



**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA D1,  
BCL-2 Y KI-67 EN EL CÁNCER INVASOR DE  
CÉRVIX**

**CELIA CUENCA MARÍN**

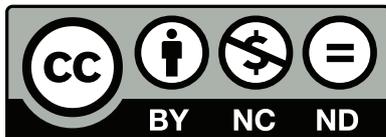
**MÁLAGA 2013**



**SPICUM**  
servicio de publicaciones

AUTOR: Celia Cuenca Marín

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:  
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar,  
transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de  
la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



**Departamento de Histología y  
Anatomía Patológica de la  
Universidad de Málaga**

**Prof. Dra. Martina Álvarez Pérez**, Prof. Asociado del Dpto. de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

**Prof. Dr. Luis Vicioso Recio**, Prof. Titular del Dpto. de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

**CERTIFICAN:** Que D<sup>a</sup> Celia Cuenca Marín, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulada: “Estudio de la expresión de Cyclina D1, Bcl-2 y Ki-67 en el cáncer invasor de cérvix”.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes expide el presente en Málaga, a 19 de Marzo de 2013.

Prof. Dra. Martina Álvarez Pérez

Prof. Dr. Luis Vicioso Recio

**A mis padres**

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, requiere de la participación y colaboración de personas sin las cuáles este proyecto no hubiese sido posible. A todas ellas, que invirtieron su tiempo y sus conocimientos, y me ayudaron en este largo y difícil camino quiero agradecerles su apoyo.

Para empezar agradecer a la Dra. Martina Álvarez Pérez, como tutora y directora de la tesis, la ayuda prestada para conseguir finalizar el proyecto que empezamos juntas, así como al Dr. Luis Vicioso Recio, también director de tesis, por la participación de ambos en el análisis de los biomarcadores, en cuya ardua tarea les ha ayudado el Dr. Daniel Prieto Cuadra. Al Dr. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, y a otros miembros del Departamento, por brindarme la oportunidad de poder desarrollar mi trabajo con ellos. Y a otros profesionales del Departamento, como Maria José Lozano León, por su trabajo en la realización de la técnica inmunohistoquímica y sobre todo por el apoyo y el ánimo durante estos años.

Agradecer al Dr. Ernesto González Mesa y al Dr. José Herrera Peral, que han sido fundamentales para mi formación tanto clínica, como en el campo de la investigación. Han estado siempre a mi lado, animándome y prestándome su ayuda para que el proyecto comenzado hace años llegara a su fin.

Al Dr. Andrés Carlos López Díaz por los consejos, el apoyo y el ánimo brindado para finalizar la Tesis Doctoral. Sin el gran interés mostrado y toda la ayuda que he recibido por su parte no hubiese sido posible.

Nombrar al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Carlos Haya y agradecerle el que nos haya facilitado el material de estudio, especialmente al Dr. Sergio Ranea, al cuál le doy las gracias por el tiempo dedicado y la ayuda prestada desinteresadamente para que pudiera llevar a cabo el proyecto planteado.

Agradecer a la Sección de Oncología del Hospital Materno Infantil de Málaga representada por su Jefe de Sección, el Dr. Carlos Martínez Martínez, ya que gracias al trabajo que ellos realizan cada día yo he obtenido el material para el estudio. Y especialmente dedicárselo a todas aquellas pacientes que son el motor de nuestro esfuerzo e ilusión para este estudio.

Gracias a todos los compañeros que me han acompañado durante todos estos años, ofreciéndome su ayuda y apoyo, como el Dr. Isaac Cohen Corcia o la Dra. Marta Martínez Díez. Así como todos aquellos que han intervenido en mi formación.

A mis amigos que han comprendido mis momentos de ausencia y me han prestado un gran apoyo moral y afectivo.

Este último lugar lo he querido reservar para mi familia, para manifestarles mi cariño y agradecimiento.

A mis hermanos, especialmente a Belén, por todo el tiempo robado y que me ha dedicado para ayudarme con este proyecto.

A mi marido por la gran ayuda prestada, la paciencia, el ánimo y la compañía.

Y muy especialmente a mis padres, que habéis compartido conmigo todo el esfuerzo que conlleva la elaboración de la Tesis, porque en gran parte gracias a vosotros hoy veo alcanzada esta meta, ya que siempre estuvisteis a mi lado impulsándome en los momentos más difíciles y todo ello es lo que me ha hecho llegar al final. Este trabajo es también vuestro. Es tanto el cariño y la ayuda recibida continuamente por vuestra parte que no tengo palabras para expresar todo lo que os quiero.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

**A todos, Gracias**

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. CÁNCER DE CÉRVIX	2
1.1 Epidemiología del cáncer de cérvix	2
1.2 Factores predisponentes y etiología	7
1.2.1 Genoma viral	10
1.2.2 Patogénesis y ciclo viral	11
1.3 Historia natural del cáncer de cérvix: lesiones escamosas preinvasoras	14
1.3.1 Carcinogénesis cervical	19
1.4 Anatomía patológica y tipos histológicos	22
1.5 Clínica	28
1.6 Diagnóstico	29
1.6.1 Estadificación del cáncer de cérvix	29
1.7 Tratamiento	42
1.7.1 Planificación del tratamiento	42
1.7.2 Tratamiento según estadio cáncer de cérvix	43
1.7.3 Biopsia selectiva Ganglio Centinela	54
1.8 Factores pronósticos	56

2. BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CÁNCER DE CÉRVIX	60
2.1 Oncogenes	61
2.2 Genes de supresión tumoral	62
2.3 Ciclo celular y oncogenes	63
2.4 Apoptosis	71
2.5 Proliferación celular	84
3. VACUNACIÓN PROFILÁTICA	87
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA</b>	<b>90</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>93</b>
1. Muestra de pacientes y marco del estudio	94
2. Diagnóstico	95
3. Datos Clínico-patológicos	97
4. Estudios Biomolecular para detección del ADN del VPH por PCR	99
5. Estudio de expresión inmunohistoquímica de ciclina D1, bcl-2 y Ki-67	102
6. Análisis Estadístico	106
6.1 Estudio descriptivo	106
6.2 Estudio analítico o inferencial	106
6.3 Estudio de la Supervivencia	107
7. Aspectos éticos y Protección de datos	108

<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>109</b>
1. Estudio descriptivo: Datos Clínico-Patológicos	110
2. Estudio de la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos en función del tipo histológico, grado de diferenciación y estadio	125
3. Análisis de correlación entre los diferentes marcadores moleculares	135
4. Estudio de supervivencia	137
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>145</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>160</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>163</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

AgNOR: Marcador tisular. Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares coloreadas con plata.

