar un dsRNAs pequeña

por 2 o 3 nucleótidos en el final 3'. Esta separación es mediada por la proteína Dicer, una enzima de tipo RNasa III que se asocia a la proteína acopladora, y de la proteína RNA TAR (TRBP), una proteína acopladora a la doble cadena de RNA.⁶²

El papel central del silenciamiento del RNA mensajero es realizado por la familia de las proteínas de tipo argonauta (AGO). La pequeña doble cadena de miRNA es identificada por las proteínas AGO con la ayuda de proteínas chaperonas dependientes de ATP. Después de regresar el AGO a su conformación original, la hebra pasajera del miRNA doble se expulsa y se produce una sola cadena de miRNA maduro la cual se une a un complejo ribonucleoproteína por medio de AGO llamada Complejo de Silenciamiento (RISC) la cual identificará el blanco en el RNA mensajero. El miRNA maduro es guiado hacia sus pares de base blanco.⁶³ En las plantas y algunas veces en los animales el acoplamiento de miRNA a su RNA mensajero blanco es totalmente complementario. En contraste, en los humanos, el acoplamiento no es totalmente complementario. El trinucleótido repetido contenedor 6 (TNRC6 por sus siglas en inglés) es una proteína adaptadora que recluta a AGO e interactúa con la proteína PABPC (Acolpladora- poly(A)) en el final 5' del RNA mensajero.

La cola poly(A) del RNA mensajero es acortada por deadenilasas causando una inestabilidad en el RNA mensajero por decapitación y actividad exonucleasa 5' → 3'. TNRC6 también produce una disminución en la eficiencia de la traducción, mediado por CCR4-NOT y el reclutamiento e DEAD-box helicasa 6 (DDX6) inhibiendo su traducción.⁵⁹

Vía no canónica

Recientemente se han descrito otras vías alternativas en la biosíntesis de los miRNA. Estos miRNAs son estructural y funcionalmente similares a los producidos por las vías canónicas, pero se saltan alguno de los pasos. La ausencia de Drosha y DGCRB pueden ser vías alternativas. Así mismo, algunos intrones de una sola cadena (mitrones) pueden actuar como pre-miRNAs. En la vía de los mirtrones, los intrones son procesados a través del spliceosoma.⁶¹

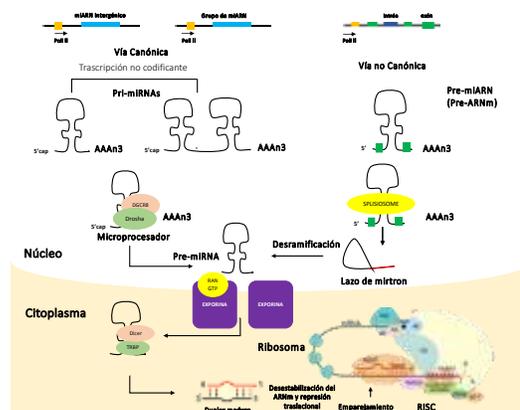


Figura 1. Vía canónica y no canónicas en la biogénesis de los miRNAs.⁶¹

Isoformas

Un solo gen de miRNA puede generar múltiples isoformas de miRNA (isomiRs) por varios mecanismos (Figura 2). La inconsistencia en la elección de acoplamiento de la cadena contenida en AGO puede generar dos miRNA funcionales diferentes de ambas cadenas del dúplex pre-miRNA. La sección imprecisa del miRNA primario por Drosha o el miRNA previo por Dicer puede generar extremos heterogéneos de 5' o 3'. La edición de RNA, el proceso por el cual el RNA se modifica enzimáticamente en nucleósidos específicos, es otra forma de generar isomiRs. En raras ocasiones, los isomiR se generan de la conversión de adenosina a inosina (A a I). Estas ediciones pueden afectar la orientación, especialmente cuando alteran un nucleótido semilla.

Los isomiR podrían generarse agregando nucleótidos no modulados al extremo de miRNA 3' mediante la nucleótido-transferasa terminal o eliminando los nucleótidos del extremo de miRNA 3' mediante actividades de exonucleasa 3'. Cabe señalar que no se espera que las modificaciones en 3' influyan sustancialmente en el reconocimiento del blanco porque no afecta la secuencia de semillas de los miRNA. IsomiR Bank es la primera base de datos en línea integradora que anotó isomiRs.⁶⁴

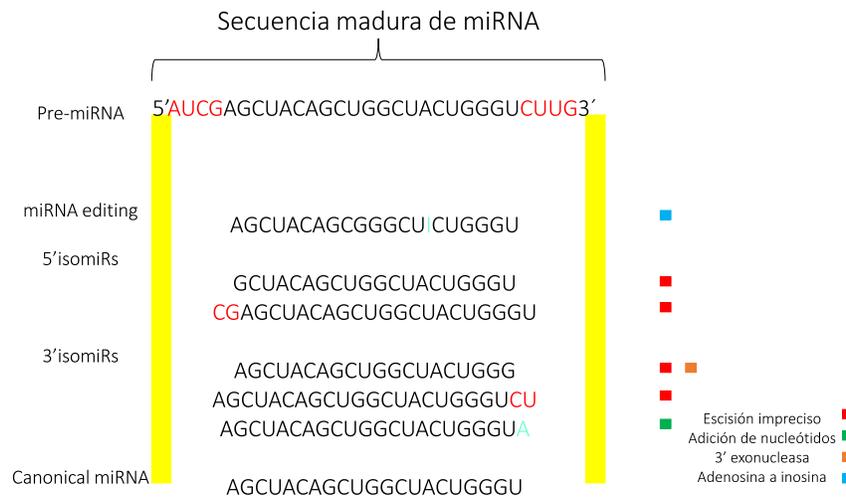


Figura 2. Distintas vías para formar isoformas de miRNAs.⁶¹

Organización genómica

Los genes de los miRNAs están integrados en todos los cromosomas con excepción del cromosoma Y. Estos se pueden clasificar en intergénicos e intragénicos, y estos últimos en intrónicos o exónicos (Figura 3).⁶⁵

Los miRNAs intergénicos son los que se encuentran en regiones genómicas distintas a las unidades transcricionales funcionales. Son monostrónicos o policistrónicos y tienen sus

propios promotores y elementos reguladores. Son transcritos por RNA Polimerasa II y tienen una zona de inicio de transcripción bien delimitada y una señal Poli (A).

Los miRNAs intragénicos se dividen en intrónicos y exónicos. Los intrónicos se encuentran en los intrones de los genes, tanto en la secuencia codificante como en la no codificante de una proteína. Así mismo, pueden estar presentes en la zona intrónica como un solo gen para miRNA o bien, en cluster de genes para varios miRNAs.

Pueden ser transcritos del mismo promotor y procesados a partir de los intrones del gen portador teniendo perfiles de expresión similares a los del gen portador. También, todo el intrón de un gen codificante para una proteína puede actuar con la secuencia exacta del pre-miRNA con sitios desplicing a cada lado. A estos intrones se les llama mirtrones y no comparten la vía canónica para su formación. Por último, los miRNAs exónicos son mucho más raros que cualquiera de los tipos anteriores y a menudo se solapan entre un exón y un intrón de un gen no codificante. Estos miRNAs también se cree que son transcritos por el promotor de su gen portador y su maduración a menudo excluye la función del gen portador.⁶⁵

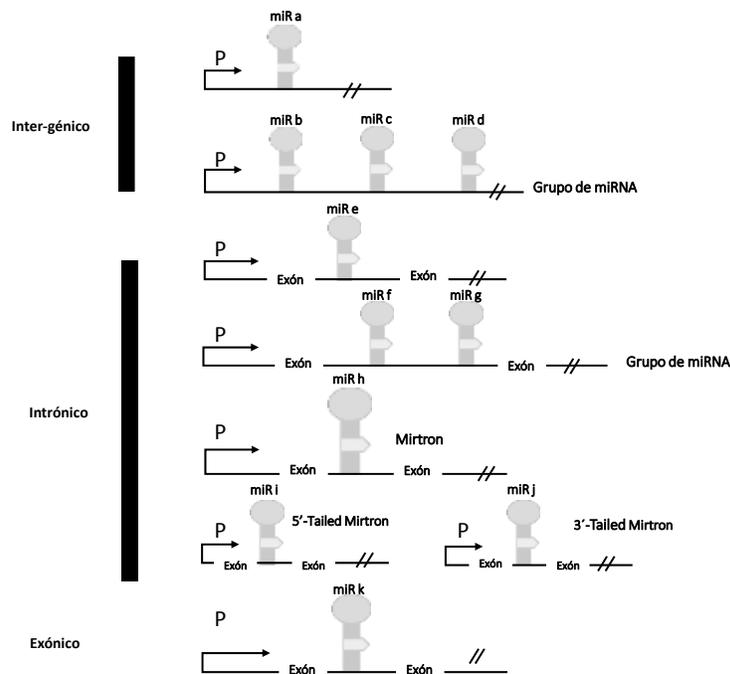


Figura 3. Organización genómica de los miRNAs. A) Un miRNA intergénico está bajo el control de su propio promotor, ya sea como un solo gen (miR a) o como un cluster (miR b-d). B) Un miRNA intrónico está presente en la región intrónica de una unidad de transcripción funcional y está bajo el control de un promotor de codificación de proteínas como un miRNA intrónico único (miR e) o un cluster de miRNA (miR f, miR g) o como un mirtrón (miR h)

en el que el intrón actúa como un miRNA, y por lo tanto, no es necesario un paso de microprocesamiento en este caso. Los mirtrones que tienen una extensión de secuencia en el extremo 5' se llaman mirtrones de cola 5 (5-tailed mirtrons) (miR i), mientras que los mirtrones con extensión de secuencia en el extremo 3' se denominan mirtrones de cola 3 (3-tailed mirtrons) (miR j). C) Los miRNAs exónicos (miR K) son raros (la flecha indica el promotor P, los miRNAs están representados en su conformación de horquilla, las cajas rectangulares [Exon] indican exones que codifican para proteínas).⁶⁵

Regulación

A nivel transcripcional, la expresión de los miRNAs puede depender de sus genes huésped (miRNAs intragénicos) o independientemente de ellos (miRNAs intergénicos). Los miRNAs intergénicos tienen sus propios promotores, por lo que pueden ser expresados de forma independiente y pueden estar regulados por factores de transcripción separados. Tanto con los miRNAs intragénicos como los intergénicos, la expresión de los miRNAs puede cambiar debido a mutaciones o pueden ser regulados por metilación del promotor. Las características de los promotores de los miRNA son similares a los promotores de los genes codificantes de proteínas y se sabe que la transcripción de los miRNAs se regula mediante factores de transcripción similares a los de genes codificantes de proteínas.⁶⁶

A nivel postranscripcional, la expresión puede ser regulada por cambios en la actividad de los enzimas clave para la biogénesis, como Dicer y Drosha. La actividad de estas enzimas puede también verse afectada por mutaciones o modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA y la modificación de las histonas relacionado con la acetilación aberrante de las mismas.⁶⁷ Además de la regulación a nivel transcripcional, la regulación postranscripcional que incluye los pasos involucrados en la biogénesis y la maduración de miARNs son también formas de control de los miRNAs. Estos incluyen el procesamiento de pri-miRNA a pre-miRNA por la enzima RNasa III, Drosha, el transporte del complejo del miRNA desde el núcleo hasta el citosol y la conversión del pre-miRNA a miRNA maduro por la acción del complejo de proteínas asociado a Dicer.⁶⁸

Métodos de obtención de expresión miRNAs

Se han utilizado múltiples métodos para la obtención y cuantificación de los miRNAs, cada uno con sus ventajas y desventajas (Tabla 7). El método ideal es aquel que es fácil de utilizar, que es reproducible y que no requiere equipamiento costoso, y sobre todo que sea específico para la obtención de únicamente el miRNA de interés, sin que haya interferencia en la detección con otros miRNA similares. El método debe ser lo suficientemente sensible para proveer el análisis de la expresión cuantitativa, a pesar de que se tenga una pequeña cantidad de muestras y que debe ser capaz de procesar múltiples muestras en paralelo.⁶⁹

El estándar de oro para la detección de miRNAs utilizado en laboratorios clínicos es la reacción en cadena con polimerasa-trascriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR).⁷⁰ Otro método utilizado son los microarreglos, los cuales se pueden utilizar para el descubrimiento

de nuevos biomarcadores, sin embargo, es más costoso.⁷¹ La hibridación *in situ* puede ser utilizado para la detección de un miRNA de interés entre diferentes tipos de células que componen dicho tumor, y provee información adicional, tal como la localización subcelular del miRNA.⁷² Por último, la secuenciación masiva de RNA es un nuevo método para el descubrimiento de nuevos miRNA y su cuantificación. Sin embargo, implica un alto costo y su uso no es el ideal para propósitos diagnósticos, sino para descubrimiento de nuevo s miRNAs y sus isoformas.⁷³

Tabla 7. Métodos utilizados para la cuantificación de miRNAs.⁷⁴

	Ventajas	Limitaciones
qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de producción elevada • Buena cuantificación • Amplificación permite mayor sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para distinguir diferencias en un solo nucleótido • No para descubrimiento de ncRNA.
Microarreglos	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de producción muy elevada • Buena relación entre costo y generación de información • Fácil para realización de análisis de datos • Los resultados han sido validados con qRT-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede fallar la especificidad • Sensibilidad media • La sensibilidad y la especificidad puede ser mejorada con modificación de los ácidos nucleicos cerrados en las sondas • Cuantificación limitada • No útil para el descubrimiento de ncRNA
Hibridación <i>in situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Localiza los miRNA en tejido y compartimientos celulares • Se utiliza la misma laminilla para la obtención del miRNA y del blanco de identificación 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja capacidad de producción • Sensibilidad limitada • Cuantificación muy limitada
Secuenciación de RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de producción elevada • Alta sensibilidad • Alta especificidad • Se puede usar para descubrir nuevos ncRNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Una alta cantidad de datos complejos que necesitan ser analizados • Alto costo

Abreviaturas. miRNA: microRNA, qRT-PCR: reacción en cadena de polimerasa-trascriptasa reversa cuantitativa, ncRNA: RNA no codificable.

Función de los miRNAs

Se han identificado miles de miRNAs en nematodos, insectos, pájaros, anfibios, peces, plantas y mamíferos.⁵⁶ Su función se ha visto como reguladores importantes en la expresión de una gran gama de procesos fisiológicos y patológicos. En la actualidad se sabe que el papel específico de los miRNAs incluye la regulación de la proliferación celular y su metabolismo, la regulación del tiempo de desarrollo, la muerte celular, hematopoyesis, desarrollo neuronal, tumorigénesis, metilación del DNA y modificaciones en la cromatina.⁵⁷ Se ha visto que un miRNA individual puede ser capaz de regular docenas de distintos miRNAs, mientras que múltiples miRNAs pueden regular un gen individual.⁵⁸

miRNAs y cáncer

La regulación de los genes que codifican a los miRNAs es de gran importancia porque se puede conocer sobre el desarrollo de cualquier tipo de procesos fisiopatológicos como es el caso de la supervivencia de las células B, el patrón cerebral, la secreción de insulina por las células pancreáticas, el desarrollo de adipocitos, el control de la proliferación celular y la supervivencia de la célula.⁶² En el humano se han identificado muchas enfermedades en donde hay alteraciones con los miRNAs, tales como enfermedades autoinmunes, enfermedades cardíacas, esquizofrenia y el cáncer. Se ha visto que los miRNAs son expresados diferencialmente entre los distintos tipos de tumores y tejidos normales, incluidos los tumores benignos y malignos, tal como es el caso de las leucemias, los linfomas, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, carcinoma papilar de tiroides, glioblastomas y otros tumores cerebrales, el carcinoma hepatocelular, tumores pancreáticos, cáncer de próstata, riñón y vejiga, cáncer de ovario y el cáncer de cérvix.⁷⁴

Los miRNAs pueden funcionar como oncogenes y/o como genes supresores de tumores (Figura 4). Como oncogenes se ha visto que el miR-21 y el miR-155 están frecuentemente sobrepresados en tumores malignos humanos.⁷⁵ Así mismo, los miRNAs también pueden actuar como supresores de tumor, como es el caso del grupo de los miR-15a/16-1, que frecuentemente se detecta en leucemias linfocíticas crónicas y en cáncer de próstata.^{76,77} En otras ocasiones, el mismo miRNA puede tener actividad dual, actuando como oncogén en un tipo específico de células y como supresor de tumor en otras.⁷⁸ Sin embargo, las bases genéticas para la expresión anormal de los miRNAs en las células neoplásicas es complejo. Se ha visto una gran variedad de interrupciones relacionadas con la expresión de miRNA en células malignas y se cree que hay una gran variedad de anormalidades que pueden influir en la regulación de los miRNAs en cada tumor; estas expresiones ocasionan niveles anormales de miRNAs maduros o de sus precursores en comparación con el tejido sano o incluso dependiendo de las distintas etapas o grados de invasión.⁷⁹ También, se ha visto que más el 50% de los genes de los miRNAs están localizados en los dominios de los cromosomas que genéticamente están alterados en el cáncer del ser humano.⁸⁰

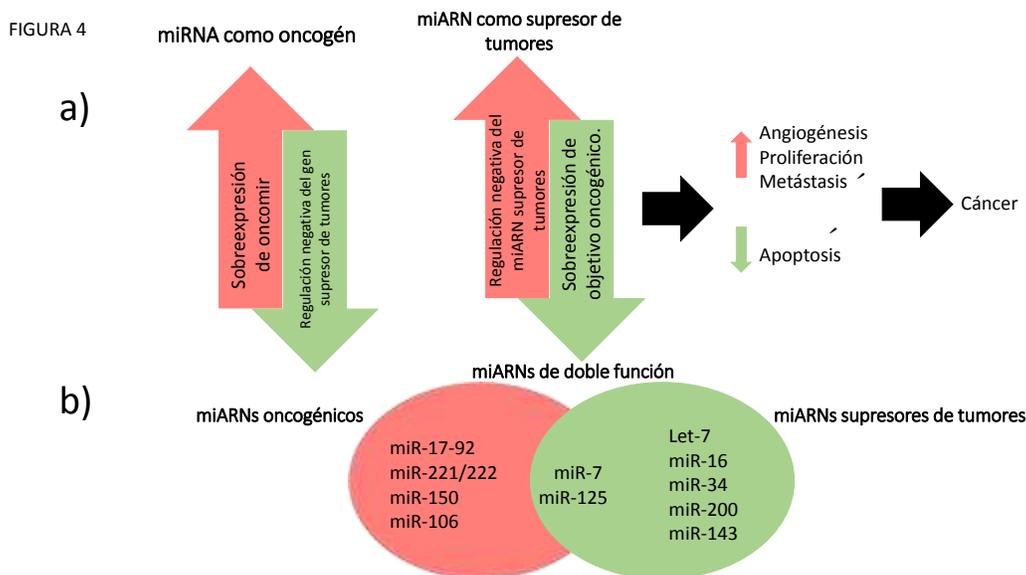


Figura 4. Función de los oncomir y los miRNAs supresores de tumor.

miRNAs en cáncer epitelial de endometrio

Varios estudios han obtenido perfiles de expresión de miRNAs en cáncer de endometrio, usando tejido tumoral o con muestras de fluidos, con el objetivo de identificar biomarcadores. Por ejemplo, de un total de 46 muestras séricas de pacientes con CEE y 28 pacientes sin historia de cáncer, se identificó un perfil de expresión usando PCR, encontrando los miRNAs miRNA-186, miRNA-222 y miRNA-223 elevados.⁸¹ Solamente el miRNA-204 se expresó a la baja en pacientes con CEE. Así mismo, otro grupo identificó 47 miRNAs expresados diferencialmente en pacientes con CEE en comparación con sujetos sanos.⁸² De estos, veintiséis miRNAs estaban regulados a la baja y 21 regulados a la alza. Ocho miRNAs fueron seleccionados y su expresión examinada en 58 pacientes en etapa I; el miRNA-141, miRNA-200 y el miRNA-205 estuvieron sobreexpresados, mientras que los miRNA-143 y miRNA-145 estaban subexpresados.