AJCC: American Joint Committee on Cáncer (Comisión Conjunta Estadounidense para el Cáncer)

Apaf-1: Factor activador de proteasa proapoptótico

Bcl-2: B-cell lymphoma 2 (gen del linfoma de célula B)

BH: dominios de homología Bcl-2

BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela

CDK: Cinasas Dependientes de Ciclinas

CIN: Neoplasia Intraepitelial Cérvix

CIS: Carcinoma in Situ

CNE: Centro Nacional de Epidemiología

EBA: Exploración bajo anestesia

FADD: factor associated death domain (factor comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular)

FDA: Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos o Agencia de Drogas y Alimentos de Estados Unidos)

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics (Federación Internacional Ginecología y Obstetricia)

GOG: Gynecologic Oncology Group

HMI: Hospital Materno Infantil

HSIL: Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado

IARC: Agencia Internacional de Investigación en Cáncer

Ki-67: Antígeno asociado a proliferación celular

LSIL: Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado

NCI: Instituto Nacional del Cáncer

OMS: Organización Mundial de la Salud

P53: Proteína supresora tumores p53

PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: Reacción en cadena polimerasa

PET: Tomografía por emisión de positrones (siglas en inglés Positron Emission Tomography)

pRb: proteína del retinoblastoma

QMT: Quimioterapia concomitante

RAIDD: receptor associated interleukine death domain

Rb: Gen supresor tumoral del retinoblastoma

RDT: Radioterapia radical

RM: Resonancia Magnética

SEGO: Sociedad Española Ginecología y Obstetricia

TAC: Tomografía axial computarizada

TEE: Tasas de incidencia estandarizada por edad

TNF: factor de necrosis tumoral

TRADD: TNF receptor associated death domain

TRAF: TNF receptor associated factor

UGC: Unidad de Gestión Clínica

UIV: Urografía intravenosa

VIH: Virus Inmunodeficiencia Humana

VLP: Virus like particles

VPH: Virus del Papiloma Humano

WM: Intervención Wherteim-Meigs

## **I. INTRODUCCIÓN**

---

---

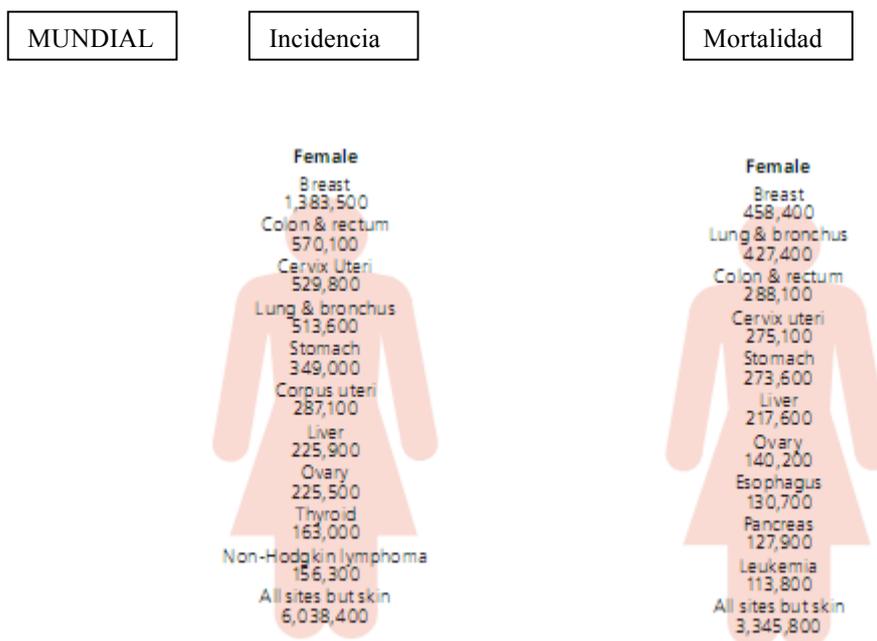
# 1. CÁNCER DE CÉRVIX

## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE CÉRVIX

El cáncer de cérvix es el tercero en frecuencia de todos los cánceres de la mujer, aunque más del 85% de la carga mundial se produce en países subdesarrollados. Al estandarizar por la edad el cáncer de cérvix pasaría a ser el segundo en frecuencia, por detrás del cáncer colorrectal que pasa a tercera posición.

Cada año se diagnostican en todo el mundo unos 530.000 de nuevos casos de cáncer de cuello de útero.

En los países menos desarrollados ocupa el segundo lugar en frecuencia tras el cáncer de mama, mientras que es el décimo en los países desarrollados tras el cáncer de mama, colorectal, pulmón, endometrio, gástrico, ovario, linfomas no hodking, melanoma y páncreas (fig. 1)<sup>1,2</sup>.



SUBDESARROLLADO

DESARROLLADO

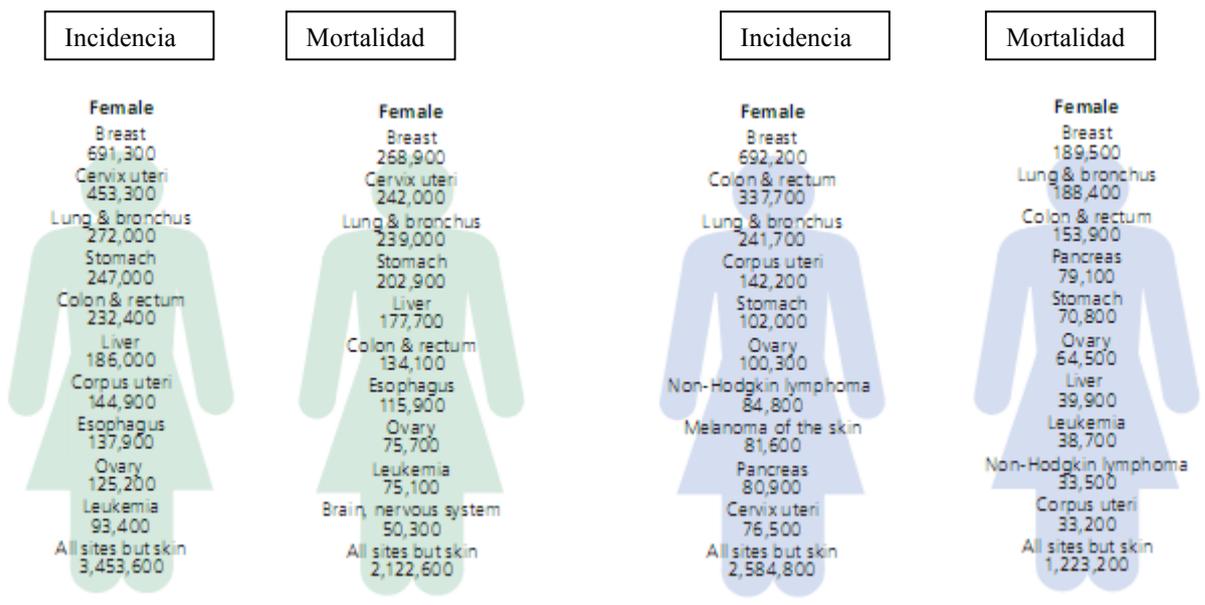


Figura 1: Número estimado (miles) de nuevos casos de cáncer de cérvix (incidencia) y defunciones (mortalidad) en mujeres a nivel mundial, en países desarrollados y subdesarrollados durante 2008. (Fuente: Globocan 2008<sup>1</sup>).

Las tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino varían entre las regiones del mundo (fig. 2): las tasas más altas están en las regiones del Este Africano, específicamente en Zimbabwe y Uganda con tasas de incidencia estandarizada por edad (TEE) de 47.3 y 45.8 casos por 100000 mujeres respectivamente; y en América Latina, donde la ciudad de Trujillo en Perú reporta el nivel más alto en el continente (43.9 por 100000); mientras que las tasas de incidencia más bajas se han encontrado en Israel y en Egipto (2.4 y 2.1 por 100000)<sup>3,4</sup>.

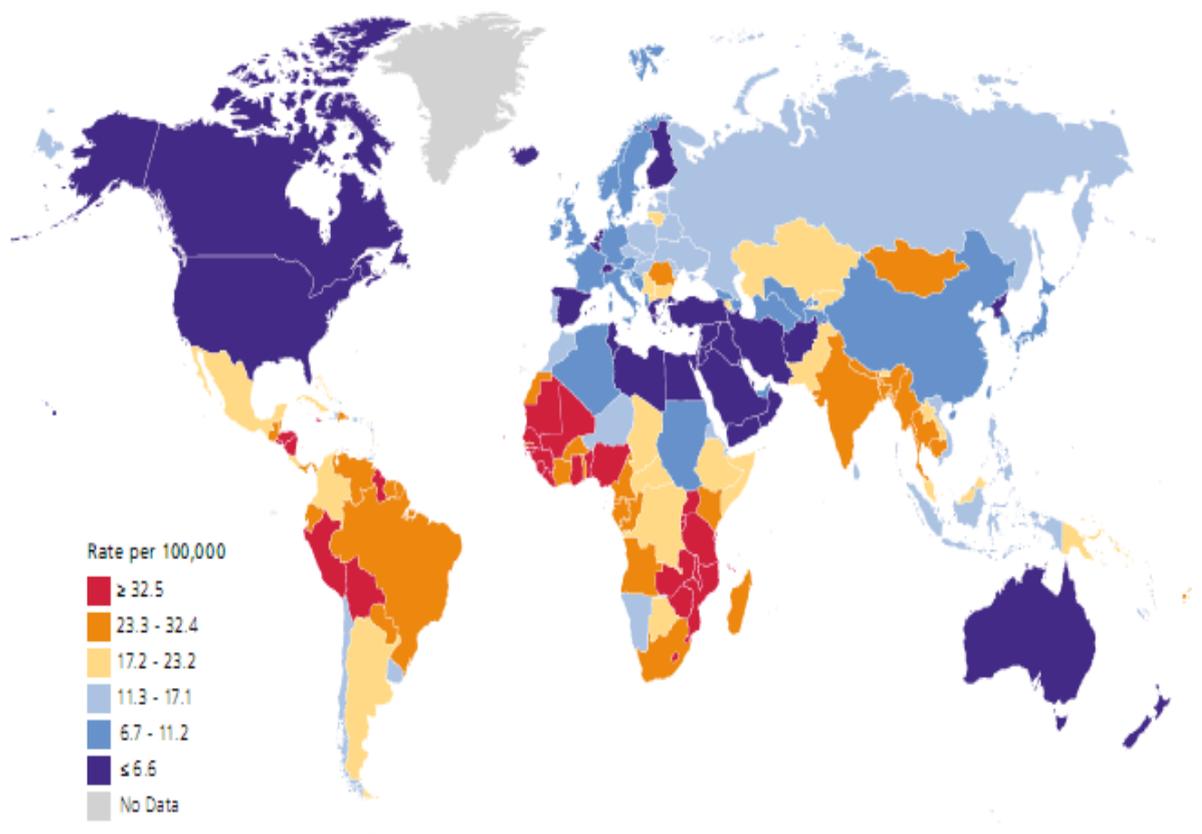


Figura 2. Tasas de incidencia cáncer cérvix ajustadas por edad. (Fuente: Globocan 2008 <sup>5</sup>).

En España los tumores genitales representan alrededor del 16% de los cánceres de la mujer. Y dentro de los mismos, el orden de frecuencia coloca en primer lugar al cáncer de endometrio (6.7%), en series actuales es seguido del cáncer de ovario (4.7%) y del cáncer de cérvix (4.5%).

La incidencia del cáncer de cuello uterino en España se halla en el segmento bajo europeo, con una tasa poblacional media de 7.6 por 100000 mujeres/año (fig. 3), según los datos comunicados por los registros de Cáncer Españoles a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>6,7</sup>. La tasa más alta ha sido comunicada por el registro de Asturias (11,5x100000 mujeres /año; tasa ajustada por edad: 7.1x100000 mujeres/año)

y la más baja por el de Zaragoza ( $6.5 \times 100000$  mujeres/año; tasa ajustada por edad:  $4.1 \times 100000$  mujeres/año).

En Andalucía, sólo se dispone del Registro de Granada, que ha comunicado a partir de datos obtenidos en el periodo comprendido entre 1998 y 2002 una incidencia de  $8.1 \times 100000$  mujeres año (tasa ajustada por edad:  $6,0 \times 100000$  mujeres/año).

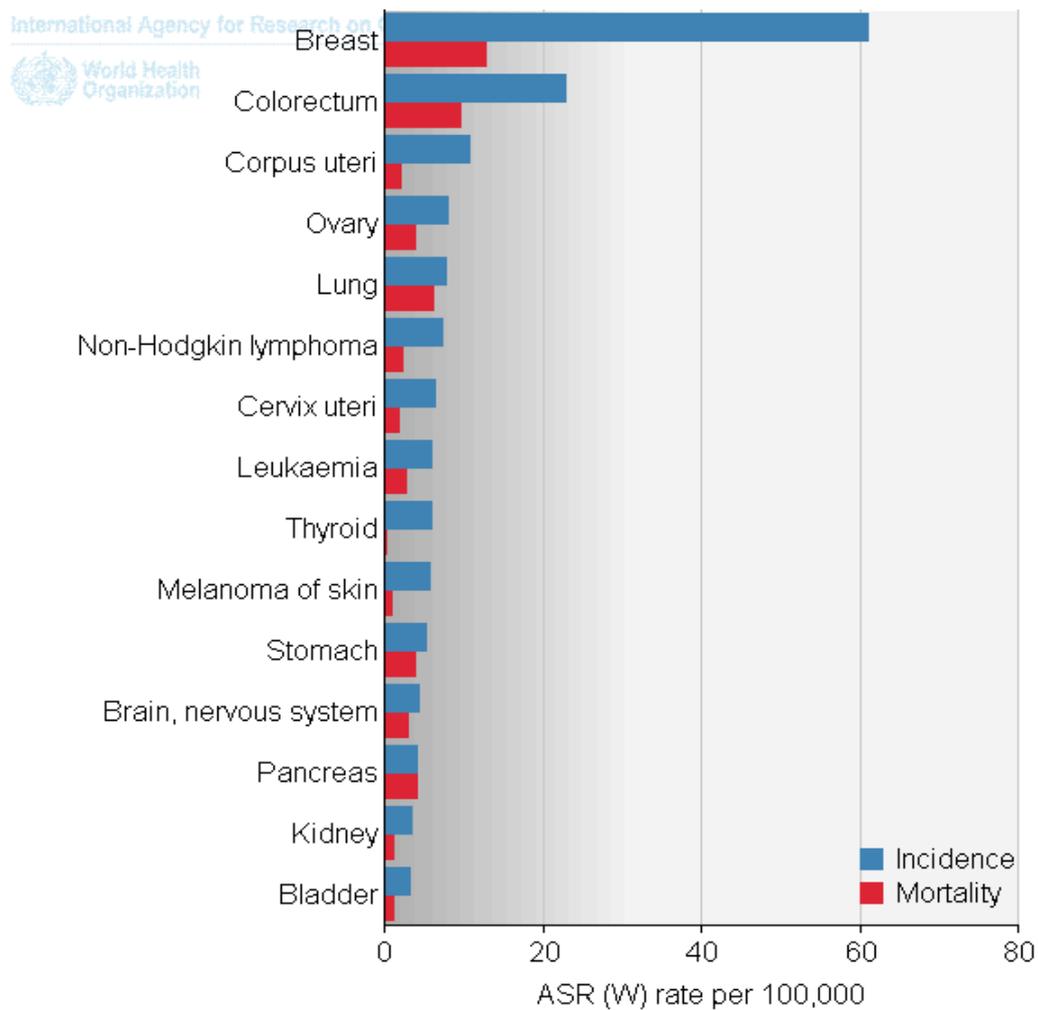


Figura 3: Estimación de tasas estandarizada por edad de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix en España <sup>5</sup>.