Para la identificación de las firmas de miRNAs para adenocarcinoma de endometrio, un estudio identificó 112 nuevos miRNAs específicos para adenocarcinoma de endometrio, de los cuales, el miRNA-182 y miRNA-183 estuvieron altamente expresados.⁸³ En diez pares de pacientes con CEE y pacientes sanos, la firma de expresión de miRNAs reveló 17 miRNAs sobreexpresados, y niveles disminuidos en 6 miRNAs.⁸² De muestras de tejido y plasma de 7 pacientes con CEE y 45 controles sanos, se realizó la expresión de 866 miRNAs. El estudio reveló un patrón distinto en expresión del 21 miRNAs en los especímenes con CEE.

El patrón de expresión se vio asociado a la etapa según la FIGO, el grado, la recurrencia y la afección ganglionar. Así mismo, al comparar cada uno de los miRNAs, los obtenidos del tejido tumoral y de plasma pudieron ser clasificados según el tipo de cáncer endometrial de forma muy precisa. Los miRNAs miRNA92a/miRNA-205/miRNA-401 y miRNA-

92^a/miRNA-410 fueron propuestos para una forma en tejido tumoral, y miRNA-9/miRNA-1228 y miRNA-9/miRNA-92 fueron identificados en las muestras de plasma de pacientes con CEE. ⁸⁴ Similar a este estudio, otro reportó que los subtipos de CEE tenían un patrón distinto de miRNAs. ⁸⁵ Una firma específica de miRNAs pudo identificarse diferente del tejido normal, y hubo una diferencia entre los tumores tipo I y tipo II. Trabajando en una línea similar, el perfil de miRNAs grado 1-2 de CEE sugiere miRNAs específicos que pueden ser una herramienta eficiente que puede ayudar eficientemente para la toma de decisiones en la cirugía estadificadora en etapas tempranas. Los miRNAs asociados a afección ganglionar fueron los que tuvieron una expresión a la baja y fueron miRNA-375, miRNA-184, miRNA-34c-5p, miRNA-34c-3p y miRNA-34b-5p. Las pacientes con altos niveles de miRNA-375 o una disminución de la expresión de miRNA-184 fueron asociados también a una mayor afección ganglionar. ⁸⁶ Todos estos estudios sugieren que los miRNAs se pueden desregular en el CEE y que impactan en el desarrollo y progresión de esta neoplasia, por lo que pueden ser utilizados efectivamente en el manejo clínico de estas pacientes.

MiRNAs como blancos terapéuticos en cáncer epitelial de endometrio

Como se mencionó previamente, una alteración en la expresión de miRNAs puede ser observada en el CEE. Entre estos se encuentra el miRNA-7, el cual se puede regular a la baja usando nucleótidos complementarios anti-miRNA, reprimiendo la invasión o migración de células malignas (Figura 5). ⁸⁷ Otro ejemplo es con el miRNA-194, el cual está disminuido en pacientes con CEE y su baja expresión se asocia a etapas más avanzadas y peor supervivencia. Se ha descrito que la sobreexpresión de miRNA-194 por medio de trasfección con moléculas de pre-mirna inhiben la invasión por células malignas de CEE teniendo como blanco el ongen BMI-1. ⁸⁸ También se ha visto que el miRNA-130b es responsable entre otros de la función del p53 y se encuentra disminuido en el CEE, por lo que puede ser un otra forma de transferir miRNAs para cumplir con la función adecuada de p53. La ventaja es que los miRNAs son estables en varios fluidos y tejidos y que sus propiedades pueden facilitar su liberación. ⁸⁹

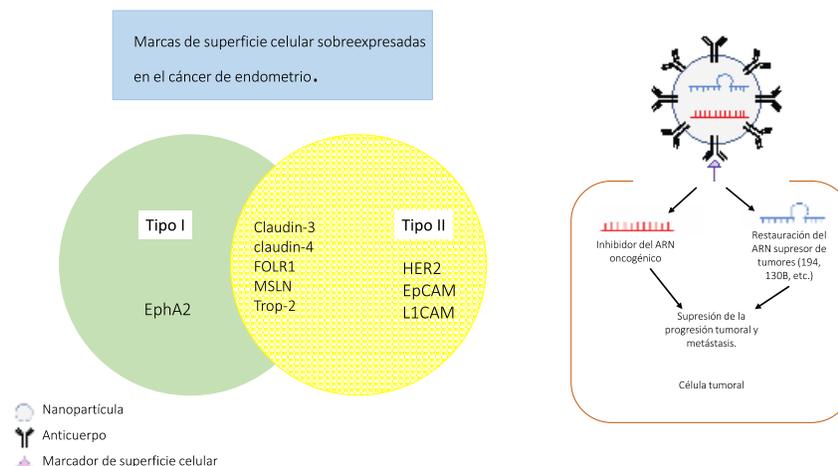


Figura 5. Terapéutica potencial basado en miRNAs. ⁹⁰

4. Problema y pregunta de investigación

El cáncer epitelial de endometrio (CEE) es una de las neoplasias ginecológicas más comunes, siendo en México la segunda en incidencia y la tercera en mortalidad de los cánceres en la mujer. Existe poca evidencia sobre el origen desde el punto de vista molecular, en los subtipos histológicos de mal pronóstico, sobre todo seroso papilar y carcinosarcomas. Por lo tanto, no se conocen con exactitud las vías y blancos moleculares asociados con los miRNAs y estos tipos particulares de CEE. Aunque se conocen algunos factores etiológicos, sobre todo en el tipo endometriode de bajo grado; la evidencia no es suficiente para conocer con certeza la etiología y la biología en las otras histologías.

Así mismo, no existen biomarcadores con miRNAs que ayuden a identificar a las pacientes con un pronóstico desfavorable ya que no se sabe si estas diferencias en los perfiles de miRNAs, junto con los subtipos histológico, pudieran influir en la supervivencia junto con otros factores pronóstico, como la afección ganglionar.

Pregunta de investigación

¿Existen algún perfil de expresión de miRNAs específico para cada subtipo histológico del cáncer epitelial de endometrio?

5. Justificación

El cáncer epitelial de endometrio (CEE) es una neoplasia maligna común en la mujer mexicana. Los subtipos histológicos de mal pronóstico, como el carcinoma seroso papilar o el carcinosarcoma, son las que se asocian a una pobre supervivencia global y libre de enfermedad en el CEE. Los miRNAs cada vez se están asociando más en los mecanismos etiológicos en las neoplasias malignas, y quizá pueden tener un papel como biomarcadores o terapéuticos en un futuro. Mediante un abordaje multidisciplinario (investigadores clínicos y básicos) se creará una base de datos retrospectiva y una cohorte prospectiva de pacientes con cáncer de endometrio, con la obtención de datos clínicos y obtención de muestras (tejido tumoral, tejido endometrial sano, sangre) para análisis moleculares de miRNAs con potencial para descubrir biomarcadores asociados al pronóstico de las pacientes con CEE y sus distintas histologías. Con la identificación de la firma de miRNAs específicas asociadas al subtipo histológico en las pacientes con CEE se podrá conocer en qué vías de señalización interactúan para tener potenciales biomarcadores, así como blancos terapéuticos para ser analizados.

6. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Existe un perfil de expresión diferencial de miRNAs asociado a cada subtipo histológico en el cáncer epitelial de endometrio (CEE).

Objetivo General

Describir perfiles de expresión de miRNAs asociados a los distintos subtipos histológicos del cáncer epitelial de endometrio.

Objetivos particulares:

- Obtener un perfil de expresión general de miRNAs en pacientes con CEE mediante secuenciación masiva.
- Identificar los miRNAs asociados a las distintas histologías en pacientes con CEE mediante herramientas bioinformáticas.
- Seleccionar y validar los miRNAs asociados a la histología en pacientes con CEE en una muestra independiente mediante RTqPCR.
- Describir una firma de miRNAs asociado a cada histología en pacientes con CEE.
- Identificar los blancos moleculares regulados por los miRNAs seleccionados mediante análisis bioinformático.
- Integrar los resultados obtenidos en variables analíticas con características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes analizados.

7. Material y Métodos

Tipo de estudio

Se trata de un estudio descriptivo con una cohorte de descubrimiento y una cohorte de validación.

Población a estudiar

Criterios de inclusión:

- Pacientes femeninos a partir de los 18 años ingresadas al Instituto Nacional de Cancerología con el diagnóstico de cáncer epitelial de endometrio (CEE).

Criterios de exclusión:

- Pacientes femeninos con diagnóstico de dobles primarios sincrónicos.
- Pacientes femeninos con histologías de sarcomas (sarcoma del estroma endometrial, leiomiomas y sarcomas indiferenciados)

Criterios de eliminación

- Pacientes con muestras procesadas de forma incorrecta.
- Muestras de calidad o cantidad inadecuadas de RNA.

Metodología en la fase de descubrimiento

Del expediente electrónico del Instituto Nacional de Cancerología se creó una base de datos con las variables clínico-patológicas con los pacientes con CEE entre 2005 y 2016. A partir de esta base de datos se realizaron subgrupos dependiendo del subtipo histológico (endometrioides grado 1-2, endometrioides grado 3, seroso papilar, células claras y carcinosarcomas) para seleccionar los bloques de parafina que se utilizaron para la secuenciación masiva.

Tamaño de muestra

El tamaño de muestra para la obtención de los bloques de parafina se realizó con la siguiente fórmula para obtener el número de pacientes por grupo para la secuenciación.

- $N = ((Z_a + Z_b) / (\mu_1 / \sigma_d))^2$
 - E: media de falsos positivos
 - G_σ : número anticipado de genes expresados no diferenciados en el experimento
 - Poder: específico para gen (0.95)
 - μ_1 : la media de la diferencia de la expresión entre los dos grupos
 - σ_d : Desviación estándar anticipada de la diferencia entre los dos grupos

Se usó la página www.sph.umd.edu/department/epib/sample-size-calculation-completely-randomized-treatment-control-design para la realización del tamaño de muestra (Figura 6).

Sample Size Calculation for Completely Randomized Treatment-Control Designs

Please input the following parameters, then click "Calculate" button to calculate sample size.

M : The mean number of false positive

G : The anticipated number of differentially expressed genes in the experiment

$power$: The specified power level for an individual gene, which represents the expected proportion of differentially expressed genes that will be detected at least by the test.

δ : The mean difference in log expression between treatment and control conditions as postulated under the alternative hypothesis H_1 .

σ : The anticipated standard deviation of the difference in log expression between treatment and control conditions.

δ (or σ): Statistical difference between treatment and control conditions under H_1 .

n : Sample size for each group.

Figura 6. Obtención de tamaño de muestra por grupo seleccionado mediante el website www.sph.umd.edu/department/epib/sample-size-calculation-completely-randomized-treatment-control-design.

Al final, idealmente el tamaño muestra calculado fue de 35 muestras, teniendo 7 muestras parafinadas para cada uno los siguientes subtipos endometriode grado 1-2, endometriode grado 3, carcinoma seroso papilar, células claras y carcinosarcomas (Figura 7).

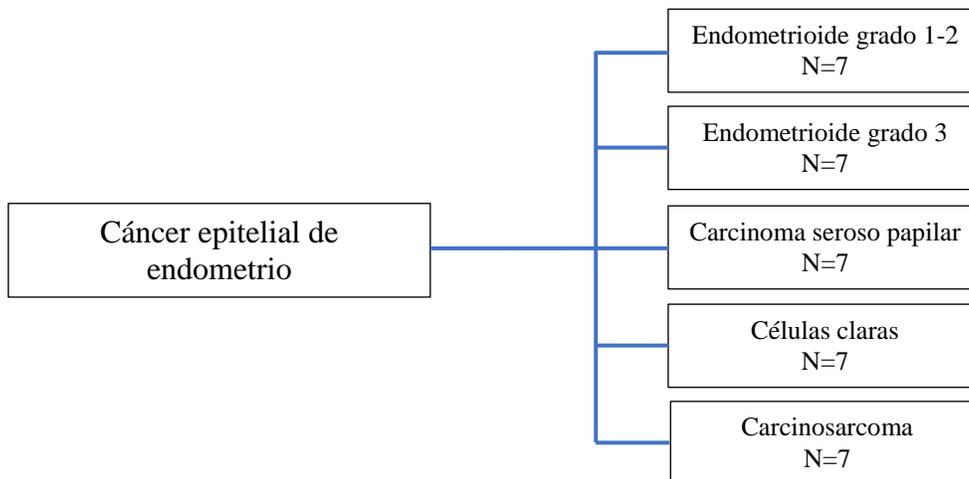


Figura 7. Distribución de la cantidad de los bloques de parafinas utilizados para la secuenciación masiva (fase de descubrimiento).

Extracción, verificación de cantidad y calidad de RNA pequeños.

Se corroboró por un patólogo oncólogo especialista en tumores malignos del tracto genital que los bloques de parafina tuvieron tumor por medio de revisión de laminillas teñidas con hematoxilina y eosina. De estos bloques de parafina se realizaron al menos 5 cortes de por lo menos 10 micras cada uno y que fueron las más representativas para la realización de las extracciones del RNA. La obtención de miRNA se hizo utilizando el kit de QIAGEN *miRNeasy Mini Kit* (No. Cat. 217004) de acuerdo a las especificaciones hechas por el fabricante. xileno y etanol, para posteriormente purificar y aislar el RNA, de acuerdo a las especificaciones del kit. La calidad se evaluó mediante su cuantificación por fluorómetro (Qubit), verificando su integridad en un chip de Bioanizador (Agilent, Tape Station 2200), donde solo las muestras con un factor de integridad alto (RIN 7) fueron consideradas para secuenciarse. Del RNA aislado, 5µg se mantuvieron a -80°C hasta el momento de la preparación de las librerías (donde se usará 1µg) y el resto se utilizó para las validaciones post-secuenciación.

Las muestras de parafina se colocaron a un tubo para centrifugar de 1,5 mL, se agregó 1 mL de Xylene y se centrifugó a temperatura ambiente por 2 min. Se removió el residuo flotante y se agregó 1 mL de ethanol (96-100%) y se centrifugó por 2 minutos y se incubó a temperatura ambiente con la tapa abierta para remover el ethanol residual.

Se agregaron 150 µL a 240 µL de Buffer PKD y posteriormente 10 µL de Proteínasa K. Se incubó a 56°C por 15 minutos y luego a 80°C por 15 minutos. Se transfirió la fase más inferior en un tubo para centrifugar de 2 mL. Se incubó en hielo por 3 minutos. Se centrifugó por 15 minutos a 20,000xg y se transfirió el flotante en un microtubo de 2 mL. Se agregó un booster de DNasa equivalente a un décimo del total del volumen de la muestra (entre 16 µL y 25 µL) y 10 µL de la solución de DNasa I. Se incubó por 15 minutos y se agregaron de 320 µL a 500 µL de Buffer RBC y lysis. Se agregaron 1120 µL a 1750 µL de ethanol a 96% y se mezclaron sin centrifugar. Se transfirió 700 µL de la muestra en el RNeasy MinElute en un tubo de 2 mL y se centrifugó por 15 segundos a 8000xg hasta que toda la muestra pasó por la columna del kit. Se agregó 500 µL de Buffer RPE y se centrifugó por 15 segundos a 8000xg.

La elución del RNA se realizaron colocando el RNeasy MinElute en un tubo de 2 mL y se centrifugó por 5 minutos y se retiró el flotante. Se colocó la columna del RNAeasy MinElute en un tubo de 1.5 mL y se agregó 14-30 µL de agua libre de nucleasa directamente en el centro de la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1-5 minutos y se centrifugó por 1 minuto para eludir el RNA.

Se midió el total de RNA (µg), las razones de A260/280 y A260/230 usando espectrofotometría con NanoDrop (ND1000, thermo Scientific) para medir la cantidad y pureza de los RNA.

Secuenciación masiva

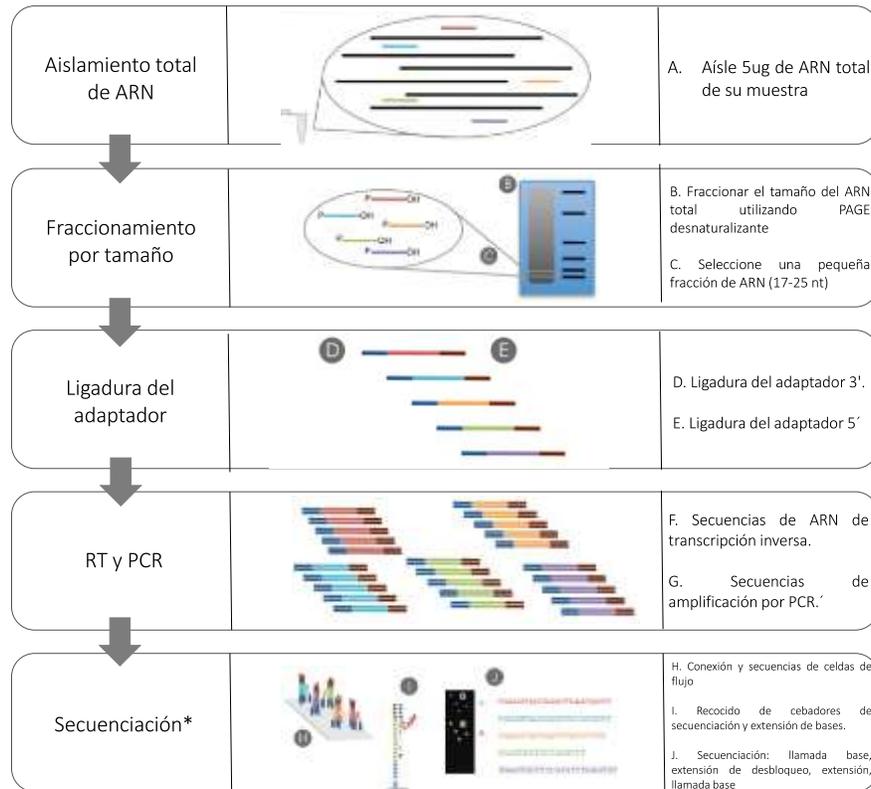
La preparación de las librerías para la secuenciación masiva en paralelo de RNA se llevó a cabo utilizando el Kit de la compañía Illumina, específicamente el *TruSeq Small RNA Library Prep Kit* (No. Cat. RS-200-0012). El protocolo comprendió los siguientes pasos (Figura 8).⁹¹

1. **Fraccionamiento del RNA:** En este paso, el RNA fue separado por pesos moleculares mediante un gel desnaturalizante de poliacrilamida, donde se purificó la fracción que corresponde a RNA pequeños (menores a 30 nucleótidos), lo que permitió optimizar el proceso de secuenciación.
2. **Ligación de adaptadores:** Dado que los miRNAs se caracterizan por la modificación del extremo 3'-hidroxilo y el extremo 5'-monofosfato, debido al procesamiento por *DICER/DROSHA*, el kit contiene adaptadores que son las secuencias conocidas a partir de la cual se inició el proceso de secuenciación. Éstos se añaden al RNA en los extremos 3' y 5' de la molécula de miRNAs mediante una ligasa de RNA.
3. **Reverso transcripción y amplificación de librería:** La molécula que es secuenciada en los secuenciadores de nueva generación es ADN, por lo tanto, es necesario generar ADN complementario a partir de la cadena de RNA, para esto se utilizó una transcriptasa reversa que generó un templado de cDNA a partir de los fragmentos de RNA de las muestras. En este paso, se utilizaron oligonucleótidos dirigidos a los adaptadores en los extremos 3' y 5' que se añadieron a la molécula de miRNAs. Una vez obtenido el cDNA, se amplificó la librería, con el objetivo de enriquecer la cantidad de moléculas de miRNAs para la secuenciación.
4. **Purificación de cDNA:** En este paso se purificó y aisló los cDNAs correspondientes a los miRNAs mediante una electroforesis por gel. Al final, se recuperó el cDNA obteniendo las bandas de 145 y 160 pb, se purifican y se concentran.
5. **Normalización de librería:** En este paso se llevó las librerías a la concentración de cDNA necesaria para la secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en un equipo MiSeq o HiSEQ en *single read* de 35 a 50 bases (Novogene Corporation Inc.) dependiendo de la cantidad de muestras y la profundidad de secuenciación deseada. La recomendación es de 1-2 millones de lecturas por muestra para ver expresión diferencial y de 5-8 millones de lecturas para descubrir nuevos miRNAs.⁹²

FIGURA 8

PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA MIRNA-SEQ



*Se muestra el método de secuenciación de Illumina; sin embargo, también se pueden utilizar otras plataformas de secuenciación.

Figura 8. Flujo de trabajo para la secuenciación masiva en paralelo del miRNA (miRNA-Sec). La figura muestra los pasos requeridos para llevar a cabo la secuenciación de microRNAs, desde la extracción de RNA, la preparación de las librerías (paso 1-5) hasta la corrida de secuenciación utilizando el secuenciador MySeq o Hiseq 2500 de la compañía Illumina.

Análisis Bioinformático

Los resultados de un proceso de secuenciación de miRNA-Sec son archivos en formato FASTQ, que corresponden a toda la información de las secuencias encontradas de miRNAs en las muestras secuenciadas. Los datos obtenidos son analizados con el uso de diferentes herramientas bioinformáticas. En este proyecto, se identificarán particularmente miRNA anotados para llevar a cabo análisis de expresión diferencial, y búsqueda de isoformas. El flujo básico de trabajo comprende los siguientes pasos (Figura 9).⁹³

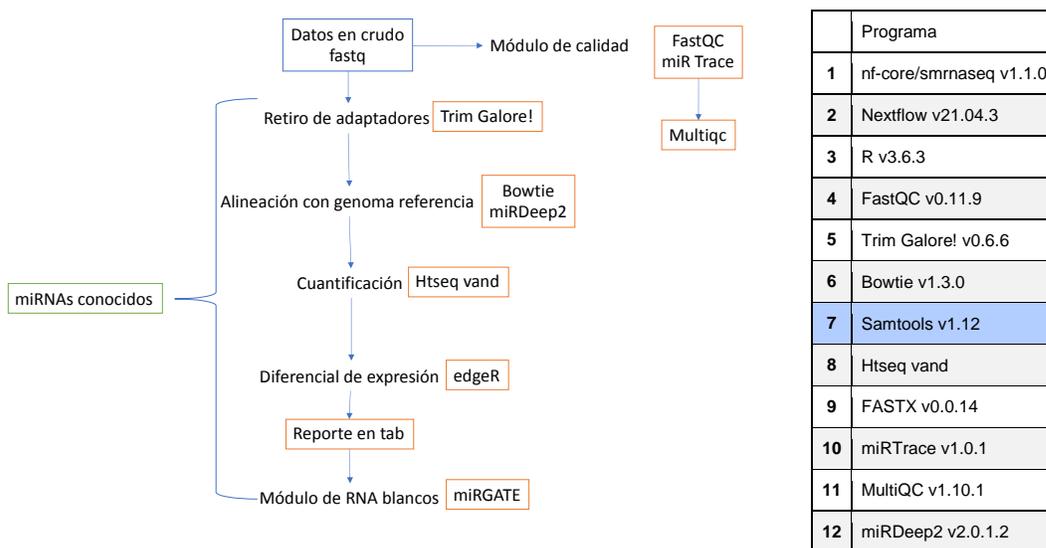


Figura 9. Pipeline del análisis bioinformático.

1. **Control de Calidad:** Se llevó a cabo con el uso de la herramienta *FASTQC*, que determina si la detección de bases fue adecuada en el proceso de secuenciación. Se mide mediante un puntaje de calidad que está en función del porcentaje de error. Un puntaje óptimo es igual a 20 o mayor.⁹⁴
2. **Eliminación de adaptadores:** Para llevar a cabo adecuadamente el análisis de las secuencias, es necesario retirar las secuencias de los adaptadores con la herramienta *Trim Galore!*, que reconoce las secuencias de nucleótidos correspondientes a los adaptadores de la librería, conservando la secuencia original del miRNA.⁹³
3. **Alineación con el genoma de referencia:** Se llevó a cabo con la herramienta *Bowtie* y *miRDeep2*, con el objetivo de reconocer la identidad del miRNA a través de su posición original en el genoma. Esto además es necesario para llevar a cabo la cuantificación de expresión de los miRNAs.⁹⁵
4. **Cuantificación de miRNAs:** La cuantificación de miRNAs tiene el objetivo de conocer la proporción de expresión de los miRNA en cada muestra biológica, para determinar las diferencias de expresión entre condiciones, y es un paso necesario para el análisis de expresión diferencial. La herramienta utilizada es *HTseq*, y cuantifica normalizando las lecturas en la unidad *TPM* (transcritos por millón).⁹⁶
5. **Análisis de expresión diferencial:** Se llevó a cabo con la herramienta *EdgeR*, que permite establecer diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miRNAs entre diferentes condiciones, considerando un valor q (tasa de descubrimiento falso) < 0.05 . Con este tipo de análisis se obtiene un mayor poder estadístico y se permiten la construcción de mapas de tipo volcán y mapas de calor, y análisis de agrupamiento no supervisado y que ayudan en la detección de miRNAs sobre-expresados o sub-expresados.⁹⁷

6. Caracterización de miRNAs:

Se llevó a cabo con el uso de herramientas en línea, como *MIRgate*, *DIANA*, *miRPath*, *miRBase* y *PicTar*. A través de estas herramientas se ofrece un módulo de predicción objetivo de miRNA-miRNA para miRNA. Son base de datos que contienen nuevos pares de miARN-ARNm pronosticados que se calculan utilizando algoritmos bien establecidos, incluidos miRNAanda42, Pita43, RNAhybrid44 o MicroTar45, entre otros.⁹⁸

Validación de miRNAs seleccionados

Para la validación de los miRNAs seleccionados se realizó con una cohorte independiente. La identificación de las pacientes con CEE se realiza en la junta interdisciplinaria de la Unidad Funcional del Departamento Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología los días martes, jueves y viernes de cada semana. En la junta de la Unidad funcional se hizo el diagnóstico y se programó el tratamiento quirúrgico de cada paciente. Posteriormente, un día previo a su ingreso programado se aplicó el consentimiento informado para poder recolectar las muestras.

El llenado de la base de datos se hizo a través de una herramienta de captura en Access (Microsoft Office) en una computadora exclusiva ubicada en la oficina académica del Departamento de Ginecología. El llenado de los datos se inició a partir de que se obtiene el expediente clínico de cada paciente, y posteriormente después de la cirugía, su egreso del hospital, al obtener el resultado final de patología, al momento de finalizar la adyuvancia si es que la necesita y en el seguimiento de forma continua. Cada 2 meses se realizó una validación de todos los pacientes capturados por medio del programa estadístico Stata Versión 16.0 para Mac (4905 Lakeway Dr. Colege Station, TX 77845). En caso de encontrar algún dato disperso en alguna de las variables, se identificó a la paciente y se buscó si es correcto o no, en caso de estar equivocado, se realiza la corrección pertinente.

Para la recolección de las muestras se creó un Manual de Procedimientos para Colección y Almacenamiento de Muestras para Cáncer de Endometrio (POE-LC-CEN-001). El día de la cirugía, previo al procedimiento quirúrgico, se tomaron las muestras de sangre para plasma y suero. Durante la cirugía, la muestra de tejido tumoral del endometrial fue tomada por el patólogo en turno en el trans-operatorio. Las muestras fueron enviadas inmediatamente para su almacenamiento. Para la obtención de ácidos nucleicos se creó un Manual de Procedimiento para Aislamiento Simultáneo de DNA, RNA y a Partir de Tejido (POE-LC-EXT-002).

Trascricpción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó con el objetivo de determinar la expresión relativa del miRNAs a validar, y conocer la condición de expresión del miRNA por muestra. Lo anterior, se realizó por medio de *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit*, y los ensayos pre-formulados de *TaqMan Advanced miRNA Assays*, los cuales permiten hacer la detección específica de los miRNAs de interés. Estos ensayos contienen los cebadores para la RT (transcripción reversa) y las sondas de hidrólisis para la qPCR. Su diseño innovador resuelve un problema fundamental en la cuantificación de miARNs: el pequeño tamaño de los miARNs maduros no permite un diseño convencional en el que primero se lleva a cabo una RT con cebadores al azar seguido por un ensayo específico de PCR a tiempo real. El cebador de stem-loop cumple dos objetivos: 1) la especificidad para sólo un miARN maduro diana, y 2) la formación de una quimera cebador de RT/ miARN maduro, que extiende el extremo 5' del miARN. El amplicón de RT resultante se somete a una PCR en tiempo real estándar, usando ensayos TaqMan (Figura 10).

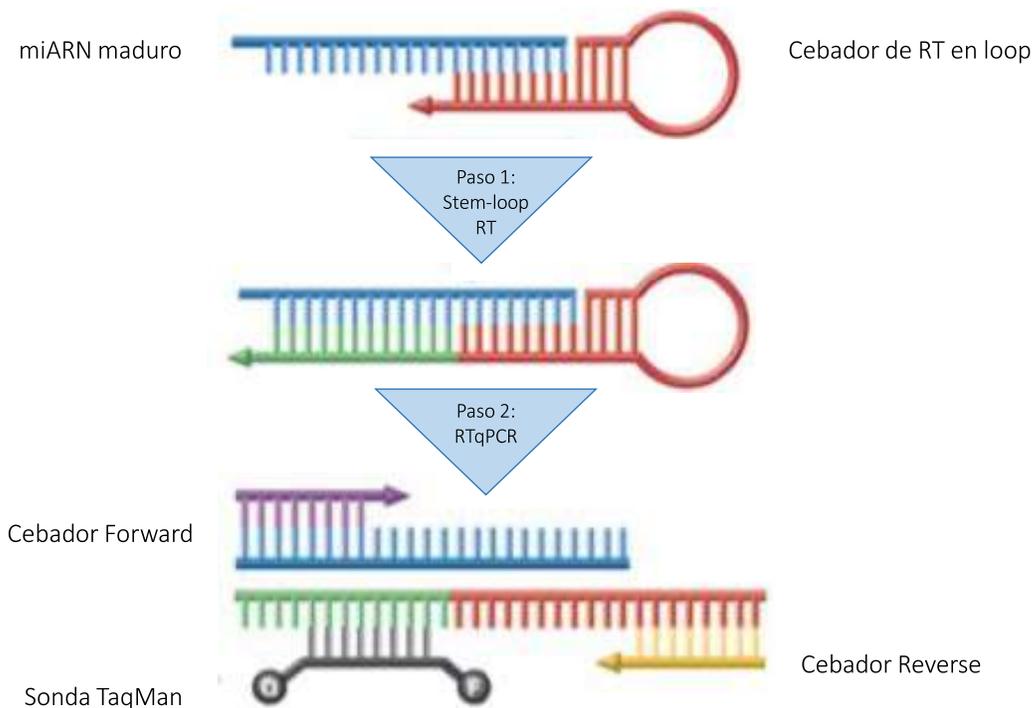


Figura 10. Pasos para la PCR cuantitativa en tiempo real.

Finalmente, utilizando el método $\Delta\Delta C_q$ se determinó la expresión relativa de cada microRNA. Esta técnica permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos.

Se fundamenta en la adaptación a un termociclador de un lector de fluorescencia, que detecta la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al DNA. La monitorización de esta fluorescencia permite analizar la cinética de la PCR en cada uno de sus ciclos, determinando el número de copias del fragmento de interés al inicio de la reacción.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión de los datos de acuerdo a la distribución de los mismos para las variables clínicas. Las distribuciones de las variables se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilk. En el caso de las variables categóricas se utilizó frecuencias absolutas y frecuencias relativas. En el caso de las variables continuas con distribución no normal se usó mediana y rango intercuartilar (RIC), y para las distribuciones continuas normales se usó media y desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con X^2 de Pearson o exacta de Fisher en el caso de las proporciones; las comparaciones de las concentraciones de las variables continuas se realizaron con la prueba de t student para los grupos independientes en el caso de que las distribuciones normales o con prueba de U de Mann-Whitney si la distribución no sea normal.

Se definió supervivencia global como el periodo entre la fecha que se realizó diagnóstico patológico en el INCan y la fecha de la última cita o muerte. Se definió supervivencia libre de enfermedad al periodo entre la fecha en que se realizó la cirugía y la fecha de la recurrencia o la última cita. Se definió recurrencia cuando se encontraron datos de enfermedad por imagen o biopsia posterior de haber finalizado su tratamiento multimodal y progresión si no existió un periodo libre de enfermedad. Las supervivencias se analizaron por el método de Kaplan-Meier y las curvas se compararon utilizando log-rank. El análisis estadístico se realizó con el programa de STATA 14.1 y se considerará significativo un valor $p < 0.05$.

Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cancerología con el número de referencia CEI/338/2023 y por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología con el número de referencia CI/0363/0023. El consentimiento informado se realizó a cada paciente que donará algún tipo de tejido un día previo a la cirugía que está programada.

8. Resultados

Identificación y aspectos clínicos de las muestras para la fase de descubrimiento

Para la fase de descubrimiento que se mandará a secuenciar, se obtuvieron un total de 48 muestras parafinadas de los cuales se seleccionaron 39 muestras dependiendo de la cantidad y/o pureza de RNA, obteniendo un total de 10 (26%) para el carcinoma endometriode grado 1-2, 4 (10%) para el carcinoma endometriode grado 3, 7 (18%) para el carcinoma seroso papilar, 6 (15%) para células claras, 5 (13%) para carcinosarcoma y 7 (18%) controles sanos. La mediana de edad es de 57.9 (RIC 52.1-65.2) años, 29 (74.26%) estaban en menopausia al momento del diagnóstico, con una mediana del índice de masa corporal (IMC) de 26.4 (23.5-32.9) (Tabla 8).

Tabla 8. Características clínico patológicas de las pacientes de la fase de descubrimiento.

	N=39 pacientes
Edad†	57.9 (52.1-65.2)
Menopausia‡	29 (74.26)
Peso†	62 (60-77)
IMC†	26.4 (23.5-32.9)
Subtipo histológico‡	
Endometriode G1-2	10 (26.0)
Endometriode G3	4 (10.0)
Seroso papilar	7 (18.0)
Células claras	6 (15.0)
Carcinosarcoma	5 (13.0)
Pacientes sanas	7 (18)

Abreviatura. IMC: índice de masa corporal

† mediana (rango intercuartilar)

‡ valor absoluto (%)

En cuanto a las características clínico patológicas (Tabla 9) de esta cohorte de descubrimiento, la median del tamaño tumoral fue de 40 (RIC 32-66) mm, 5 (15.6%) reportaron afección miometrial superficial, 12 (37.5%) afección menor al 50% del miometrio, 9 (28.1%) afección mayor al 50% del miometrio y 6 (18.8%) no fue posible identificar la afección miometrial. Once (34.4%) de las pacientes tenían permeación linfovascular, 6 (18.8%) afección cervical, 1 (3.1%) afección parametrial, 5 (15.6%) afección a serosa, 2 (6.3%) afección anexial, 7 (21.9%) afección ganglionar pélvica. En cuanto a las etapas 13 (40.6%) eran etapas I, 2 (6.3%) etapa II, 8 (25.0%) etapa III y 9 (28.1%) etapa IV. En cuanto a sus características de tratamiento, 21 (65.6%) recibieron algún tipo de adyuvancia, siendo 20 (62.5%) con quimioterapia y 16 (50.0%) radioterapia. Hay un total de 6 (18.8%) recurrencias.

Tabla 9. Características clínicas de las pacientes con adenocarcinoma de endometrio de la fase de descubrimiento.