El cáncer de cérvix fue la cuarta causa principal de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo en 2008 y casi el 90% de las muertes por cáncer de cuello ocurrió en países en vías de desarrollo.

En España, las tasas de mortalidad por cáncer ajustadas a población europea han sido publicadas por el Centro Nacional de Epidemiología (C.N.E) en el proyecto Ariadna<sup>8,9</sup>. Los últimos datos corresponden al año 2007 y la tasa de mortalidad fue de 2.13 x 100000 mujeres.

La mortalidad por cáncer de cuello uterino ajustada a la población Europea en las provincias andaluzas es la siguiente<sup>10</sup>:

Granada 0,97/100000 mujeres

Córdoba: 1, 13/100000 mujeres

Cádiz: 1,70/100000 mujeres

Sevilla: 1,70/100000 mujeres

Málaga: 1,76/100000 mujeres

Almería: 2,04/100000 mujeres

Jaén: 2,71/100000 mujeres

Huelva: 4,49/100000 mujeres

En los países desarrollados ha disminuido de manera importante la incidencia del cáncer de cuello gracias a la citología y a los métodos de diagnóstico precoz en general, pero al mismo tiempo se observa un incremento, o al menos mantenimiento, de los casos de neoplasia intraepitelial (CIN) y carcinoma in situ (CIS) en pacientes cada vez más jóvenes, aunque la mayor incidencia se registra a los 40-50 años.

## 1.2 FACTORES PREDISPONENTES Y ETIOLOGÍA

Respecto a la etiología actualmente es bien conocido el virus del papiloma humano (VPH) como el agente etiológico principal del cáncer de cérvix. Así pues, sabemos que el cáncer de cérvix es, en la inmensa mayoría de los casos, una enfermedad de transmisión sexual y que el agente etiológico, o al menos el cofactor más importante, es el VPH<sup>11,12</sup>. Mediante técnicas moleculares altamente sensibles el ADN del VPH se puede detectar en más del 93% de los cánceres cérvicouterinos, ya sean preinvasivos o invasivos, y ya se trate de carcinomas escamosos o de adenocarcinomas<sup>13</sup>.

Para que se desarrolle el cáncer invasor en el cuello uterino es necesario que actúen factores adicionales a la infección por VPH de alto riesgo<sup>14</sup>, por lo que se dice que el VPH es una causa necesaria pero insuficiente para desarrollar la neoplasia invasora<sup>15,16</sup>.

Los factores predisponentes o cofactores más relevantes son los enumerados a continuación (tabla 1):

- *El comportamiento sexual*: el comienzo precoz de las relaciones sexuales y la promiscuidad tanto de la mujer como la de sus compañeros son dos factores de riesgo importantes.
- *Factores dependientes del virus*: tipo viral, los tipos más oncogénicos son el VPH 16 y 18, así como la persistencia de la infección en exámenes repetidos.
- *Coinfecciones*: el virus herpes simple tipo II como reflejo de la promiscuidad sexual también hay que considerarlo<sup>17</sup>. La *Chlamydia trachomatis* parece ser un cofactor que actúa por inducción de inflamación crónica y metabolitos mutagénicos<sup>18,19,20</sup>. La infección por VIH se asocia tanto a una mayor prevalencia del VPH como a la

progresión de las infecciones por VPH hasta lesiones neoplásicas del cuello del útero y del canal anal<sup>21</sup>. En diversos estudios se detectó que en mujeres VIH positivas el riesgo de infección por VPH de alto y bajo riesgo sería de entre 1.8 y 2.7 veces superior con una persistencia de 1.9 veces mayor<sup>22</sup>.

- *La inmunosupresión.* La mayoría de las lesiones regresan espontáneamente pero un 5-10% son portadoras crónicas. Un pequeño número pasa a lesiones de alto grado y de estas un porcentaje a cáncer. Las lesiones persistentes son las susceptibles de llegar a cáncer. Todo esto depende del estado inmunitario de la paciente<sup>23</sup>.
- *El tabaco.* Además de la acción de sinergismo entre el VPH y el cigarrillo en la neoplasia cervical, los carcinógenos químicos relacionados con el cigarrillo podrían ejercer un efecto mitogénico directo sobre el ADN causándole daño. Por otro lado, la exposición al tabaco podría afectar la respuesta inmune local efectiva ante la infección viral ya que disminuye el número de células de Langerhans.
- *La multiparidad* ha sido consistentemente hallada en estudios de casos-controles asociadas a carcinoma cervical in situ e invasor. Las pacientes que han tenido más de 3 hijos podrían tener un mayor riesgo de desarrollar CIS en comparación con las mujeres nulíparas o con menos de 2 hijos<sup>24</sup>. Esto quizás se debe a la influencia de hormonas endógenas durante la gestación y al trauma cervical que ocasiona cada parto, así como a que la zona de transformación está expuesta durante mucho más tiempo al exocérvix. A todo ello se aúna la paridad a edades muy tempranas, el estado nutricional de la paciente y el estatus de la inmunidad.
- Otro factor sugerido en investigación es el *uso de anticonceptivos hormonales*, su utilización prolongada puede resultar un factor favorecedor de la persistencia de la infección por VPH y también, de la progresión de la infección a neoplasia (riesgo aumentado de displasia, de carcinoma epidermoide y especialmente de

adenocarcinoma). En el estudio realizado por Moreno et al<sup>25</sup> (2002) se muestra que el riesgo de cáncer cervical para mujeres con menos de 5 años de toma de la píldora es de 0.73, pero ascendió a 2.82 tras la toma entre 5 y 10 años, y a 4.03 para más de 10 años, y ese riesgo aumentado para carcinoma in situ e invasor tras 5 años de píldora ocurrió en los diferentes países analizados. El riesgo tiende a desaparecer en los 5 años siguientes a la interrupción del consumo. Estos hallazgos, sumados al efecto residual de la paridad observado en algunos estudios, sugieren que el ambiente hormonal podría modular la evolución de la infección viral<sup>26</sup>.

- *Conducta sexual de la población.* El contagio por el virus se produce piel a piel. Los lugares más susceptibles de invasión viral son aquellos donde se producen procesos de rápida replicación y diferenciación celular, como la zona de transformación escamocolumnar del cérvix (más activa aún en mujeres jóvenes) y la línea pectínea anal, desarrollando displasias y neoplasias en estas localizaciones. El preservativo, se ha comprobado que es un factor protector, pero no de forma total, para el contagio y adquisición de lesiones precursoras<sup>27</sup>. Parece que la circuncisión masculina también es un factor protector<sup>28</sup>.

Tabla 1: Cofactores más estudiados en relación al desarrollo de cáncer de cuello uterino. (Fuente: Morelva Toro de Méndez, 2006).

<b>EXÓGENOS</b>	actividad sexual (inicio precoz de la actividad sexual, promiscuidad, HIV y otras infecciones genitales), uso de anticonceptivos orales (ACO), tabaco, dieta.
<b>VIRALES</b>	genotipo de HPV, variantes de HPV, carga viral, persistencia, integración del HPV e infección múltiple.
<b>DEL HUÉSPED</b>	edad, gestación y paridad, trauma cervical, factores genéticos, inmunidad.