	N=32 pacientes
Tamaño tumoral (mm) †	40 (32-66)
Afección miometrial‡	
Superficial	5 (15.6)
< 50%	12 (37.5)
> 50%	9 (28.1)
No reportado	6 (18.8)
PLV‡	11 (34.4)
Afección cervical‡	6 (18.8)
Afección parametrial‡	1 (3.1)
Afección a serosa‡	5 (15.6)
Afección a anexos‡	2 (6.3)
Afección ganglionar pélvica‡	
No	10 (31.3)
Si	7 (21.9)
No indicado	15 (46.9)
Afección ganglionar para aórtica‡	
No	9 (28.1)
Si	2 (6.3)
No indicado	21 (65.6)
Etapa‡	
I	13 (40.6)
II	2 (6.3)
III	8 (25.0)
IV	9 (28.1)
Adyuvancia‡	21 (65.6)
QT‡	20 (62.5)
RT‡	16 (50.0)
Recurrencia‡	6 (18.8)

Abreviaturas. PLV: permeación linfovascular, QT: quimioterapia, RT: radioterapia.
† mediana (rango intercuartilar)
‡ valor absoluto (%)

Cuando se comparó las características clínico-patológicas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la edad ($p=0.010$), menopausia (0.016) y la afección ganglionar pélvica ($p=0.036$). En el resto de las variables analizadas no se encontró una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis comparativo por subtipo histológico de las características de las pacientes con carcinoma epitelial de endometrio de la fase de descubrimiento. N=32

	CEG1-2	CEG3	CSP	CC	CS	P
Edad†	10 (26.0)	4 (10.0)	7 (18.0)	6 (15.0)	5 (13.0)	
	52.6 (39.4-61.7)	46.7 (39.5-53.2)	66.7 (61.9-70.2)	58.5 (53.4-68.0)	57.6 (57.8-59.6)	0.010
Menopausia‡	6 (75.0)	2 (50.0)	7 (100.0)	6 (100.0)	6 (85.7)	0.016
Peso†	70 (61-86.5)	81 (70.5-84.5)	57 (52-71)	59 (50-62)	65 (60-77)	0.065
IMC†	30.7 (26.1-37.3)	33.7 (29.7-34.3)	24.0 (22.2-29.9)	25.9 (23.5-26.5)	25.1 (23.6-33.3)	0.139
Tamaño tumoral†	58 (35-80)	65 (50-80)	32 (32-32)	5 (5-5)	35 (30-35)	0.120
Afección miometrial‡						
Superficial	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (14.3)	1 (16.7)	2 (28.6)	0.116
< 50%	6 (75.0)	1 (25.0)	2 (28.6)	0 (0.0)	3 (42.9)	
> 50%	0 (0.0)	3 (75.0)	3 (42.9)	3 (50.0)	0 (0.0)	
NA	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (14.3)	2 (33.3)	2 (28.6)	
PLV‡	1 (12.5)	2 (50.0)	3 (42.9)	2 (33.3)	3 (42.9)	0.631
Afección cervical‡	1 (12.5)	3 (75.0)	2 (28.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.063
Afección parametrio‡	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.29)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.437
Afección a serosa‡	0 (0.0)	1 (25.0)	3 (42.9)	1 (16.7)	0 (0.0)	0.092
Afección anexial ‡	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	0.410
Afección ganglionar pélvica‡						
No	1 (12.5)	1 (25.0)	2 (28.6)	1 (16.7)	5 (71.4)	0.036
Si	1 (12.5)	3 (75.0)	2 (28.6)	1 (16.7)	0 (0.0)	
NA	6 (75.0)	0 (0.0)	3 (42.9)	4 (66.7)	2 (28.6)	
Afección ganglionar para aórtica‡						
No	4 (50.0)	2 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (42.9)	0.086
Si	0 (0.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	1 (67.7)	0 (0.0)	
NA	4 (50.0)	1 (25.0)	7 (100.0)	5 (83.3)	4 (57.1)	
Etapa‡						
I	4 (50.0)	1 (25.0)	2 (28.6)	2 (33.3)	4 (57.1)	0.798
II	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.3)	0 (0.0)	1 (14.3)	
III	2 (25.0)	1 (25.0)	3 (42.9)	2 (33.3)	0 (0.0)	
IV	2 (25.0)	2 (50.0)	1 (14.3)	2 (33.3)	2 (28.6)	
Adyuvancia‡	4 (50.0)	2 (50.0)	6 (85.7)	6 (100.0)	7 (100.0)	0.051
QT‡	4 (50.0)	2 (50.0)	5 (71.4)	4 (66.7)	5 (71.4)	0.858
RT‡	3 (37.5)	2 (50.0)	3 (42.9)	4 (66.7)	4 (57.1)	0.835
Recurrencia‡	1 (12.5)	1 (25.0)	3 (42.9)	0 (0.0)	1 (14.3)	0.348

Abreviaturas. CE: carcinoma endometriode, CSP: carcinoma seroso papilar, CC: células claras, CS: carcinosarcoma, IMC: índice de masa corporal, PLV: permeación linfovascular, QT: quimioterapia, RT: radioterapia.

† mediana (rango intercuartilar)

‡ valor absoluto (%)

La supervivencia global a 5 años de la cohorte usada en la fase de descubrimiento fue de 75.2% (IC 95% 09.7-81.5), para el subtipo histológico endometriode grado 1-2 fue de 87.5% (IC 95% 38.7-98.1-89.3), para el endometriode grado 3 de 50.0% (IC 95% 01.0-91.0), para carcinoma seroso papilar de 60.0% (IC 95% 12.6-88.2), para células claras de 100% y para carcinosarcoma de 80.0% (IC 95% 20.4-96.7), sin haber una diferencia estadísticamente significativa (p=0.689) (Tabla 11) (Figura 11). La supervivencia libre de enfermedad a 5 años

general fue de 65.5% (IC 95% 40.7-81.9), para el subtipo histológico endometrioide grado 1-2 fue de 83.3% (IC 95% 27.3-97.5), para el endometrioide grado 3 fue de 37.5 (IC 95% 1.0-80.8), para carcinoma seroso papilar de 75.0% (IC 95% 12.3-96.1), para células claras de 62.5 (14.2-89.3) y para carcinosarcoma de 62.5% (IC 95% 14.2-89.3), sin haber una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.347$) (Tabla 11) (Figura 12).

Tabla 11. Supervivencias por histología en pacientes con adenocarcinoma de endometrio. N=32

	SG a 5 años (IC 95%)	p	SLE a 5 años (IC 95%)	p
General	75.2 (09.7-81.5)		65.5 (40.7-81.9)	
CEG1-2	87.5 (38.7-98.1)	0.689	83.3 (27.3-97.5)	0.347
CEG3	50.0 (01.0-91.0)		37.5 (1.0-80.8)	
CSP	60.0 (12.6-88.2)		75 (12.3-96.1)	
CC	100.0		62.5 (14.2-89.3)	
CS	80.0 (20.4-96.7)		62.5 (14.2-89.3)	

Abreviaturas. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global, CE: carcinoma endometrioide, CSP: carcinoma seroso papilar, CC: células claras, CS: carcinosarcoma, IMC: índice de masa corporal, PLV: permeación linfovascular, QT: quimioterapia, RT: radioterapia.

† mediana (rango intercuartilar)

‡ valor absoluto (%)

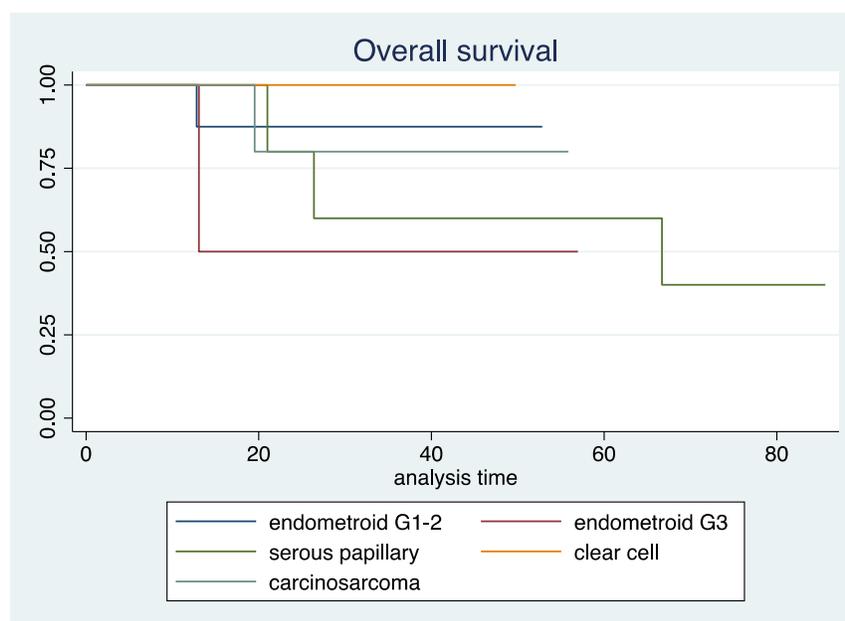


Figura 11. Supervivencia global por subtipo histológico de la cohorte de la fase de descubrimiento.

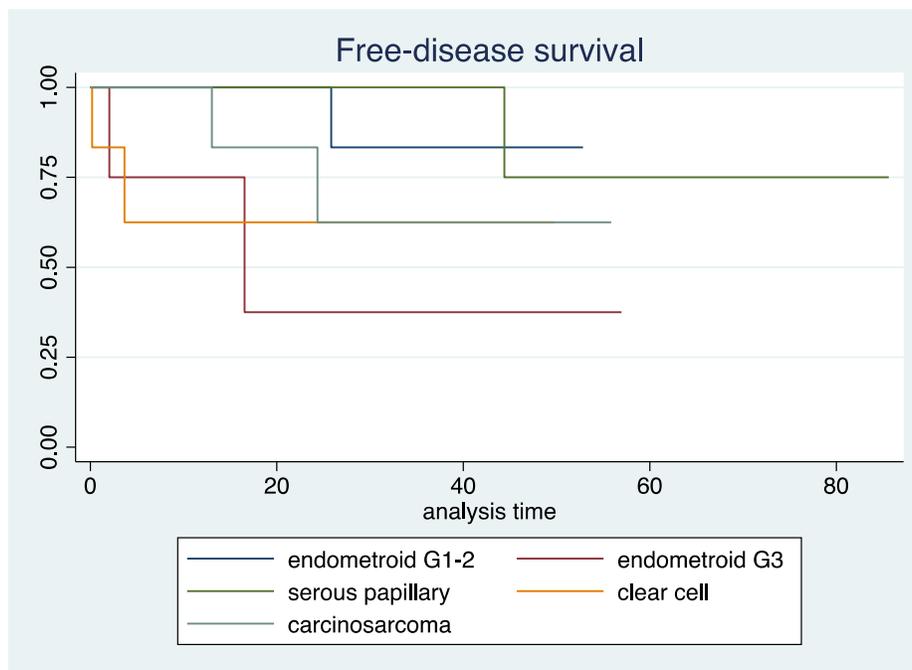


Figura 12. Supervivencia libre de enfermedad por subtipo histológico de la cohorte de la fase de descubrimiento.

Del total de las muestras, la mediana de cantidad de RNA fue de 718.6 (496.8-1055) ng/dl, con una mediana de razón 260/280 por espectrofotometría de 1.99 (1.94-2.02) y una mediana de razón 260/230 de 2.04 (1.89-2.11). No hubo diferencia significativa en cuanto a la cantidad y razones de pureza de RNA al ser comparado por subtipo histológico (Tabla 12).

Tabla 12. Cantidad y pureza de RNA comparado por grupos de estudio de la fase de descubrimiento.

	Total	CEG1- 2	CEG3	CSP	CC	CS	Sanas	p
Muestras	39 (100)	10 (25.6)	4 (10.3)	7 (17.9)	6 (15.4)	5 (12.8)	7 (17.9)	
Cantidad ng/dl†	718.6 (496.8- 1055)	592.4 (356- 1084)	636 (162.7- 1052.2)	724.9 (541.3- 895.8)	804.4 (671.8- 1057.3)	1062 (1055- 1090)	664.4 (513.6- 803.3)	0.368
260/280†	1.99 (1.94- 2.02)	2.01 (1.98- 2.03)	2.04 (2.01- 2.05)	1.93 (1.93- 2.01)	1.95 (1.91- 1.99)	1.98 (1.96- 1.99)	2.01 (1.98- 2.02)	0.061
260/230†	2.04 (1.89- 2.11)	2.04 (1.9- 2.06)	2.11 (2.03- 2.19)	1.95 (1.77- 2.08)	1.84 (1.77- 1.97)	2.08 (2.08- 2.14)	2.1 (2.02- 2.12)	0.085

Abreviaturas. CE: carcinoma endometriode, CSP: carcinoma seroso papilar, CC: células claras, CS: carcinosarcoma.

† mediana (rango intercuartilar).

Resultados de la secuenciación masiva

Se mandaron a secuenciar las 39 muestras y posteriormente se obtuvo un dataset en crudo para el posterior análisis bioinformático para tener las características y control de calidad de la información, un análisis por grupo y un análisis de diferencia de miRNAs para obtener un adecuado perfil de expresión.

Características y calidad de la secuenciación

Se hizo un análisis bioinformático con el cual se identificó las características y la calidad de los datos obtenidos para cada una de las muestras secuenciadas. El índice de Phred para todas las muestras pasó el filtro, ya que fue mayor de 35 para todas, lo que sugiere un factor de error por base de 1 en 10,000; es decir, con un 99.99% de precisión de que la base sea correctamente nombrada (Figura 13). En cuanto a la longitud de las transcripciones secuenciadas, todas menos la muestra 3 tenían una longitud de ~22 nucleótidos de largo. La muestra 3 está marcada porque <25% de las secuencias tienen entre 20 y 25 nucleótidos de longitud (Figura 14). Para el control de calidad después de retirar los adaptadores, no se identificó el adaptador en un 91.9% de las lecturas de todas las muestras y sólo en un 8% se encontraron adaptadores (Figura 15). Para la mayoría de las aplicaciones, es deseable un alto contenido de miRNA y un bajo contenido de rRNA y tRNA, en el total de las muestras se encontró un 20.7% de miRNAs. Sin embargo, las muestras 3, 6, 14, 34, 47, 58, 59 y 61 tenían un contenido de miRNA <10% (Figura 16).

Para la complejidad de las secuencias de miRNAs para cada muestra, se ve que todas tienen entre 400 y 1119 miRNAs secuencias distintas en función de la profundidad de la secuenciación y que son conocidos para el ser humano (Figura 17).

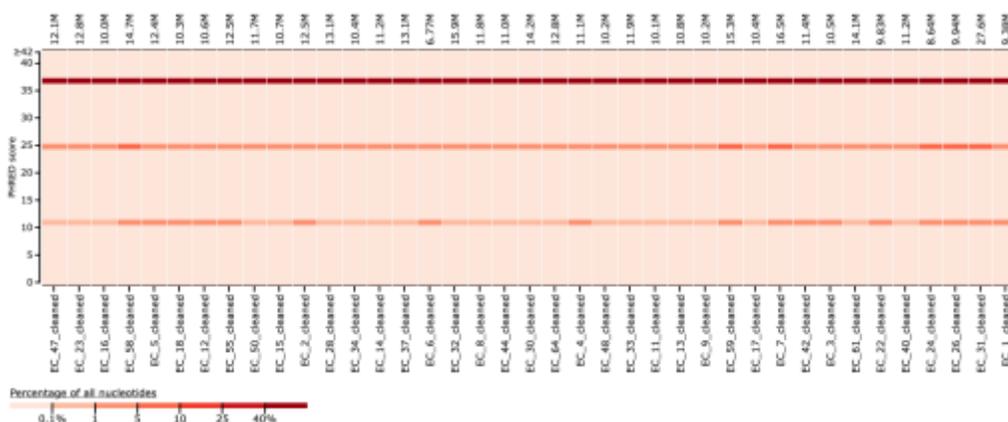


Figura 13. Índice de Phred

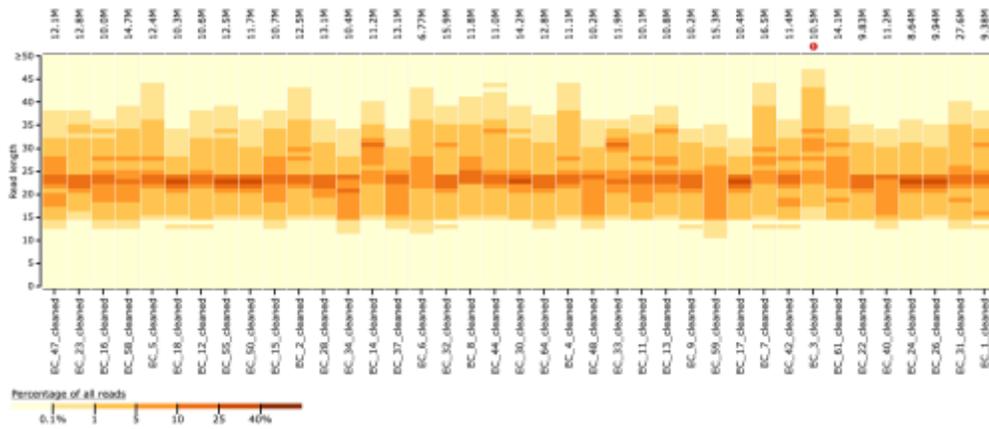


Figura 14. Longitud de las lecturas.

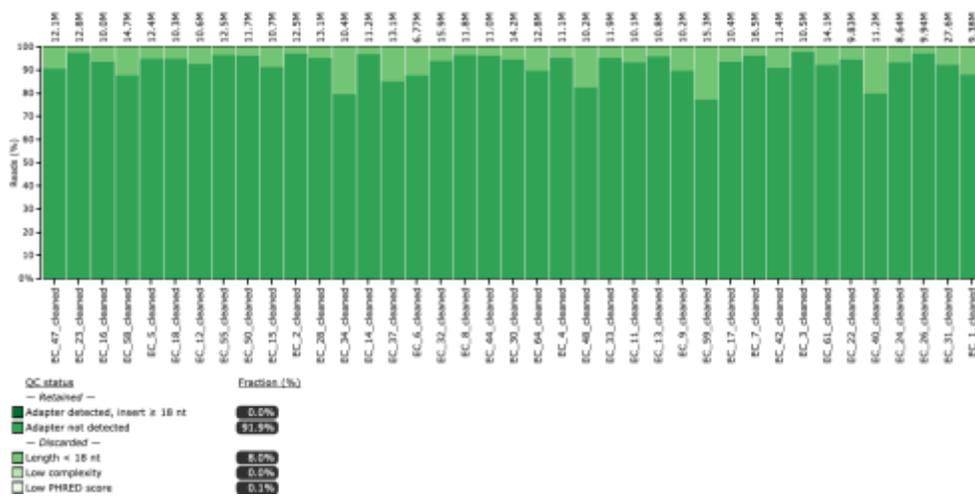


Figura 15. Control de calidad de las lecturas.

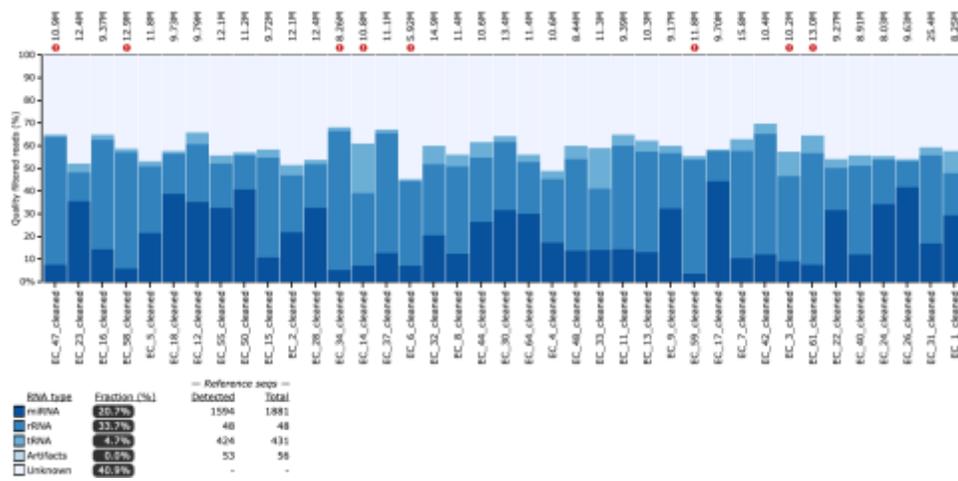


Figura 16. Tipo de RNA detectado

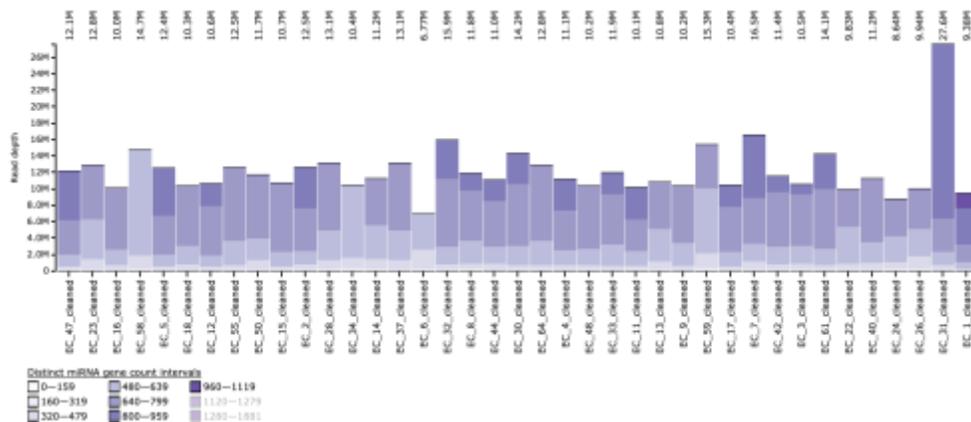


Figura 17. Complejidad de las secuencias de las miRNAS

Análisis por agrupamiento no supervisado

Se realizó un análisis de agrupamiento no supervisado de tipo jerárquico para encontrar grupos y establecer si había similitudes en los miRNAs secuenciados para cada muestra. Se encontró una diferencia entre los miRNAs secuenciados del grupo de pacientes sanos y el resto de las histologías tanto en el análisis de miRNAs. Así mismo, se encontró que entre las distintas histologías había ciertas similitudes entre los miRNAs secuenciados, aunque si mostraban ciertas diferencias entre ellos (Figura 18).

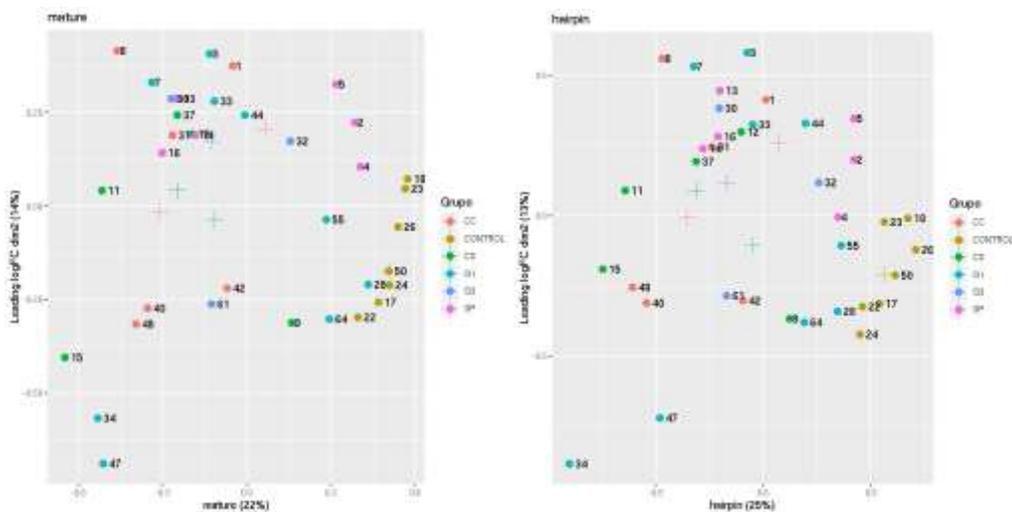


Figura 18. Agrupamiento de las muestras por histología según las características generales de los miRNAs. Abreviaturas: CC: carcinoma células claras, CONTROL: pacientes sanas, CS: carcinosarcoma, G1: carcinoma endometrioide grado 1 y 2, G3: carcinoma endometrioide G3, SP: carcinoma seroso papilar.

Diferencial de expresión de miRNAs por histología

Se realizó un análisis de expresión diferencial entre las pacientes sanas y cada una de las histologías para obtener el perfil de miRNAs específico para cada uno. En la figura 19 se muestran los miRNAs sobrepresados y subexpresados para la histología carcinoma endometrioide grado 1 y 2, en la figura 20 para el carcinoma endometrioide grado 3, en la figura 21 para el carcinoma seroso papilar, en la figura 22 para el carcinoma de células claras y en la 23 para el carcinosarcoma.

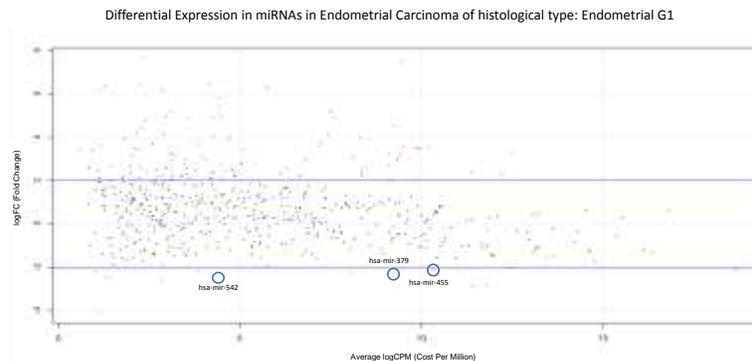


Figura 19. Los miRNAs expresados diferencialmente se muestran resultados con puntos rojos. Los que tienen un logFC negativo son equivalentes a los transcritos expresados en el subtipo histológico carcinoma endometrioide grado 1 y 2, mientras que los que tienen un valor positivo son transcritos expresados en las muestras con tejido sano. Las líneas azules representan un cambio de relación. En los puntos donde hay más de dos miRNAs, los puntos no se pueden distinguir por separado o porque coinciden con las mismas coordenadas. Los miRNAs que están con negro están expresados exclusivamente en carcinoma endometrioide grado 1 y 2.

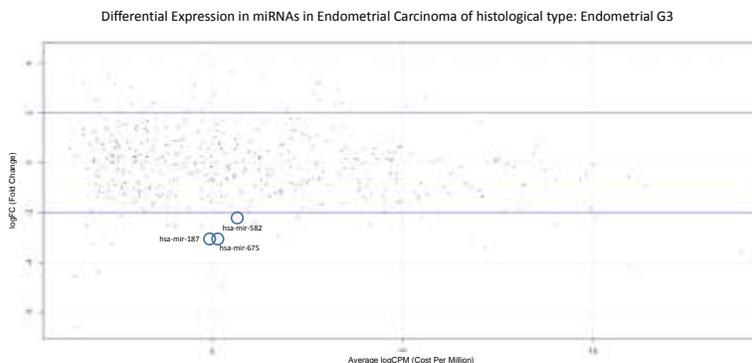


Figura 20. Los miRNAs expresados diferencialmente se muestran resultados con puntos rojos. Los que tienen un logFC negativo son equivalentes a los transcritos expresados en el subtipo histológico endometrioide grado 3, mientras que los que tienen un valor positivo son transcritos expresados en las muestras con tejido sano. Las líneas azules representan un cambio de relación. En los puntos donde hay más de dos miRNAs, los puntos no se pueden

distinguir por separado o porque coinciden con las mismas coordenadas. Los miRNAs que están con negro están expresados exclusivamente en carcinoma endometriode grado 3.

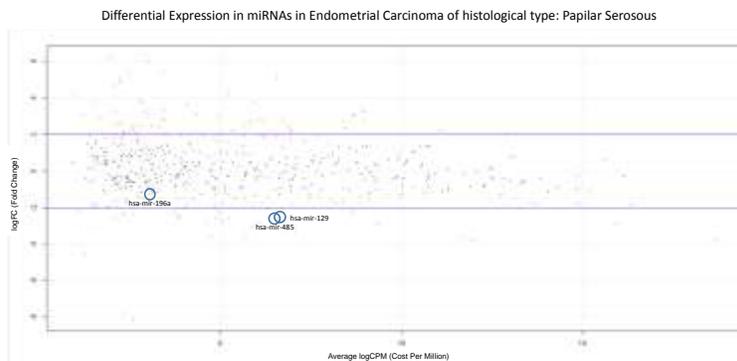


Figura 21. Los miRNAs expresados diferencialmente se muestran resultados con puntos rojos. Los que tienen un logFC negativo son equivalentes a los transcritos expresados en el subtipo histológico de carcinoma seroso papilar, mientras que los que tienen un valor positivo son transcritos expresados en las muestras con tejido sano. Las líneas azules representan un cambio de relación. En los puntos donde hay más de dos miRNAs, los puntos no se pueden distinguir por separado o porque coinciden con las mismas coordenadas. Los miRNAs que están con negro están expresados exclusivamente en el carcinoma seroso papilar.

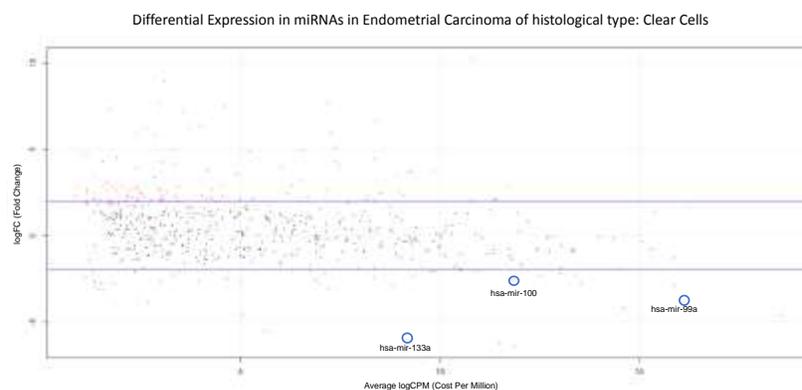


Figura 22. Los miRNAs expresados diferencialmente se muestran resaltados con puntos rojos. Los que tienen un logFC negativo son equivalentes a los transcritos expresados en el subtipo histológico carcinoma de células claras, mientras que los que tienen un valor positivo son transcritos expresados en las muestras con tejido sano. Las líneas azules representan un cambio de relación. En los puntos donde hay más de dos miRNAs, los puntos no se pueden distinguir por separado o porque coinciden con las mismas coordenadas. Los miRNAs que están con negro están expresados exclusivamente en carcinoma de células claras.

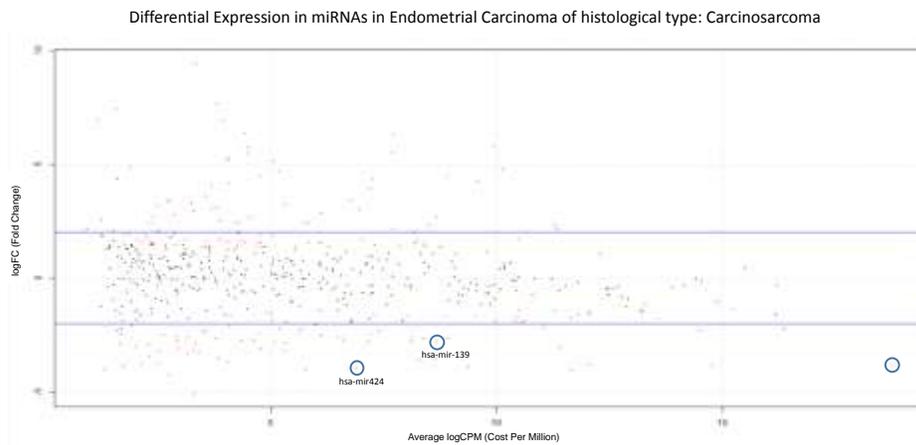


Figura 23. Los miRNAs expresados diferencialmente se muestran resaltados con puntos rojos. Los que tienen un logFC negativo son equivalentes a los transcritos expresados en el subtipo histológico carcinosarcoma, mientras que los que tienen un valor positivo son transcritos expresados en las muestras con tejido sano. Las líneas azules representan un cambio de relación. En los puntos donde hay más de dos miRNAs, los puntos no se pueden distinguir por separado o porque coinciden con las mismas coordenadas. Los miRNAs que están con negro están expresados exclusivamente en carcinosarcoma.

En la tabla 13 se muestran 10 de los principales miRNAs que no están expresados en las muestras control (pacientes sin cáncer) y si están expresados en cada histología y con un valor $p < 0.001$.

Tabla 13. Se muestran 10 de los principales miRNAs expresados en los distintos tipos histopatológicos de carcinoma de endometrio.

Carcinoma endometrioide grado 1 y 2	logFC	logCPM	Valor p
hsa-mir-1-2	-2.827024937	11.81255251	0.000654922
hsa-mir-381	-1.807774733	8.611909664	0.00061254
hsa-mir-1-1	-2.886333892	11.42638725	0.000353352
hsa-mir-199b	-2.05267183	12.44366293	0.000290588
hsa-mir-4510	-2.578081451	2.856181571	0.000115204
hsa-mir-9985	-2.182285656	3.87666461	8.74E-05
hsa-mir-4770	-4.11014502	1.139581487	5.11E-05
hsa-mir-455	-2.155488322	10.31973606	3.93E-05
hsa-mir-379	-2.281452459	8.102785912	3.63E-05
hsa-mir-542	-2.510178748	4.431947831	2.14E-05
Carcinoma endometrioide grado 3	logFC	logCPM	PValue
hsa-mir-9985	-2.581641675	4.055867764	0.000901906
hsa-mir-675	-2.281140123	5.673073618	0.000880232
hsa-mir-5186	-4.405347574	2.019053783	0.000786973
hsa-mir-655	-4.397432692	2.005809596	0.000368568
hsa-mir-196b	-2.519068457	9.174944692	0.000208233
hsa-mir-143	-3.585245015	18.88048416	7.31E-05
hsa-mir-1-1	-3.230898649	11.78608451	4.51E-05
hsa-mir-582	-2.948718527	6.724677943	2.32E-05
hsa-mir-1-2	-3.415163012	12.16255927	1.52E-05
hsa-mir-187	-3.090200398	4.928129695	8.07E-06
Carcinoma seroso papilar	logFC	logCPM	PValue
hsa-mir-196a-1	-1.52166338	3.82756652	0.00604735
hsa-mir-127	-2.011160812	11.4329235	0.000839412
hsa-mir-7108	-2.055144211	6.314734739	0.000993567
hsa-mir-4508	-2.245728763	4.991628162	0.000571968
hsa-mir-4787	-2.485285988	3.865764504	4E-05
hsa-mir-190b	-2.53219674	3.852583101	0.000697534

hsa-mir-4443	-2.610170505	4.873126488	9.96E-05
hsa-mir-485	-2.677222192	6.652143817	0.000898387
hsa-mir-5787	-2.727614146	5.094091264	8.17E-05
hsa-mir-6752	-2.767440373	4.661209747	8.34E-06
Carcinoma de células claras	logFC	logCPM	PValue
hsa-mir-100	-2.803	13.541	3.64E-06
hsa-mir-195	-2.873847111	8.830085657	0.000285186
hsa-mir-10b	-2.892490932	15.88397078	2.73E-06
hsa-mir-3910-1	-3.082054	1.443045	0.000117923
hsa-mir-504	-3.085726158	7.209586817	6.37E-06
hsa-mir-99a	-3.784318562	16.13161875	5.91E-05
hsa-mir-145	-4.189444965	14.61796059	2.81E-07
hsa-mir-873	-4.590703333	5.057995803	7.36E-10
hsa-mir-143	-4.599418286	18.58288111	3.79E-10
hsa-mir-133a-1	-6.025736748	9.200371856	1.03E-15
Carcinoma	logFC	logCPM	PValue
hsa-mir-139	-2.702407078	8.383929564	0.000159655
hsa-mir-432	-3.177270251	3.292564697	7.12E-05
hsa-mir-495	-3.226389331	5.306435258	4.37E-06
hsa-mir-543	-3.257220931	3.409055479	3.16E-07
hsa-mir-381	-3.534226538	8.651687288	4.51E-06
hsa-mir-379	-3.630362148	8.279947784	5.63E-06
hsa-mir-494	-3.74139624	4.049604907	9.33E-07
hsa-mir-143	-3.833001672	18.78835627	9.25E-05
hsa-mir-145	-3.846307554	14.77598859	1.86E-05
hsa-mir-424	-3.971234168	6.914506583	1.06E-08
Abreviaturas. logFC: logaritmo de fold change, logCPM: logaritmo de cuentas por millón.			

Perfil seleccionado para cada histología

El perfil de miRNAs final que se seleccionó para cada histología se realizó tomando en cuenta los miRNAs expresados fuera de forma específica para cada subtipo histológico, que tuvieran

un logFC y un valor p en menor cantidad. En la tabla 14 se muestra los perfiles finales de miRNAs seleccionados para cada subtipo histológico.

Tabla 14. Perfil de miRNAs específico para cada subtipo histológico.			
miRNA	logFC	logCPM	Valor p
Carcinoma endometriode G1 y G2			
hsa-mir-379	-2.28145246	8.10278591	3.63E-05
hsa-mir-455	-2.15548832	10.3197361	3.93E-05
hsa-mir-542	-2.51017874	4.43194783	2.14E-05
Carcinoma endometriode G3			
hsa-mir-187	-3.0902004	4.9281297	8.07E-06
hsa-mir-582	-2.94871853	6.72467794	2.32E-05
hsa-mir-675	-2.2811401	5.67307362	0.00088023
Carcinoma seroso papilar			
hsa-mir-129-1	-2.58366084	6.4766503	0.00117605
hsa-mir-196a-1	-1.52166338	3.82756652	0.00604735
hsa-mir-485	-2.67722219	6.65214382	0.00089839
Carcinoma de células claras			
hsa-mir-99a	-3.784	16.131	5.91E-05
hsa-mir-100	-2.803	13.541	3.64E-06
hsa-mir-133a	-6.02573675	9.20037186	1.03E-15
Carcinosarcoma			
hsa-mir-139	-2.70240708	8.38392956	0.00015966
hsa-mir-143	-3.83300167	18.7883563	9.25E-05
hsa-mir-424	-3.971	6.914	1.06E-08
Abreviaturas. logFC: logaritmo de fold change, logCPM: logaritmo de cuentas por millón.			

Fase de validación

Se tomó en consideración para esta validación una cohorte independiente con muestras del tumor primario congeladas de pacientes con cáncer de endometrio de histopatología no endometriode y se compraron los niveles de expresión con controles sanos con técnica PCR cuantitativa en tiempo real. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión en la histología de células claras para el miRNA-99a ($p=0.667$), miRNA-100 ($p=NA$) ni en el miRNA-133a ($p=NA$) (Figura 24). En la histología de carcinoma seroso papilar, no hubo diferencia en expresión de los miRNA-129-1 ($p=0.857$), miRNA-196a-1 ($p=0.286$), ni en el miRNA-485 ($p=0.333$) (Figura 24). En la histología de carcinosarcoma el miRNA-139 ($p=0.5982$) y el miRNA-143 ($p=0.581$) no tuvieron diferencia de expresión en comparación con el control (Figura 24). De los miRNAs seleccionados en la fase de descubrimiento de histologías no endometriode, el miRNA-424 para carcinosarcoma fue el único que tuvo una diferencia de expresión estadísticamente significativa en comparación con los controles sanos ($p=0.044$) (Figura 25).