### 1.2.1 GENOMA VIRAL

Hay más de 100 subtipos de VPH, pero no todos infectan el tracto genital inferior. A su vez se subdividen en grupos de alto y bajo riesgo oncogénico. Entre los de alto riesgo cabe destacar los tipos VPH-16 y 18 que son los más comunes asociados al cáncer cervical, estando presentes en más del 80% de los casos. Los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 se consideran tipos de alto riesgo, y los tipos 26, 53 y 66 como probablemente carcinógenos<sup>29</sup>. Los tipos de bajo riesgo pueden causar displasias o condiloma en el tracto genital inferior, pero raramente producen cáncer, incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81<sup>30</sup>.

En la actualidad, la categorización del VPH permite valorar qué pacientes portan tipos de VPH de bajo riesgo o de alto riesgo, lo que resulta clínicamente útil en el tratamiento de pacientes con anomalías citológicas de bajo grado<sup>31</sup>.

El genoma viral consta de una doble cadena de ADN de 8000 pares de bases y contiene un máximo de 8 genes, 2 de los cuales son los que codifican las proteínas estructurales o late-proteins L1 y L2. La partícula viral L1 se dispone en pentámeros, en cuyo centro se acopla L2. Los otros 6 genes codifican proteínas no estructurales o early-proteins E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Cada nuevo tipo de VPH puede considerarse como tal, si su secuencia en la región L1 del genoma difiere en más de un 10% de un tipo de VPH previamente descrito (fig. 4).

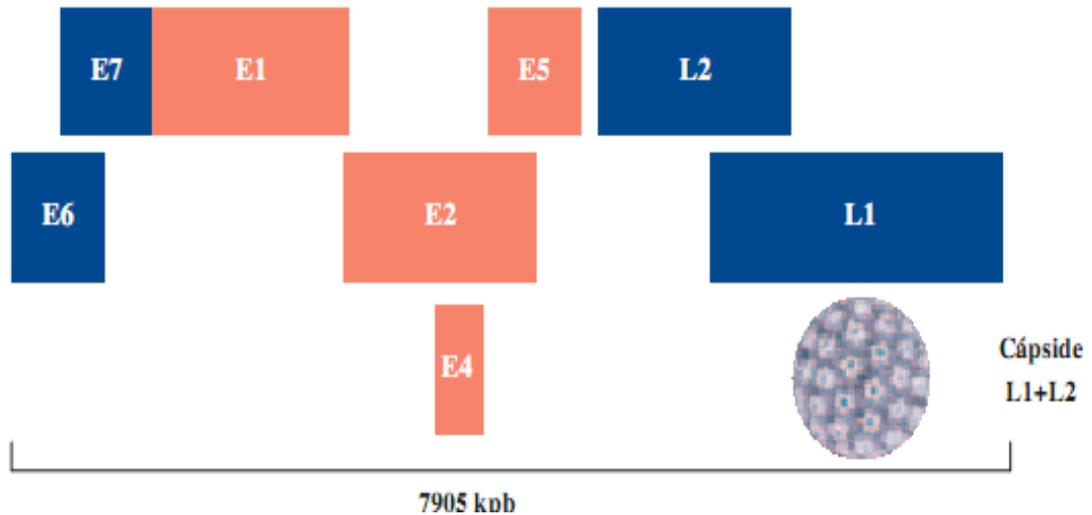


Figura 4. Genoma del VPH. Los genes E “early” están implicados en la replicación viral (E1 y E2), control transcripcional de la expresión genética (E2), regulación del ciclo celular (E6, E7 y E4) y evasión de la respuesta inmune (E5). Los genes L “late” codifican las proteínas de la cápside viral: L1 es la mayor que se autoensambla configurando pentámeros, y L2 es la menor que se dispone en el centro de dichos pentámeros. (Fuente: Stanley MA<sup>32</sup>).

### 1.2.2 PATOGÉNESIS Y CICLO VIRAL

Cuando se produce una erosión o microtrauma en la capa superficial de los epitelios diana, se facilita que el virus pueda penetrar en las células de la capa basal, donde amplifica su genoma, expresando las proteínas E1, E2, E6 y E7<sup>33</sup>. En las capas intermedias, vemos que tanto células como virus se replican en tandem, sin haber amplificación de las copias del virus y con poca expresión de los genes anteriores. En las capas superiores, donde el epitelio es diferenciado, el virus se amplifica sin replicación celular, llegando haber 1000 copias del genoma viral por célula. En este momento, comienzan a expresarse los genes de las proteínas estructurales (L1 y L2), así como de la proteína E4, produciéndose el ensamblaje de la cápside del virus.

El mecanismo oncogénico mejor conocido por el que actúa el VPH es el que se produce a partir de la síntesis de las oncoproteínas E6 y E7<sup>34</sup>, que se ligan a las proteínas producidas por los genes supresores p53 y Rb respectivamente, degradándolas e inutilizándolas funcionalmente<sup>35</sup>. Esta interacción en un epitelio inestable como es el de la unión escamocolumnar, conduce a una inestabilidad genómica, aumentando la probabilidad de producir mutaciones específicas<sup>36</sup>.

Los virus de bajo riesgo permanecen en el núcleo de la célula infectada en situación latente, mientras que los de alto riesgo ejercen su actividad oncogénica integrándose en el genoma celular, con la consecuente progresión a displasias de alto grado. Ocasionalmente existirían mecanismos oncogénicos adicionales en los que el virus no estaría integrado en el genoma celular.

El bloqueo funcional de la pRb y p53, junto a otros muchos reguladores del ciclo celular, conducen a la inestabilidad genética por acumulo de aberraciones en los cromosomas celulares constituyendo el inicio del proceso multifactorial de la carcinogénesis cervical.

Diferentes estudios han demostrado que los genes E6 y E7 del VPH se integran en el genoma celular y que las proteínas transformadas codificadas por ellos son tumorigenas. Concretamente, se sugiere que el papel del VPH está ligado, al menos en parte, a la capacidad de alguna de sus proteínas (como mínimo, las proteínas E6 y E7 de los VPH 16 y 18) de degradar selectivamente los productos de los genes supresores de tumores p53 (el E6) y Rb (el E7), como se muestra en la figura 5.

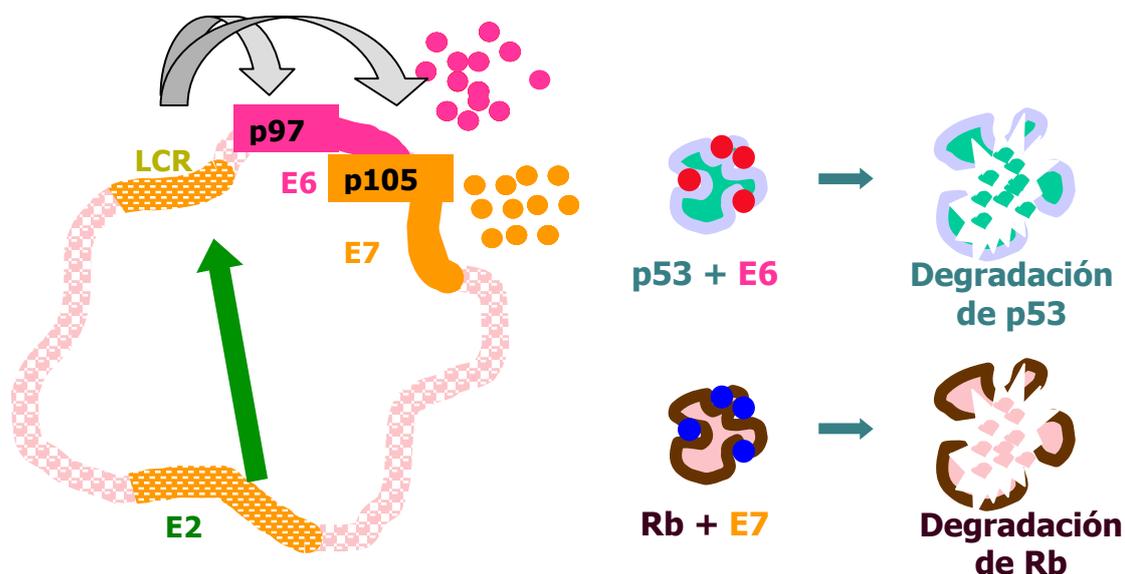


Figura 5: Mecanismo de bloqueo de proteínas celulares. (Fuente: Castellsagué X. Institut Català d'Oncologia).