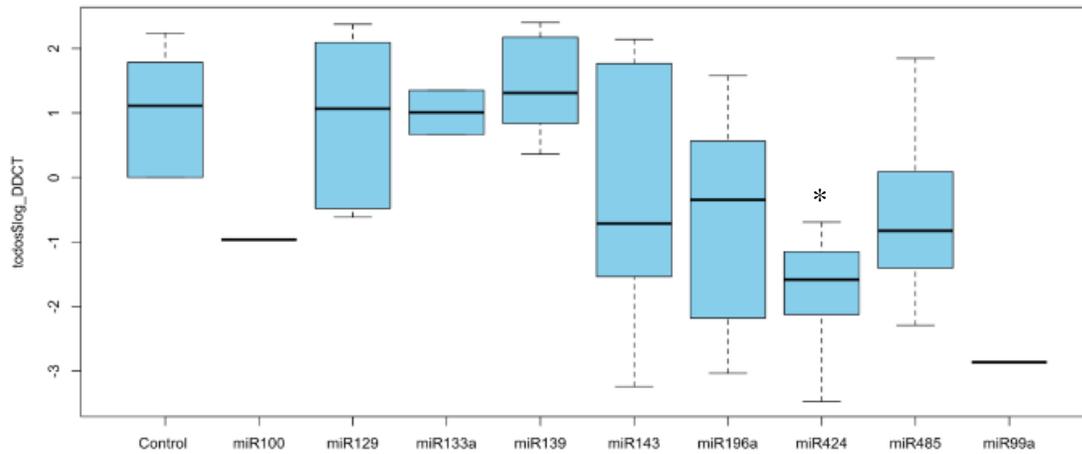
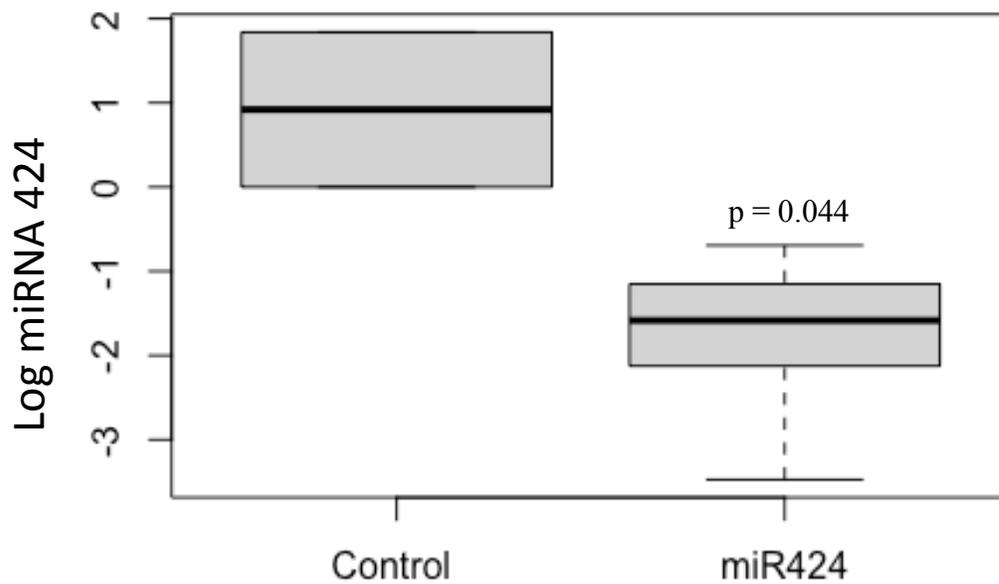


Figura 24. Validación con técnica en PCR en tiempo real de los miRNAs seleccionados para los perfiles de cada histología no endometriode (* es estadísticamente significativo).



miRNA 424 en carcinosarcoma

Figura 25. Resultados de validación con PCR en tiempo real en muestra independiente del miRNA-424. Se muestra una subexpresión del miRNA-424 en pacientes con CEE de tipo carcinosarcoma en comparación con los controles sanos (p=0.044).

Análisis bioinformático de ubicación, sitios de unión e interacciones con las vías de señalización del miRNA-424

A través de las plataformas miRBASE se identificó la ubicación y secuencia del miRNA-424 en el genoma.¹⁰² El miRNA está ubicado el cromosoma X desde p11.3 hasta q22.3. Perteneció a la familia de los miR-322 (Figura 26).



Figura 26. Secuencia y ubicación del miRNA-424

La estructura y la secuencia de las bases del miRNA-424 son las siguientes:

```

-----      a C  AA      g c
              cgagggg ua AGCAGC UUCAUGUUUGAA uguu
              ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| u
              gcucccc aU UCGUCG GAGUGCAAACuu guaa
gggguggaagauggaaggggu      c A  CG      g a
  
```

Secuencia de las bases: **CAGCAGCAAUUCAUGUUUGAA**

Se buscó de forma intencionada los sitios o blancos del miRNA-424 a través de las plataformas miRTarBase, TargetScan y Diana-TarBase.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Se identificaron los distintos mRNA blancos potenciales para la interacción con miRNA-424, y posteriormente se seleccionaron los que estuvieran asociados a procesos oncológicos y particularmente con CEE (Tabla 15).

Tabla 15. Blancos más frecuentes descritos en CEE y en otras neoplasias		
	Gene blancos	Target Gene (Identificador)
Vías de señalización en cáncer epitelial de endometrio de KEGG.	<i>ccnd1</i>	595
	<i>map2k1</i>	5604
Sitios de unión asociados al cáncer epitelial de endometrio.	<i>ccnd3</i>	896
	<i>ccne1</i>	898
	<i>cdc25a</i>	993
	<i>cdk6</i>	1021
	<i>cdx2</i>	1045
	<i>chek1</i>	1111
	<i>e2f6</i>	1876
	<i>fasn</i>	2194
	<i>fgf2</i>	2247
	<i>fgfr1</i>	2260
	<i>hif1a</i>	3091
	<i>smad3</i>	4088
	<i>smad7</i>	4092
	<i>myb</i>	4602
	<i>siah1</i>	6477
	<i>tgfbr3</i>	7049
	<i>wee1</i>	7465
	<i>pias1</i>	8554
<i>socs2</i>	8835	
<i>kdm5b</i>	10765	
Sitios de unión descritos en otras neoplasias.	<i>itpr1</i>	3708
	<i>nfia</i>	4774
	<i>plag1</i>	5324
	<i>ptch1</i>	5727
	<i>spi1</i>	6688
	<i>cul2</i>	8453
	<i>cdc14a</i>	8556
	<i>socs6</i>	9306
	<i>kif23</i>	9493
	<i>atf6</i>	22926
	<i>anln</i>	54443
Sitio de unión no descrito en neoplasias	<i>ccnf</i>	899

Se encontraron varias vías de señalización de procesos patológicos y fisiológicos asociadas con el miRNA-424, de las cuales se escogió la hsa05213, relacionada con el CEE. A través de la plataforma DIANA-miRPATH y OncomiR se identificaron los sitios de unión del miRNA-424 y su interacción en las vías de señalización para CEE propuestas por la KEGG.^{107,108} Entre los distintos sitios de unión de la vía de señalización, se identificó que el miRNA-424 tenía interacción con MAP2K1 (también MEK1) y CCND1 (marcado con rojo en Figura 27). El miRNA-424 tiene sitios de unión para suprimir la transcripción de MAP2K1 (también MEK1) y CCND1; y estos genes están descritos en las vías de señalización asociadas en el CEE en las librerías de KEGG y de GO.

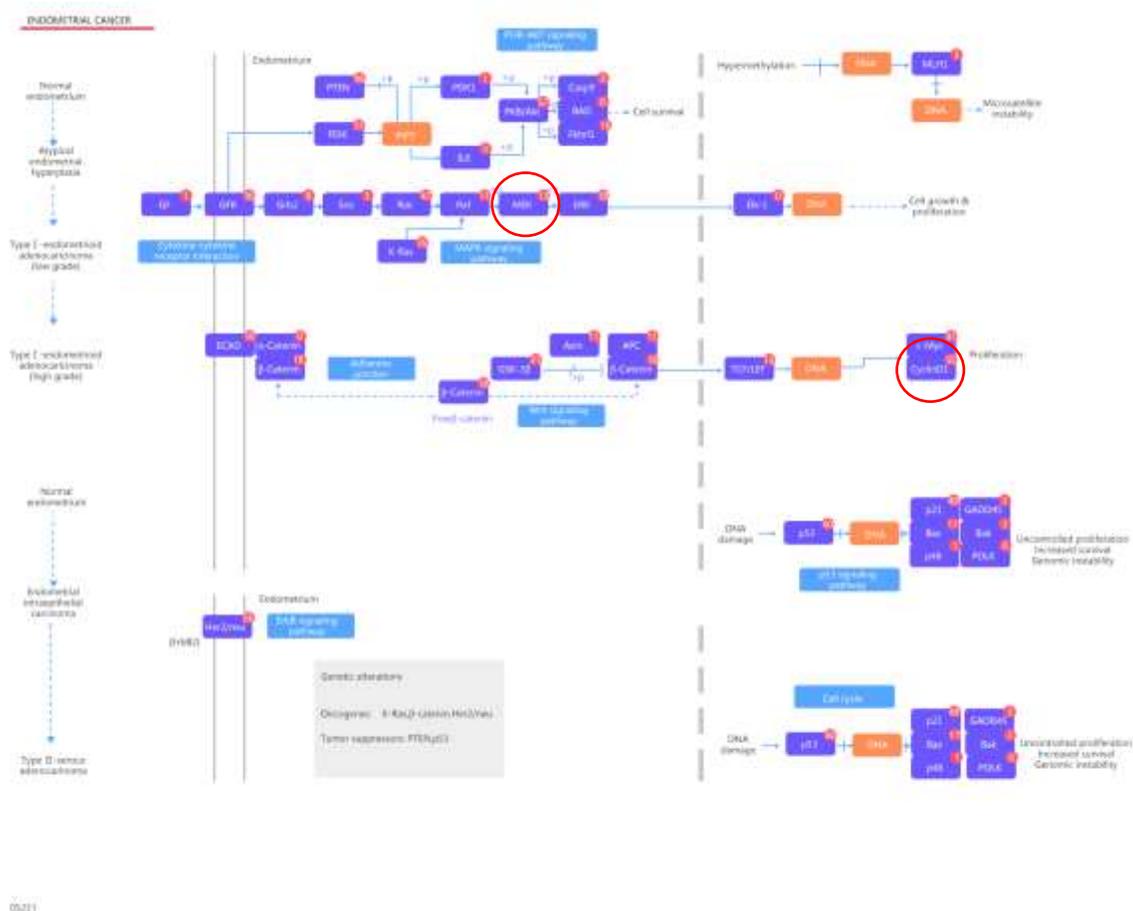


Figura 27. Vía de señalización de CEE de la librería KEGG. En rojo se señala los sitios de unión de los mRNAs del miRNA-424. Las proteínas afectadas serían *MAP2K1* y *CCND1*.

9. Discusión

En el presente estudio, se cumplió el objetivo de identificar un perfil de expresión particular de miRNA para cada una de las histologías del CEE. Estos perfiles de expresión identificados se han relacionado con múltiples neoplasias, y algunos de los miRNAs específicos se asocian en procesos oncológicos del CEE.

Para el CEE tipo endometrioide G1-2 los miRNAs seleccionados para el perfil fueron el miRNA-455-5p, el miRNA-379-5p y el miRNA-542-5p. El miRNA-455-5p está identificado en el cromosoma 9, y existen 256 posibles sitios de unión a miRNA. Este no se ha reportado en CEE pero si en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. Adicionalmente se ha descrito de la vía de señalización de Notch en relación con la proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis y que tiene una relación en cáncer de mama, linfomas y cáncer de colon.⁹⁹ Por otro lado, miRNA-379-5p se ha descrito en el cromosoma 14, el cual tiene 120 posibles sitios de unión a miRNA; no se ha descrito en CEE pero si en carcinoma hepatocelular y cáncer de pulmón de células pequeñas y en vías de VPH, señalización de erb-B y VEGF, así como en la vía de señalización de PI3K-Akt. Por último, el miRNA-542-5p se transcribe del cromosoma X, con al menos 1047 posibles sitios de unión a miRNA. Este miRNA si se ha descrito en CEE particularmente en la señalización de PI3K-Akt y GFR/EGFR.^{100,101}

Para el CEE tipo endometrioide G3 los miRNAs seleccionados para el perfil fueron el miRNA-187-5p, el miRNA-582-5p y el miRNA-675-5p. El miRNA-187-5p está reportado en el cromosoma 18 y tiene aproximadamente 3241 posibles sitios de unión. No reportado en CEE, pero si se ha reportado en estereoidogénesis del ovario y en cáncer cervicouterino (PI3K/AKI). El miRNA-582-5p se transcribe a partir del cromosoma 5 y presenta 626 posibles sitios de unión. Se ha reportado en CEE en las vías de señalización de PKB/Akt y caspasa 9; sobre todo en CEE G1-G2. Por último, el miRNA-675-5p está ubicado en el cromosoma 11 con al menos 1342 posibles sitios de unión a iRNA. Este miRNA si se ha reporta en CEE tipo endometrioide G3, posiblemente en vías de señalización en P53 y en el ciclo celular.¹⁰²

Para el CEE de tipo células claras los miRNAs seleccionados para el perfil fueron el miRNA-99a-5p, el miRNA-100-5p y el miRNA-133a-5p. El miRNA-99a-5p está ubicado en el cromosoma 21, reportando 59 posibles sitios de unión a mRNA. No se ha reportado en CEE y mucho menos en carcinoma de células claras, pero si en cáncer epitelial de ovario, particularmente en las vías de señalización de P53 y algunas vías de señalización en el proceso de malignización de las células. El miRNA-100-5p está reportado en el cromosoma 11 con 47 sitios de unión. Este miRNA si se ha reportado en CEE en la vía de señalización de PKB/Akt así como en vías de señalización como p53, apoptosis y las vías de mTOR. El miRNA 133a-5p está reportado en el cromosoma 18 con 496 posibles sitios de unión a miRNA. Se ha reportado en CEE en la vía de señalización de GFR(EFGR), así como en otras vías de señalización como PI3K-Akt y en mTOR.¹⁰²

En el CEE de tipo seroso papilar los miRNAs seleccionados para el perfil fueron el miRNA-129-5p, el miRNA-1961-5p y el miRNA-485-5p. El miRNA-129-1 (o también miRNA-129-5p) está ubicado en el cromosoma 7, existen 732 sitios de unión a mRNA. Se ha reportado en CEE afectando vías de PDK1, ECAD, APC y ERK. EN otras neoplasias se ha descrito en vías de señalización de p53 en CDK4/6 y en OGF, así como en PI3K-AKT en GF, ECM, PDK1, S6, CDK y ERK. Por último, se ha descrito en vías de apoptosis del ciclo celular. El miRNA 196a-1 está ubicado en el cromosoma 17, y tiene 364 sitios de unión. Se ha reportado en CEE afectando p21 así como en las vías de señalización de P53, y se ha descrito en vías de señalización de PI3K-AKT en p21, p27, p27kip1. El miRNA-485-5p está ubicado en el cromosoma 14, tiene 440 sitios de unión a mRNA. No se ha reportado en CEE, pero si en múltiples neoplasias como hígado y pulmón. Se ha reportado en vía de AMPK y mTOR.

Por último, en el CEE de tipo carcinosarcoma los miRNAs seleccionados para el perfil fueron el miRNA-139-5p, el miRNA-143 y el miRNA 424. El miRNA-139-5p está ubicado en el cromosoma 11 y tiene al menos 820 sitios de unión. Se ha reportado en CEE en vías de PI3K-AKT y en RAS. Así mismo, se ha descrito en muchas neoplasias malignas afectando las vías de señalización de apoptosis, mTOR, PI3K-Akt. El miRNA-143 está ubicado en el cromosoma 5, y tiene 487 sitios de unión a mRNA. Se ha descrito en CEE en vías de Pkb/Akt, en RAS, RAF y KRAS, así como en otras vías de señalización de apoptosis, PI3K-Akt, P53 y mTOR. Por último, el miRNA-424 está ubicado en el cromosoma X, reportando 1349 sitios de unión a mRNA. Se ha descrito en CEE en vías de CCDN1 y MAP. Por último, se ha reportado en otras vías de señalización como VEGF, P53, PI3K-Akt y en E2F6 Este último miRNA es el que tuvo una validación independiente, por lo que se describirá y analizarán sus particularidades.

Vías de señalización y sitios de unión para el miRNA-424 para carcinosarcoma

Existe mucha evidencia que asocia el miRNA-424 en diferentes tipos de patologías como es en resistencia a la insulina, psoriasis o alteraciones en el esperma entre otras. Sin embargo, el miRNA-424 se ha asociado en múltiples neoplasias malignas y en su relación con el diagnóstico, tratamiento y pronóstico.

Se ha visto la sobreexpresión o subexpresión del miRNA-424 puede afectar la función de distintos oncogenes o de genes supresores de tumor. Así mismo, la expresión de miRNA-424 puede verse afectado por otros RNA no codificantes. Adicionalmente, se ha evidenciado que el miRNA-424 está involucrado en proliferación, diferenciación, apoptosis, invasión, angiogénesis y resistencia a fármacos, y juega un papel importante en el tumor génesis y progresión de neoplasias regulando la expresión génica a nivel postranscripción. Por último, hay evidencia que ha demostrado que modificar la expresión de miRNA-424 pudiera regular ciertos genes diana que también se puede alterar la función celular.¹⁰³

Se encontraron varias vías de señalización de procesos patológicos y fisiológicos asociadas con el miRNA-424 y que se describieron en el mapa de señalización hsa05213, relacionada con el CEE.^{107,108} Entre los distintos sitios de unión de la vía de señalización, se identificó que el miRNA-424 tenía interacción con MAP2K1 (también MEK1) y CCND1. El miRNA-424 tiene sitios de unión para suprimir la transcripción de MAP2K1 (también MEK1) y CCND1; y estos genes están descritos en las vías de señalización asociadas en el CEE en las librerías de KEGG y de GO.^{107,108}

La MAP quinasa quinasa específica dual 1 (MAP2K1) es una quinasa que actúa regulando señales extracelulares de transducción medidas por p38 y está relacionada con diversos procesos celulares como proliferación celular, diferenciación, regulación en transducción y desarrollo a través de la fosforilación de residuos de tirosina y treonina con la activación de quinasa MAP.¹⁰⁹ En un estudio en donde se evaluó el papel de MAP2K1 en CEE se encontró que la inhibición de Kras a través de la inhibición de MAP2K1 daba como resultado activación de la señalización de los receptores de estrógeno y esto se relacionaba con la malignización de células endometriales.¹¹⁰

El gen CCND1 codifica para la ciclina D1 que es una proteína que actúa en el ciclo celular, específicamente en G1/S.¹¹¹ Su función es actuar como subunidad reguladora del complejo Cdk4 o Cdk6 en la transición de G1 a S en el ciclo celular. Así mismo interactúa con la proteína de Rb.¹¹¹ La expresión de la proteína ciclina D1 se ha asociado de forma significativa en la formación de CEE, sobre todo en pacientes con antecedente de neoplasia intraepitelial. En un estudio de 193 pacientes con alteraciones en CCND1 se encontró que un mayor grado, histologías de peor pronóstico y mostraron una expresión media de CCND1 más alta en comparación con los CEE de mejor pronóstico. Además, las pacientes presentaban con mayor frecuencia la permeación linfovascular ($p=0.006$), mayor invasión miometrial ($p<0.001$) y mayor probabilidad de afección ganglionar ($p<0.001$) tuvieron una expresión en mayor proporción de CCND1.¹¹² Alteraciones en la expresión de la proteína del ciclina D1 (CCND1) se ha relacionado con el CEE (sensibilidad del 71% una especificidad del 84% y AUC del 0.82 $p<0.001$), inclusive con una asociación con metástasis a ganglios linfáticos cuando hay una sobre expresión de CCND1 (sensibilidad 54.2%, especificidad del 75%, AUC 0.674; $p=0.003$).¹¹³

Por otro lado, el miRNA-424 se ha asociado también con alteraciones en la expresión de E2F6 y en el crecimiento de las células de CEE. En un estudio que se evaluó el estado de miRNA-424 en tejidos de CEE se encontró asociación con la etapa, el grado de diferenciación, la probabilidad de afección a ganglios y su capacidad de migración. Se describió que el E2F6 sería un posible objetivo de miRNA-424 y que E2F6 regulaba negativamente la expresión de miR-424.¹¹⁴ En otra revisión de la relación de CEE y el miRNA-424 se encontró que el miRNA-424 puede inhibir la proliferación celular al evitar la traducción de E2F7, aumentar la apoptosis celular y provocar la detención del ciclo celular. Otro estudio encontró que miR-424 puede inhibir la invasión celular al inhibir MMSET, así como también inhibir la migración celular mediante la regulación negativa de

DCLK1. miR-424 también puede apuntar al receptor de estrógeno –1 acoplado a proteína G (GPER-1), que a su vez afecta la vía de señalización PI3K/AKT para regular la proliferación celular.¹⁰³

El miRNA-424 que tuvo la validación con la cohorte independiente ha sido explorado ampliamente con varios sitios de unión y que ofrecen un potencial terapéutico. En un estudio con líneas celulares de CEE se evaluó que voxalisib en combinación con pimasetib podían inhibir las vías de MAP2K1 y PI3/MAPK.¹¹⁵ Otro potencial blanco terapéutico del miRNA-424 es asociado a la desregulación de FGFR1 como es el caso del futibatinib, un inhibidor irreversible de FGFR1-4, demuestra una actividad antitumoral selectiva y potente contra líneas celulares cancerosas desreguladas por FGFR y modelos de xenoinjerto, lo que respalda la evaluación clínica en pacientes con tumores impulsados por FGFR.¹¹⁶

Aspectos clínicos de los pacientes con CEE

Por último, se evaluaron los factores clínicos asociados corroborando que el subtipo histológico es un factor que afecta la supervivencia global. Así mismo, los subtipos de mal pronóstico, sobre todo el carcinoma seroso papilar y el carcinosarcoma, son los que presentan un peor pronóstico. Esto es acorde a lo reportado en la literatura, en un estudio realizado con 163 pacientes con cáncer epitelial de endometrio con subtipos histológicos de mal pronóstico, la supervivencia libre de progresión a 2 años fue peor en los casos de carcinosarcoma (79.4%), seguida de los casos células claras (87.2%), carcinoma endometriode grado 3 (92.2%) y carcinoma seroso papilar (95.5%), encontrando una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.015$). En cuanto a la supervivencia global a 2 años se encontró menor en los casos de células claras (70.0%), seguida de carcinosarcoma (76.7%), carcinoma seroso papilar (86.7%) y el tipo endometriode grado 3 (87.9%); sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.071$).⁵⁰ También hay que recalcar que estos subtipos histológicos de mal pronóstico se asocian a una presentación más avanzada.