La relación causal entre la infección persistente por genotipos VPH de alto riesgo y el cáncer cervical ha conducido a un compromiso de prevención del cáncer cervical globalmente, utilizando tanto prevención primaria por vacunación frente al VPH en mujeres jóvenes como prevención secundaria mediante pruebas de detección directa del VPH cancerígeno en mujeres de más edad. En la actualidad, la FDA ha aprobado dos vacunas frente al VPH: Gardasil® tetravalente y Cervarix® bivalente<sup>37,38</sup>. (Más adelante se profundizará en el tema de la vacunación profiláctica).

### 1.3 HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE CÉRVIX: LESIONES ESCAMOSAS PREINVASORAS

Revisando la literatura nos encontramos con diferentes términos para designar las lesiones preinvasoras de cérvix.

En el año 1961 en el Congreso Internacional de Citología celebrado en Viena, un comité de expertos sobre terminología histológica de las lesiones de cuello propuso la palabra “displasia” para englobar estas lesiones y definió las displasias cervicales como “todo epitelio escamoso, situado sobre la superficie o en las glándulas, que muestra alteraciones en la diferenciación, sin alcanzar el grado de perturbación que caracteriza el carcinoma in situ”. Estas alteraciones conllevan cambios arquitecturales y celulares: anomalías de diferenciación, de maduración celular, en la relación núcleo/citoplasma, etc. Así pues, se podría decir que bajo el término “displasia” se incluyen epitelios escamosos con grado variable de atipias, lo que hace necesario establecer los grados de leve, moderada y severa.

Por otra parte en 1932 Broders introdujo el término “carcinoma in situ” (CIS), que, en 1961, el comité de expertos antes mencionado definió como “los casos que, sin existir invasión del estroma, muestran un epitelio de superficie en el que no existen signos de diferenciación celular en todo su grosor”. Más tarde, en 1968, la OMS definió el CIS como “una lesión que tiene características histológicas y citológicas propias del carcinoma pero que está limitada al epitelio de superficie del ectocérvix y/o endocérvix”.

La realidad es que a veces resulta muy difícil diferenciar entre los distintos grados de displasia y entre la displasia severa y el CIS, por ello Richart propuso el término “neoplasia cervical intraepitelial” (CIN) para referirse a un espectro de lesiones

que van desde la displasia leve hasta el CIS, y que puede clasificarse de la siguiente forma<sup>39,40</sup>:

- CIN I (displasia leve): las alteraciones sólo afectan al tercio inferior del grosor epitelial.
- CIN II (displasia moderada): las alteraciones epiteliales afectan a más del tercio inferior sin sobrepasar los dos tercios del espesor.
- CIN III (displasia severa más CIS): las alteraciones alcanzan la totalidad del grosor epitelial. Resulta muy difícil diferenciar entre displasia severa y CIS. Algunos patólogos consideran que si hay mitosis atípicas en la capa celular más superficial se trata de un CIS, y si no las hay es una displasia severa.

En 1988, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) introdujo una clasificación citológica denominada “Clasificación de Bethesda”, que sustituyó a la antigua de Papanicolau<sup>41</sup>.

En 1991, un segundo taller patrocinado por el NCI revisó y modificó el sistema de Bethesda a partir de la experiencia clínica y de laboratorio<sup>42</sup>. En esta nueva clasificación, para referirse a las alteraciones detectadas en la citología, se hablaba de:

- Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL), que corresponderían histológicamente a la CIN I.
- Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL), que corresponderían a las CIN II y CIN III.
- Carcinoma epidermoide.

Con la utilización de nuevas tecnologías de detección del cáncer cervical y en respuesta a recientes hallazgos de investigación, en 2001, el NCI patrocinó un nuevo taller multidisciplinar para reevaluar y actualizar el sistema Bethesda, por lo que las alteraciones celulares epiteliales han quedado de la siguiente forma<sup>43,44</sup>:

- Células escamosas:
  - Células escamosas atípicas (ASC):
    - De significado indeterminado (ASCUS)
    - No puede excluirse HSIL (ASC.H)
  - Alteraciones de bajo grado (LSIL): incluyen alteraciones típicas de VPH y equivalen a CIN I.
  - Alteraciones de alto grado (HSIL): equivalen a CIN II, CIN III y CIS.
  - Células con alteraciones típicas de cáncer invasor.
- Células glandulares:
  - Células atípicas (AGC):
    - De significado indeterminado (AGC.US)
    - Sugieren neoplasia
    - Debe especificarse si son de cuello, de endometrio o NOS (not otherwise specified)
  - Adenocarcinoma endocervical in situ.
  - Adenocarcinoma invasor: se debe especificar si es de cuello, de endometrio, extrauterino o NOS.

En definitiva, se puede resumir que las lesiones preinvasoras escamosas pueden ser (tabla 2) <sup>45,46</sup>:

- Histológicamente: CIN I, CIN II o CIN III.
- Citológicamente: ASCUS, ASC.H, LSIL o HSIL.

Tabla 2: Comparación de la terminología para la clasificación de las lesiones preinvasoras de cérvix.

<b>Clasificación de las lesiones preinvasoras de cérvix</b>		
<b>Años 1950 – 69 (Reagan)</b>	<b>Años 1970 – 89 (Richart)</b>	<b>Años 1990 – Actualidad (Bethesda 2001)</b>
Normal	Normal	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad
Atipia	Atipia coilocítica, condiloma plano	ASCUS/ASC-H LSIL
Displasia leve	CIN 1	LSIL
Displasia moderada	CIN 2	HSIL
Displasia severa	CIN 3	HSIL
Carcinoma in situ	CIN 3	HSIL
Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma epidermoide o escamoso invasivo

La neoplasia cervical intraepitelial (CIN) se suele detectar en mujeres más jóvenes varios años antes del diagnóstico del cáncer. Se podría decir que la CIN se suele diagnosticar aproximadamente en la década de los veinte años, el CIS entre los 25 y 35 y el cáncer invasor después de los 40 años, unos 13 años tras el diagnóstico de CIN III.

La posibilidad de que una lesión preinvasora acabe siendo invasora depende del grado de la misma: así, la mayoría de las CIN I regresará a la normalidad, mientras que un alto porcentaje de las CIN III progresará a cáncer. Ello depende de la carga viral de VPH y de la persistencia del virus (fig. 6).

Se estima que, en un plazo de cinco años, el 75-80% de los casos de CIN I regresarán a la normalidad y el 6% progresará a lesiones superiores. De los CIN II y CIN III progresarán el 12-25%.

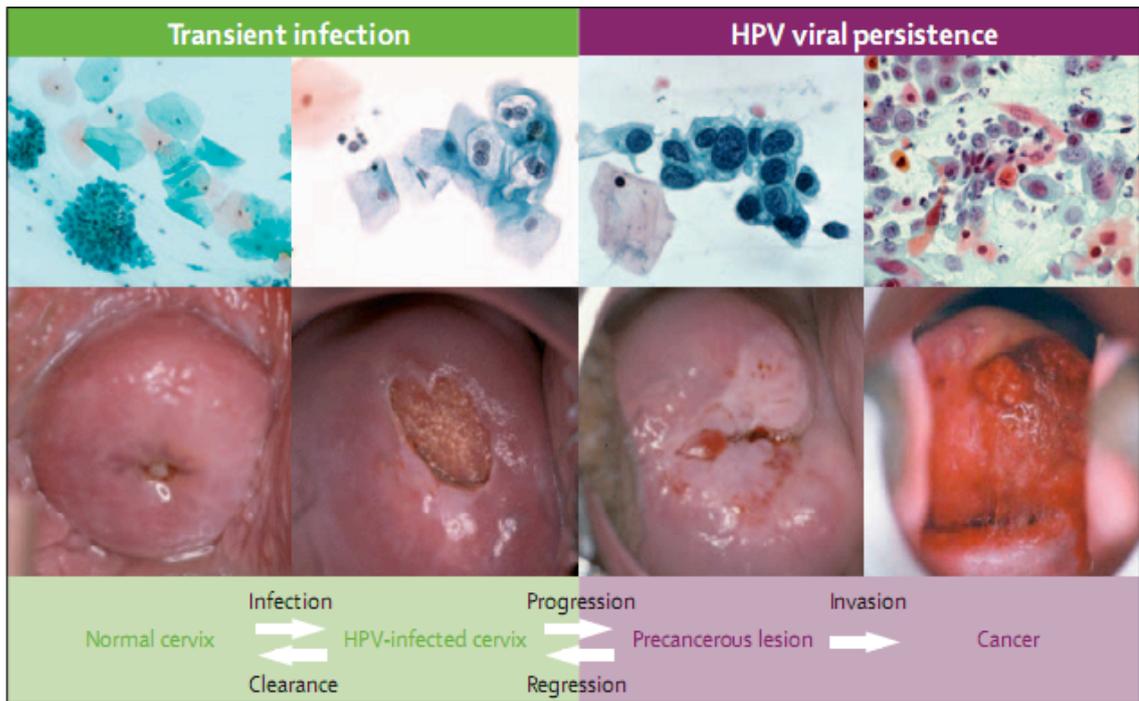


Figura 6: Desarrollo del cáncer de cérvix. (Fuente: Schiffman and Castle<sup>47</sup>).



Figura 7. Epitelio cervical normal.

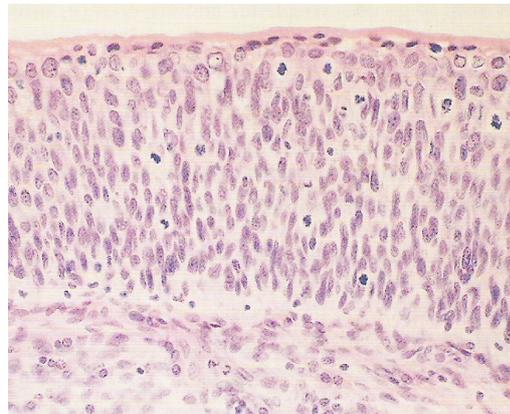


Figura 8. Carcinoma in situ de cérvix.

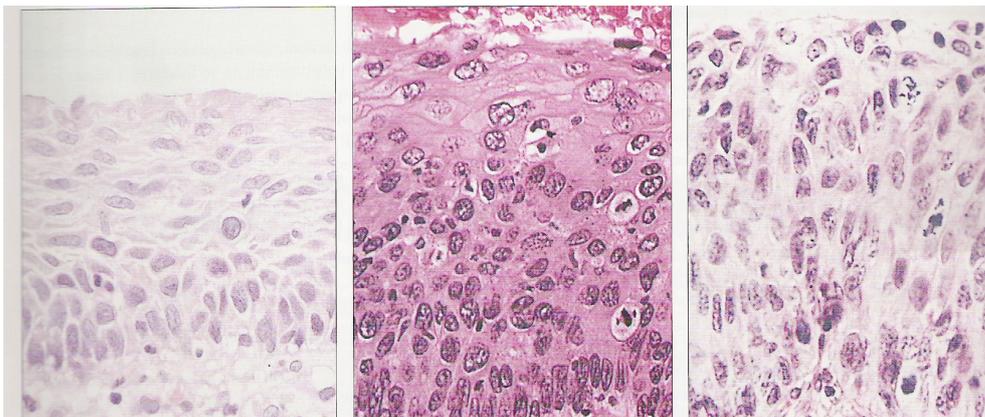


Figura 9. CIN I, CIN II Y CIN III.

### 1.3.1 CARCINOGENESIS CERVICAL

La historia natural del cáncer de cérvix asociada a la infección por VPH oncogénico constituye un excelente modelo de epidemiología molecular de la carcinogénesis.

Los principales pasos necesarios para el desarrollo de cáncer de cérvix incluye la infección por VPH de alto riesgo, persistencia de la infección viral, progresión a neoplasia intraepitelial cervical y finalmente la invasión<sup>48</sup>.

En esta secuencia, cabe la posibilidad de que ocurra la eliminación del virus en pacientes inmunocompetentes o la regresión espontánea de una condición precancerosa, ambos en un periodo de tiempo que no excede los 2 años (fig. 10).

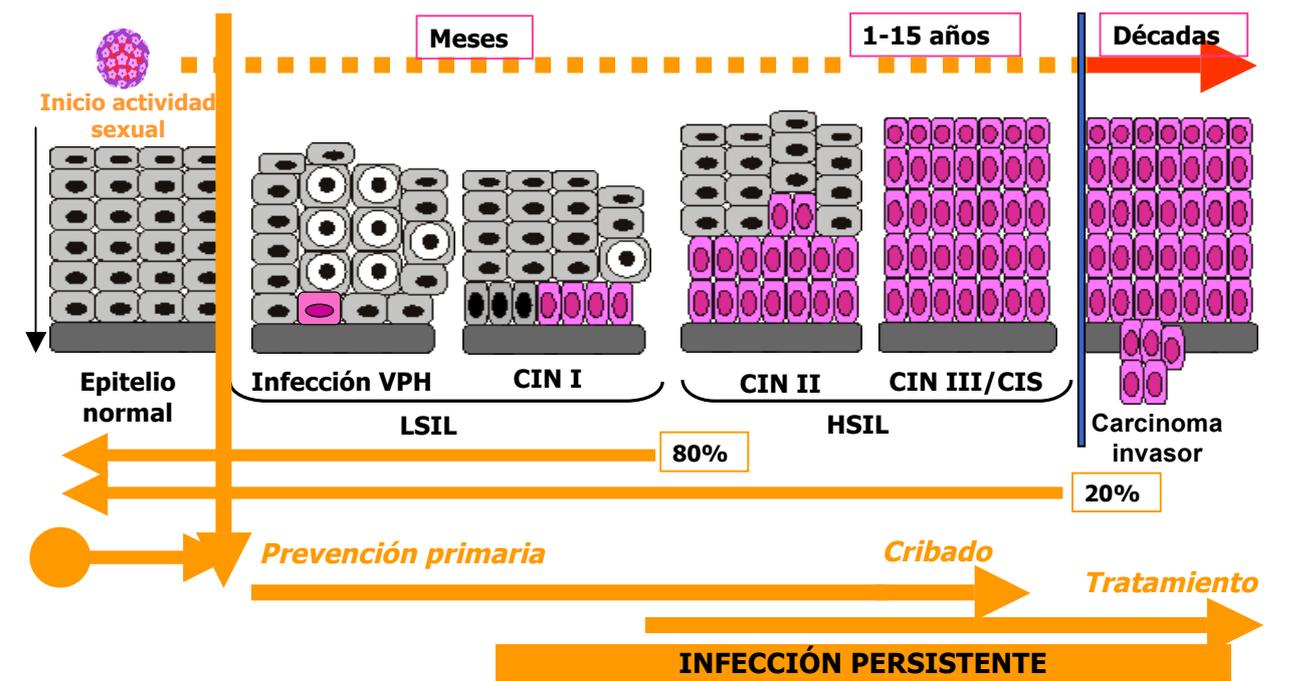


Figura 10: Historia natural del cáncer cervical. (Fuente: Alba A. Instituto de Estudios celulares y moleculares, Galicia).