Según los resultados, el subtipo carcinosarcoma ha sido el que se ha presentado de una forma más agresiva, observando una mayor proporción de etapas avanzada, reflejado en una mayor cantidad de pacientes con afección parametrial, afección a serosa y un mayor tamaño tumoral en comparación con otros subtipos. Así mismo, se identificó que estos son factores se asocian a una peor supervivencia global y libre de enfermedad. Y también, en el análisis de supervivencia, se encontró que esta era el subtipo histológico con peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

En el estudio de Zhang et al. en donde comparó 44 pacientes con carcinosarcomas, 118 tipo endometriode grado 3, 118 carcinomas seroso papilares y 48 células claras, encontró que los carcinosarcomas uterinos tuvieron resultados significativamente peores (supervivencia general, supervivencia específica de la enfermedad y supervivencia libre de recurrencia) en comparación con endometrioides grado 3, los carcinomas seroso papilares y células claras ($P < 0.001$), mientras que los otros 3 compartieron resultados similares. El tipo de

carcinosarcoma fue un factor independiente, incluso estratificado por etapa. Ochenta y tres por ciento de los pacientes con carcinosarcoma recurrieron en 1 año. En comparación con los carcinomas serosos papilares y los carcinomas de células claras, los pacientes con carcinosarcoma tuvieron mayor afección del estroma cervical ($P = 0.046$).¹¹⁷ En otro estudio, el análisis multivariado en 127 mujeres sugirió que tanto la enfermedad en estadio III-IV (HR 3.8 IC 95% 2.1-7.0; $p < 0.00001$) como el subtipo histológico carcinosarcoma (HR 3.2 IC 95% 1.7-5.9; $p < 0.003$) fueron los más asociados a un peor pronóstico. En el análisis de casos limitados a etapas I y II, 24/28 (86%) endometrioides grado 3, 18/24 (75%) no endometrioides y 11/25 (44%) carcinosarcomas sobrevivieron, lo que sugiere un peor resultado para el endometrio carcinosarcoma en comparación con los otros subtipos ($p < 0.008$).¹¹⁸

Un factor que se ha asociado a la supervivencia libre de enfermedad de forma importante es la presencia de permeación linfovascular (HR 4.34, IC 95% 1.28-14.68), y esta se presenta en mayor proporción en las histologías carcinoma seroso papilar (77.78%) y carcinosarcoma (60%). Esto ha sido descrito por en un estudio de más de 4,000 pacientes en donde la presencia de permeación linfovascular se presentaba más frecuentemente en las histologías no endometrioides (34% versus 17%) y se asociaba a una peor supervivencia libre de progresión.¹¹⁹

La afección ganglionar siempre se ha considera como un factor de mal pronóstico, en estos resultados se encontró que la afección a ganglios pélvicos se encontrar con mayor proporción en pacientes con carcinoma seroso papilar (41.18%). También se encontró que la afección ganglionar influye en la supervivencia libre de enfermedad (HR 6.74 IC 95% 1.61-28.22). En el estudio de Kumar se describió que los subtipos histológicos no endometrioides tenían un 34% de afección ganglionar pélvica en comparación el 12% del endometrioides.¹²⁰

10. Conclusiones

Se describió un perfil de expresión de miRNAs para cada una de las histologías de CEE. Cada miRNA descrito en los perfiles de expresión se mencionan en mayor o menor proporción en vías de señalización involucradas en diferentes procesos oncológicos, y algunos de ellos particularmente en el CEE. En la validación independiente, el miRNA-424 estuvo subexpresado en pacientes con carcinosarcoma, el cual está descrito en un gran número de estudios sobre alteraciones ginecológicas y en la regulación del comportamiento biológico de los tumores malignos en la expresión de genes diana. El miRNA-424 puede convertirse en un marcador importante para el diagnóstico y pronóstico de estos tumores, además de tener el potencial terapéutico.¹²¹ El subtipo histológico de carcinosarcoma en el cáncer epitelial de endometrio es un factor de mal pronóstico tanto para la supervivencia global como para el periodo libre de enfermedad.

Fortalezas y limitantes

Entre las fortalezas del estudio, se descubrió un perfil específico para cada histología del CEE incluyendo las histologías de mal pronóstico. Así mismo, se validó el miRNA-424 en la histología carcinosarcoma por primera vez, el cual ya se había descrito previamente en CEE de tipo endometriode. Por último, es el primer estudio que en población mexicana que evalúa perfiles de miRNAs en CEE y sus distintas histologías. Esto ofrece biomarcadores y blancos terapéuticos potenciales para que en un futuro puedan ser manejados.

Entre las limitantes del estudio, no fue posible realizar la validación para cada uno de los perfiles de miRNAs con una segunda técnica debido a que no se contaban con suficientes muestras congeladas en el periodo de recolección debido a que son histologías poco frecuentes. En cuanto a las histologías CEE de tipo endometriode G1-2 y para endometriode G3, la validación no fue posible debido a falta de recursos para completarla. Sin embargo, esta validación se realizará posteriormente. Por último, es importante recalcar que no fue posible realizar una evaluación de supervivencias debido al seguimiento corto que dificulta la obtención de eventos (recurrencia y muerte) necesarios para tener un análisis pronóstico más exacto; el subtipo histológico de células claras no se ha comportado como lo reportado en la literatura, ya que las pacientes no han tenido recurrencias ni han fallecidos, viéndose reflejado en las curvas de supervivencia; y por último, se han obtenido pocas muestras de histologías de mal pronóstico como células claras.

11. Referencias

1. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet*. 2005;366:491-505. doi:10.1016/S0140-6736(05)67063-8
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
3. Hernandez E. ACOG Practice Bulletin number 65: management of endometrial cancer. *Obstet Gynecol*. 2006;107:952; author reply 952-953. doi:10.1097/01.AOG.0000209465.55688.30
4. Creasman W. Carcinoma of the corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003.
5. Network NCC. NCCN Guidelines Uterine Neoplasms. 2014;2.2014.
6. Kwon JS, Mazgani M, Miller DM, et al. The significance of surgical staging in intermediate-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2011;122:50-54. doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.037
7. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2013;62(1):111-123. doi:10.1111/his.12053
8. Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, et al. MicroRNA and endometrial cancer: Roles of small RNAs in human tumors and clinical applications (Review). *Oncol Lett*. 2010;1(6):935-940. doi:10.3892/ol.2010.173
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
10. Boyle P, Levin B. World CanCer report 2008. *Cancer Control*. 2008;199:512. doi:10.1016/j.cma.2010.02.010
11. Smith RA, Andrews KS, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2019. doi:10.3322/caac.21557
12. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*.; 2011. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/.
13. Sorosky JI. Endometrial cancer. *Obstet Gynecol*. 2012. doi:10.1097/AOG.0b013e3182605bf1
14. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 1991;68:2293-2302.
15. Egner JR. AJCC Cancer Staging Manual. *JAMA J Am Med Assoc*. 2010;304:1726. doi:10.1001/jama.2010.1525
16. Lewin SN. Revised FIGO staging system for endometrial cancer. *Clin Obstet Gynecol*. 2011;54:215-218. doi:10.1097/GRF.0b013e3182185baa
17. Cramer DW. The Epidemiology of Endometrial and Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26:1-12. doi:10.1016/j.hoc.2011.10.009

-
18. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. In: *The Lancet*. ; 2016. doi:10.1016/S0140-6736(15)00130-0
 19. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis. *Int J Gynecol Pathol*. 2019. doi:10.1097/pgp.0000000000000518
 20. McKenney JK, Longacre TA. Low-grade endometrial adenocarcinoma: a diagnostic algorithm for distinguishing atypical endometrial hyperplasia and other benign (and malignant) mimics. *Adv Anat Pathol*. 2009;16:1-22. doi:10.1097/PAP.0b013e3181919e15
 21. McCluggage WG. My approach to the interpretation of endometrial biopsies and curettings. *J Clin Pathol*. 2006;59:801-812. doi:10.1136/jcp.2005.029702
 22. Lee JH, Dubinsky T, Andreotti RF, et al. ACR appropriateness Criteria® pretreatment evaluation and follow-up of endometrial cancer of the uterus. *Ultrasound Q*. 2011;27:139-145. doi:10.1097/RUQ.0b013e31821c7dba
 23. Leitao MM, Kehoe S, Barakat RR, et al. Comparison of D&C and office endometrial biopsy accuracy in patients with FIGO grade 1 endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2009;113:105-108. doi:10.1016/j.ygyno.2008.12.017
 24. Kitajima K, Suzuki K, Senda M, et al. Preoperative nodal staging of uterine cancer: Is contrast-enhanced PET/CT more accurate than non-enhanced PET/CT or enhanced CT alone? *Ann Nucl Med*. 2011;25:511-519. doi:10.1007/s12149-011-0496-9
 25. Hwang JH, Lee NW, Lee KW, Lee JK. Magnetic resonance imaging for assessment of deep endometrial invasion for patients with endometrial carcinoma: Original Article. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2009;49:537-541. doi:10.1111/j.1479-828X.2009.01059.x
 26. Page BR, Pappas L, Cooke EW, Gaffney DK. Does the FIGO 2009 Endometrial Cancer Staging System More Accurately Correlate With Clinical Outcome in Different Histologies? *Int J Gynecol Cancer*. 2012;22:593-598. doi:10.1097/IGC.0b013e3182412ebd
 27. Lewin SN, Herzog TJ, Barrena Medel NI, et al. Comparative performance of the 2009 international Federation of gynecology and obstetrics' staging system for uterine corpus cancer. *Obstet Gynecol*. 2010;116:1141-1149. doi:10.1097/AOG.0b013e3182167973
 28. Cooke EW, Pappas L, Gaffney DK. Does the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system for endometrial cancer lead to increased discrimination in patient outcomes? *Cancer*. 2011;117:4231-4237. doi:10.1002/cncr.26030
 29. *AJCC Cancer Staging Manual*.; 2017. doi:10.1007/978-3-319-40618-3
 30. Einstein MH, Rice LW. Current surgical management of endometrial cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26:79-91. doi:10.1016/j.hoc.2011.10.005
 31. Coon D, Beriwal S, Heron DE, et al. High-Dose-Rate Rotte "Y" Applicator Brachytherapy for Definitive Treatment of Medically Inoperable Endometrial Cancer: 10-Year Results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;71:779-783. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.10.026
 32. Niazi TM, Souhami L, Portelance L, Bahoric B, Gilbert L, Stanimir G. Long-term

-
- results of high-dose-rate brachytherapy in the primary treatment of medically inoperable stage I-II endometrial carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;63:1108-1113. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.04.036
33. Fishman DA, Roberts KB, Chambers JT, Kohorn EI, Schwartz PE, Chambers SK. Radiation therapy as exclusive treatment for medically inoperable patients with stage I and II endometrioid carcinoma with endometrium. *Gynecol Oncol*. 1996;61:189-196.
 34. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, et al. *Randomized Phase III Trial of Whole-Abdominal Irradiation versus Doxorubicin and Cisplatin Chemotherapy in Advanced Endometrial Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study*. Vol 24.; 2006. doi:10.1200/JCO.2004.00.7617
 35. Dellinger TH, Monk BJ. Systemic therapy for recurrent endometrial cancer: a review of North American trials. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9:905-916. doi:10.1586/era.09.54
 36. Moxley KM, McMeekin DS. Endometrial carcinoma: a review of chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents. *Oncologist*. 2010;15:1026-1033. doi:10.1634/theoncologist.2010-0087
 37. Creutzberg CL, van Putten WLJ, Koper PC, et al. *Survival after Relapse in Patients with Endometrial Cancer: Results from a Randomized Trial*. Vol 89.; 2003. doi:10.1016/S0090-8258(03)00126-4
 38. Lin LL, Grigsby PW, Powell MA, Mutch DG. Definitive radiotherapy in the management of isolated vaginal recurrences of endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;63:500-504. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.02.004
 39. Jhingran A, Burke TW, Eifel PJ. Definitive radiotherapy for patients with isolated vaginal recurrence of endometrial carcinoma after hysterectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;56:1366-1372. doi:10.1016/S0360-3016(03)00414-0
 40. Colombo EGWG. Endometrial cancer: ESMO Guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22(Suppl 6):vi35-9.
 41. Wright JD, Barrena Medel NI, Sehouli J, Fujiwara K, Herzog TJ. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet*. 2012;379:1352-1360. doi:10.1016/S0140-6736(12)60442-5
 42. Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, et al. Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: A systematic review of Cochrane collaboration. *Ann Oncol*. 2007;18:409-420. doi:10.1093/annonc/mdl417
 43. Ray M, Fleming G. Management of Advanced-Stage and Recurrent Endometrial Cancer. *Semin Oncol*. 2009;36:145-154. doi:10.1053/j.seminoncol.2008.12.006
 44. Chino JP, Jones E, Berchuck A, Secord AA, Havrilesky LJ. The influence of radiation modality and lymph node dissection on survival in early-stage endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82:1872-1879. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.03.054
 45. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a gynecologic oncology group study. *Cancer*. 1991. doi:10.1002/1097-0142(19911115)68:10<2293::AID-CNCR2820681032>3.0.CO;2-V
-

-
46. Briët JM, Hollema H, Reesink N, et al. Lymphovascular space involvement: An independent prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005. doi:10.1016/j.ygyno.2004.11.033
 47. Eltabbakh GH, Moore AD. Survival of women with surgical stage II endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 1999. doi:10.1006/gyno.1999.5454
 48. Partridge EE, Shingleton HM, Menck HR. The national cancer data base report on endometrial cancer. *J Surg Oncol.* 1996. doi:10.1002/(SICI)1096-9098(199602)61:2<111::AID-JSO5>3.0.CO;2-F
 49. Travaglino A, Raffone A, Stradella C, et al. Impact of endometrial carcinoma histotype on the prognostic value of the TCGA molecular subgroups. *Arch Gynecol Obstet.* 2020. doi:10.1007/s00404-020-05542-1
 50. Prueksaritanond N, Chantape W. Comparative survival outcomes of uterine papillary serous carcinoma, clear cell carcinoma, grade 3 endometrioid adenocarcinoma, and carcinosarcoma of endometrial cancer in Rajavithi hospital. *J Med Assoc Thail.* 2016.
 51. Acharya S, Hensley ML, Montag AC, Fleming GF. Rare uterine cancers. *Lancet Oncol.* 2005. doi:10.1016/S1470-2045(05)70463-0
 52. Abeler VM, Kjørstad KE. Clear cell carcinoma of the endometrium: A histopathological and clinical study of 97 cases. *Gynecol Oncol.* 1990. doi:10.1016/0090-8258(90)90279-T
 53. Carcangiu ML, Chambers JT. Early pathologic stage clear cell carcinoma and uterine papillary serous carcinoma of the endometrium: Comparison of clinicopathologic features and survival. *Int J Gynecol Pathol.* 1995. doi:10.1097/00004347-199501000-00006
 54. Creasman WT, Kohler MF, Odicino F, Maisonneuve P, Boyle P. Prognosis of papillary serous, clear cell, and grade 3 stage I carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol.* 2004. doi:10.1016/j.ygyno.2004.08.019
 55. Pekin T, Yildizhan B, Eren F, Pekin O, Yildizhan R. Adenocarcinoma, adenoacanthoma, and mixed adenosquamous carcinoma of the endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001.
 56. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466:835-840. doi:10.1038/nature09267
 57. Lee J-W, Choi CH, Choi J-J, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2535-2542. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1231
 58. Wu M, Liu L, Chan C. Identification of novel targets for breast cancer by exploring gene switches on a genome scale. *BMC Genomics.* 2011;12:547. doi:10.1186/1471-2164-12-547
 59. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116:281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
 60. Pedroza-Torres A, López-Urrutia E, García-Castillo V, et al. MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance. *Molecules.* 2014;19:6263-6281. doi:10.3390/molecules19056263

-
61. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019. doi:10.1002/jcp.27486
 62. Hwang H-W, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2006;94:776-780. doi:10.1038/sj.bjc.6603023
 63. Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon L, et al. Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Curr Med Chem.* 2012;19:2406-2413. doi:10.2174/092986712800269362
 64. Budak H, Bulut R, Kantar M, Alptekin B. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Brief Funct Genomics.* 2016. doi:10.1093/bfgp/elv026
 65. Hussain MU. Micro-RNAs (miRNAs): Genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res.* 2012. doi:10.1007/s00441-012-1438-0
 66. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
 67. Lujambio A, Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: A new role for microRNAs. *Cell Cycle.* 2009. doi:10.4161/cc.8.3.7526
 68. Davis-Dusenbery BN, Hata A. MicroRNA in cancer: The involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways. *Genes and Cancer.* 2010. doi:10.1177/1947601910396213
 69. De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. *Anal Chim Acta.* 2011;699:134-152. doi:10.1016/j.aca.2011.05.025
 70. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods.* 2010;50:244-249. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.026
 71. Liu C-G, Calin GA, Volinia S, Croce CM. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc.* 2008;3:563-578. doi:10.1038/nprot.2008.14
 72. Sempere LF, Preis M, Yezefski T, et al. Fluorescence-based codetection with protein markers reveals distinct cellular compartments for altered MicroRNA expression in solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2010;16:4246-4255. doi:10.1158/1538-7445.AM10-LB-360
 73. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13:358-369. doi:10.1038/nrg3198
 74. Berindan-Neagoe I, Monroing P del C, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome Genome: A treasure for Cancer Diagnosis and Therapy. *Ca Cancer J Clin.* 2014;00(00):00.
 75. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:857-866. doi:10.1038/nrc1997
 76. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008;14:1271-1277. doi:10.1038/nm.1880
 77. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
 78. Liu X, Zhang Z, Sun L, et al. MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and

-
- tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis*. 2011;32:1798-1805. doi:10.1093/carcin/bgr213
79. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:293-302. doi:10.1038/nrc2619
80. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2999-3004. doi:10.1073/pnas.0307323101
81. Lee TS, Jeon HW, Kim YB, Kim YA, Kim MA, Kang SB. Aberrant microRNA expression in endometrial carcinoma using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *PLoS One*. 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0081421
82. Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2009;18(1):50-55. doi:10.1097/CEJ.0b013e328305a07a
83. Jurcevic S, Olsson B, Klinga-Levan K. MicroRNA expression in human endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):88. doi:10.1186/s12935-014-0088-6
84. Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P. Diagnostic and prognostic significance in miRNAs signatures in tissues and plasma of endometrial carcinoma. *Int J Cancer*. 2013;132:1633-1645.
85. Ratner ES, Tuck D, Richter C, et al. MicroRNA signatures differentiate uterine cancer tumor subtypes. *Gynecol Oncol*. 2010;118(3):251-257. doi:10.1016/j.ygyno.2010.05.010
86. Canlorbe G, Wang Z, Laas E, et al. Identification of microRNA expression profile related to lymph node status in women with early-stage grade 1-2 endometrial cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(4):391-401. doi:10.1038/modpathol.2016.30
87. Zhai H, Karaayvaz M, Dong P, Sakuragi N, Ju J. Prognostic significance of miR-194 in endometrial cancer. *Biomark Res*. 2013. doi:10.1186/2050-7771-1-12
88. Dong P, Kaneuchi M, Watari H, et al. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer*. 2011. doi:10.1186/1476-4598-10-99
89. Dong P, Karaayvaz M, Jia N, et al. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*. 2013. doi:10.1038/onc.2012.334
90. Dong P, Kaneuchi M, Konno Y, Watari H, Sudo S, Sakuragi N. Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer. *Biomed Res Int*. 2013. doi:10.1155/2013/130362
91. Illumina. TruSeq RNA Sample Preparation v2 Guide. *Illumina*. 2015. doi:10.1016/j.canlet.2015.06.003
92. Campbell JD, Liu G, Luo L, et al. Assessment of microRNA differential expression and detection in multiplexed small RNA sequencing data. *RNA*. 2015. doi:10.1261/rna.046060.114
93. Andrés-León E, Núñez-Torres R, Rojas AM. miARma-Seq: A comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci Rep*. 2016. doi:10.1038/srep25749
94. Hu Y, Lan W, Miller D. Next-generation sequencing for microRNA expression

-
- profile. *Methods Mol Biol.* 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7046-9_12
95. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
 96. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon: fast and bias-aware quantification of transcript expression using dual-phase inference. *Nat Methods.* 2017. doi:10.1038/NMETH.4197
 97. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
 98. Brown JAL, Bourke E. Practical bioinformatics analysis of MiRNA data using online tools. In: *Methods in Molecular Biology.* ; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-6524-3_18
 99. Zhang Y, Wang T, Wu S, et al. Notch signaling pathway: a new target for neuropathic pain therapy. *J Headache Pain.* 2023;24(1):87. doi:10.1186/s10194-023-01616-y
 100. Jurcevic S, Olsson B, Klinga-Levan K. MicroRNA expression in human endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* 2014;14(1):88. doi:10.1186/s12935-014-0088-6
 101. Zhao Y-N, Chen G-S, Hong S-J. Circulating MicroRNAs in gynecological malignancies: from detection to prediction. *Exp Hematol Oncol.* 2014;3:14. doi:10.1186/2162-3619-3-14
 102. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2007;36(Database):D154-D158. doi:10.1093/nar/gkm952
 103. Li S, Wu Y, Zhang J, Sun H, Wang X. Role of miRNA-424 in Cancers. *Onco Targets Ther.* 2020;13:9611-9622. doi:10.2147/OTT.S266541
 104. Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, et al. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):D222-D229. doi:10.1093/nar/gkr1161
 105. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4. doi:10.7554/eLife.05005
 106. Hsu S-D, Lin F-M, Wu W-Y, et al. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA–target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(suppl_1):D163-D169. doi:10.1093/nar/gkq1107
 107. Backes C, Kehl T, Stöckel D, et al. miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D90-D96. doi:10.1093/nar/gkw926
 108. Wong NW, Chen Y, Chen S, Wang X. OncomiR : an online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. Valencia A, ed. *Bioinformatics.* 2018;34(4):713-715. doi:10.1093/bioinformatics/btx627
 109. Frémin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2010;3:8. doi:10.1186/1756-8722-3-8
 110. Ring KL, Yates MS, Schmandt R, et al. Endometrial Cancers With Activating KRas Mutations Have Activated Estrogen Signaling and Paradoxical Response to MEK

-
- Inhibition. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(5):854-862. doi:10.1097/IGC.0000000000000960
111. Siegert JL, Rushton JJ, Sellers WR, Kaelin WG, Robbins PD. Cyclin D1 suppresses retinoblastoma protein-mediated inhibition of TAFII250 kinase activity. *Oncogene*. 2000;19(50):5703-5711. doi:10.1038/sj.onc.1203966
 112. Yildirim HT, Nergiz D, Sadullahoglu C, et al. The extent of cyclin D1 expression in endometrial pathologies and relevance of cyclin D1 with the clinicopathological features of endometrioid endometrial carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2020;63(3):412-417. doi:10.4103/IJPM.IJPM_589_19
 113. Su Y, Zhou H, Ma Z, Liu J, Li C. CCND1-Induced Autophagy Contributes to Lymph Node Metastasis in Endometrial Cancer. *Horm Metab Res*. 2023;55(6):413-419. doi:10.1055/a-2044-9227
 114. Lu Z, Nian Z, Jingjing Z, Tao L, Quan L. MicroRNA-424/E2F6 feedback loop modulates cell invasion, migration and EMT in endometrial carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(69):114281-114291. doi:10.18632/oncotarget.23218
 115. Inaba K, Oda K, Ikeda Y, et al. Antitumor activity of a combination of dual PI3K/mTOR inhibitor SAR245409 and selective MEK1/2 inhibitor pimasertib in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2015;138(2):323-331. doi:10.1016/j.ygyno.2015.05.031
 116. Sootome H, Fujita H, Ito K, et al. Futibatinib Is a Novel Irreversible FGFR 1-4 Inhibitor That Shows Selective Antitumor Activity against FGFR-Deregulated Tumors. *Cancer Res*. 2020;80(22):4986-4997. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-2568
 117. Zhang C, Hu W, Jia N, et al. Uterine Carcinosarcoma and High-Risk Endometrial Carcinomas: A Clinicopathological Comparison. *Int J Gynecol Cancer*. 2015. doi:10.1097/igc.0000000000000350
 118. Amant F, Cadron I, Fuso L, et al. Endometrial carcinosarcomas have a different prognosis and pattern of spread compared to high-risk epithelial endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2005. doi:10.1016/j.ygyno.2005.04.027
 119. Ørtoft G, Lausten-Thomsen L, Høgdall C, Hansen ES, Dueholm M. Lymph-vascular space invasion (LVSI) as a strong and independent predictor for non-locoregional recurrences in endometrial cancer: A danish gynecological cancer group study. *J Gynecol Oncol*. 2019. doi:10.3802/jgo.2019.30.e84
 120. Kumar S, Podratz KC, Bakkum-Gamez JN, et al. Prospective assessment of the prevalence of pelvic, paraaortic and high paraaortic lymph node metastasis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2014. doi:10.1016/j.ygyno.2013.10.002
 121. Liu JF, Xiong N, Campos SM, et al. Phase II Study of the WEE1 Inhibitor Adavosertib in Recurrent Uterine Serous Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2021;39(14):1531-1539. doi:10.1200/JCO.20.03167

12. Anexos

Carta aprobación de Comité de Investigación y del Comité de Ética en Investigación del INCan



Ciudad de México, 11 de mayo 2023
REF/NCAN/CI/0367/2023

Dr. Salim Abraham Barquet-Muñoz
Investigador Principal
PRESENTE

Comunicamos a usted que, en la Novena Sesión Ordinaria del Comité de Investigación se presentó el Protocolo: "Distribución de la Clasificación Molecular del Cáncer de Endometrio en Pacientes Mexicanas", con número de aprobación: (023/028/OMI) (CEI/017/23) con los siguientes documentos:

1. Formato Único de Protocolo "Distribución de la Clasificación Molecular del Cáncer de Endometrio en Pacientes Mexicanas. Versión 3.0. En español. Fecha 02 de mayo del 2023

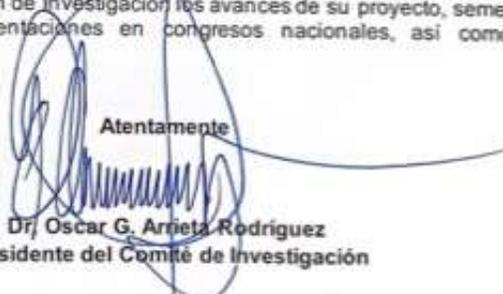
Los miembros del Comité de Investigación decidieron que los documentos antes mencionados cumplen con los aspectos de confirmación de la calidad técnica y mérito científico.

Así mismo los integrantes del Comité de Investigación decidieron:

APROBARLO

Esta aprobación tiene vigencia hasta el 11 de mayo de 2024, por lo que en caso necesario le solicitamos atentamente someter su renovación anual antes de esta fecha y así evitar la suspensión de su protocolo. Así mismo le comunicamos que al realizar este proyecto adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y a la Dirección de Investigación los avances de su proyecto, semestral y anualmente, las presentaciones en congresos nacionales, así como sus publicaciones.

Atentamente


Dr. Oscar G. Arrieta Rodríguez
Presidente del Comité de Investigación



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

NOVENA SESIÓN
ORDINARIA



INSTITUTO NACIONAL
DE CANCEROLOGÍA

Gestión 2022-2025
CONBIOETICA-09-CEI-002-20160
OHIP: IORG00061001IRB00007348

Ciudad de México, 11 Mayo del 2023

REF/INCAN/CEI/338/2023

Dr. Salim Abraham Barquet-Muñoz
Investigador Principal
PRESENTE

Comunicamos a usted que, en la Novena Sesión Ordinaria del Comité de Investigación se presentó el Protocolo **Distribución de la Clasificación Molecular del Cáncer de Endometrio en Pacientes Mexicanas, Versión 3.0. En español. Fecha 02 de mayo del 2023, (023/028/ICI/CEI/017/23)**

1. Formato Único de Protocolo "Distribución de la Clasificación Molecular del Cáncer de Endometrio en Pacientes Mexicanas. Versión 3.0. En español. Fecha 02 de mayo del 2023"
2. Dispensa de Consentimiento Informado

Le informamos que la documentación presentada cumple con todos los requisitos para la **APROBACIÓN**, con vigencia al **11 de mayo de 2024**. Le recordamos que en tanto no se cierre el protocolo es necesaria su renovación anualmente, así como comunicar al CEI de cualquier información derivada del estudio que deba ser notificada a los participantes. Se requiere informe de eventos adversos y enmiendas de manera semestral.

De acuerdo con los lineamientos de regulación interna, buenas prácticas clínicas y políticas de operación del Comité de Ética en Investigación del INCAN (Registro CONBIOETICA-09-CEI-002-20160413/Vigencia 1 de abril de 2022-1 abril de 2025), le reiteramos ningún integrante de los comités participa en este proyecto de investigación.

Atentamente

Dra. Marytère Herrera Martínez
Vocal Secretaria de Comité de Ética en Investigación

Av. San Fernando, No. 22, Cd. Cuauhtémoc, C.P. 06030, Ciudad de México
Tel: (52) 5629 2000 ext: 50000 o 50001



2023
Francisco
VILLA

Artículos publicados asociados al proyecto

Barquet-Muñoz SA, Cantú-de-León D, Bandala-Jacques A, González-Enciso A, Isla-Ortiz D, Prada Diddier, Herrera LA, Salcedo-Hernández RA. What is the impact of radical hysterectomy on endometrial cancer with cervical involvement? *World Journal of Surgical Oncology*. 2020;18(1):1-9.

Barquet-Muñoz et al. *World Journal of Surgical Oncology* (2020) 18:101
<https://doi.org/10.1186/s12957-020-01876-x>

World Journal of
Surgical Oncology

RESEARCH

Open Access

What is the impact of radical hysterectomy on endometrial cancer with cervical involvement?



Salim Abraham Barquet-Muñoz¹, David Cantú-de-León^{1,2,3}, Antonio Bandala-Jacques^{2,3}, Aarón González-Enciso⁴, David Isla-Ortiz¹, Diddier Prada^{2,3,5}, Luis A. Herrera^{2,3,6} and R. A. Salcedo-Hernández^{1*}

Abstract

Background: When endometrial carcinoma invades the cervical stroma, overall survival and disease-free survival decrease. However, it is still controversial whether patients in suspected stage II should be treated with radical hysterectomy. The goal of this study is to describe the role of radical hysterectomy in patients with endometrial carcinoma and cervical involvement.

Methods: This was a retrospective cohort study where a total of 239 patients with endometrial carcinoma with cervical involvement from Mexico City's National Cancer Institute were divided according to the type of hysterectomy, and the outcomes were compared using statistical analysis.

Results: The 5-year overall survival was 75.76% for the simple hysterectomy group and 89.19% for the radical hysterectomy group, without achieving statistical significance. The 5-year disease-free survival was 72.95% for the simple hysterectomy group and 64.31% for the radical hysterectomy group, without achieving statistical significance. Radicality was associated with longer surgical times, intraoperative complications, and bleeding over 500 ml.

Conclusions: In patients with endometrial carcinoma with cervical involvement, radical hysterectomy does not improve prognosis or alter adjuvant therapy.

Keywords: Endometrial neoplasms, Hysterectomy, Carcinoma, Endometrioid

Background

Endometrial carcinoma invades the cervical stroma in 5–10% of cases [1]. When there is exclusive cervical invasion, defined as International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage II, the 5-year overall survival decreases to 75%, compared to 88% for stage I [2]. It is still controversial whether patients in suspected stage II should be treated with radical hysterectomy [3, 4]. The goals of this surgical management are to obtain an optimal

cytoreduction and identify parametrial involvement, with the consequent change in clinical staging, prognosis, and need for adjuvancy [4]. It should be noted that radical hysterectomy carries a risk of complications that could delay adjuvancy [5]. Additionally, cervical involvement could be associated with other poor prognostic factors, such as lymphovascular invasion, unfavorable histologies, deep myometrial invasion, and ovarian and lymph node involvement [2, 6, 7]. This brings to question the therapeutic role of radical hysterectomy in patients with endometrial carcinoma with cervical involvement.

* Correspondence: rosasalher@gmail.com

¹Departamento de Ginecología, Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando 22, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Barquet-Muñoz SA, Pedroza-Torres A, Perez-Plasencia C, Montaña S, Gallardo-Alvarado L, Pérez-Montiel D, Herrera-Montalvo LA, Cantú-de León D. microRNA Profile Associated with Positive Lymph Node Metastasis in Early-Stage Cervical Cancer. *Curr Oncol.* 2022 Jan 8;29(1):243-254. doi: 10.3390/curroncol29010023. PMID: 35049697; PMCID: PMC8774324.

Article

microRNA Profile Associated with Positive Lymph Node Metastasis in Early-Stage Cervical Cancer

Salim Abraham Barquet-Muñoz ^{1,†}, Abraham Pedroza-Torres ^{2,†}, Carlos Perez-Plasencia ³, Sarita Montaña ⁴, Lenny Gallardo-Alvarado ⁵, Delia Pérez-Montiel ⁶, Luis Alonso Herrera-Montalvo ⁷ and David Cantú-de León ^{8,*}

- Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM, Mexico City 14080, Mexico; sbarquetm@incan.edu.mx
 - Cátedra CONACYT-Basic Research Division, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City 14080, Mexico; apedrozato@conacyt.mx
 - Genomics Laboratory, Basic Research Division, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City 14080, Mexico; carlos.pplas@unam.mx
 - Bioinformatics Laboratory, Biological Chemistry Sciences Department, Universidad Autónoma de Sinaloa (FCQB-UAS), Culiacan 80040, Mexico; mmontano@uas.edu.mx
 - Clinical Research Subdivision, Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City 14080, Mexico; lgallardo@incan.edu.mx
 - Department of Pathology, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City 14080, Mexico; mperez@incan.edu.mx
 - Cancer Biomedical Research Unit, Instituto Nacional de Cancerología and Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City 14080, Mexico; herreram@biomedicas.unam.mx
 - Division of Research, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando #22, Mexico City 14080, Mexico
- * Correspondence: dcantul@incan.edu.mx; Tel.: +52-55-5628-0400 (ext. 21016)
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Barquet-Muñoz, S.A.; Pedroza-Torres, A.; Perez-Plasencia, C.; Montaña, S.; Gallardo-Alvarado, L.; Pérez-Montiel, D.; Herrera-Montalvo, L.A.; Cantú-de León, D. microRNA Profile Associated with Positive Lymph Node Metastasis in Early-Stage Cervical Cancer. *Curr. Oncol.* **2022**, *29*, 243–254. <https://doi.org/10.3390/curroncol29010023>

Received: 26 August 2021
Accepted: 29 November 2021
Published: 8 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Lymph node metastasis (LNM) is an important prognostic factor in cervical cancer (CC). In early stages, the risk of LNM is approximately 3.7 to 21.7%, and the 5-year overall survival decreases from 80% to 53% when metastatic disease is identified in the lymph nodes. Few reports have analyzed the relationship between miRNA expression and the presence of LNM. The aim of this study was to identify a subset of miRNAs related to LNM in early-stage CC patients. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were collected from patients with early-stage CC treated by radical hysterectomy with lymphadenectomy. We analyzed samples from two groups of patients—one group with LNM and the other without LNM. Global miRNA expression was identified by microarray analysis, and cluster analysis was used to determine a subset of miRNAs associated with LNM. Microarray expression profiling identified a subset of 36 differentially expressed miRNAs in the two groups (fold change (FC) ≥ 1.5 and $p < 0.01$). We validated the expression of seven miRNAs; miR-487b, miR-29b-2-5p, and miR-195 were underexpressed, and miR-92b-5p, miR-483-5p, miR-4534, and miR-548ac were overexpressed according to the microarray experiments. This signature exhibited prognostic value for identifying early-stage CC patients with LNM. These findings may help detect LNM that cannot be observed in imaging studies.

Keywords: miRNAs; cervical carcinoma; lymph node metastasis

1. Introduction

Cervical carcinoma (CC) is one of the most common cancers in women from low-income and middle-income countries; in Mexico, CC is the second most common tumor and has a high mortality rate [1]. The most important factors affecting survival of patients with early-stage CC (International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage IA–IB1) are the clinical stage, tumor size, depth of tumor invasion into the stroma, lymphovascular space invasion (LVSI), and presence of lymph node metastasis (LNM). The