La definición de persistencia continúa siendo un elemento de controversia. La mayoría de investigadores hablan de persistencia cuando un mismo tipo o grupo (de alto o bajo riesgo) de VPH es detectado en dos visitas consecutivas, pero la periodicidad de las visitas varía entre los estudios desde cuatro meses hasta cinco o siete años. La duración media de la infección es alrededor de 8 meses para virus de alto riesgo y 4-8 meses para los de bajo riesgo; el VPH tipo 16 tiende a persistir por más tiempo que otros tipos de alto riesgo. Por lo tanto la mayoría de los autores consideran que la infección por el VPH es persistente cuando se detecta un mismo genotipo en al menos 2 ocasiones separadas por 6 meses.

La persistencia de la infección por VPH depende también de la permisividad celular y de cofactores que cooperan con el virus para que este se replique y aumente la carga viral, siendo esto un evento crucial para el desarrollo del cáncer cervical. Es importante destacar, que la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias, eliminándose espontáneamente, con intervención adecuada del sistema inmune, pero también puede pasar a un estado de latencia por un largo periodo de tiempo<sup>49</sup>.

Durante la persistencia del VPH en el epitelio cervical, es posible que ocurra la integración del genoma viral en el celular, siempre y cuando se trate de un tipo viral oncogénico, de ahí la relevancia de esta fase de persistencia. La habilidad de los VPH para integrarse al genoma celular es lo que proporciona su potencial oncogénico. El desarrollo de la neoplasia intraepitelial y la enfermedad invasora ocurren como consecuencia de las alteraciones genéticas y epigenéticas inducidas por los papilomavirus humanos oncogénicos<sup>50</sup>. La infección genital persistente por VPH alto riesgo contribuye al desarrollo de tumores malignos debido a que los productos de oncogenes virales tienen la capacidad de interrumpir la integridad de puntos críticos de control de la célula<sup>51</sup>.

Muchos virus son capaces de mantener infecciones a largo plazo sin efectos citopáticos, aunque con producción de viriones, bien de forma crónica o bien con reactivaciones productivas intermitentes. El patrón de infección, crónica o latente, y la aparición de brotes con efectos citopáticos van a ser totalmente dependientes de las condiciones celulares del huésped. La persistencia de la infección viral requiere la evasión de la detección y la eliminación de las células virales por el sistema inmune.

La incapacidad del sistema inmune para resolver la infección en un plazo de tiempo corto o medio, generalmente menor de dos años, aumenta las posibilidades de que exista un daño celular continuado y como consecuencia un proceso de susceptibilidad a la neoplasia. La persistencia de la infección por encima de este plazo constituye un factor de riesgo demostrado y necesario para la transformación celular (fig. 11)<sup>52</sup>.

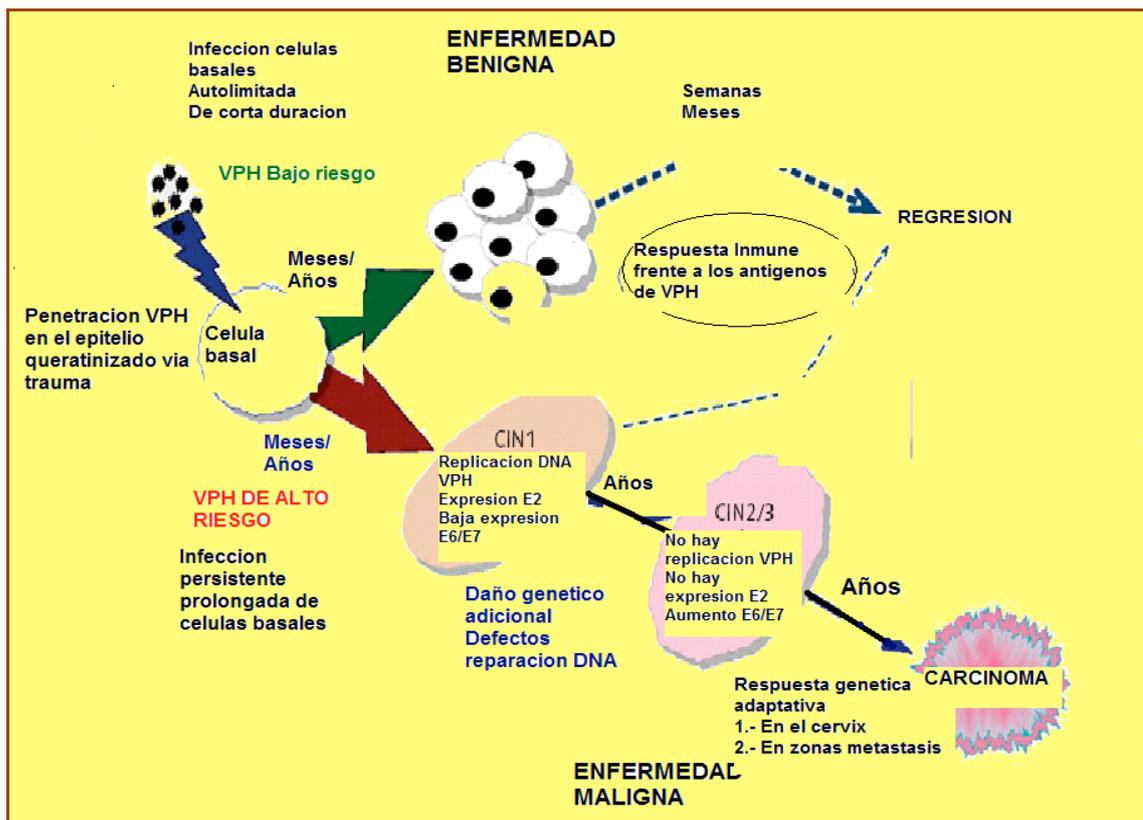


Figura 11. Historia natural de la infección por VPH.

## 1.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA Y TIPOS HISTOLÓGICOS

Al igual que las lesiones preinvasoras, prácticamente todos los carcinomas del cérvix uterino, independientemente de su tipo histológico, se originan en la zona de transformación, desde donde se extienden al exocérvix, al endocérvix o bien a ambos.

El carcinoma escamoso constituye el tipo histológico más frecuente de carcinoma cervical. El sistema de graduación más usado incluye tres grados de diferenciación, bien, moderada y pobremente diferenciado, representando los tumores moderadamente diferenciados el 60% de todas las neoplasias escamosas. Aunque se reconocen diferentes variedades de carcinoma escamoso, se recomienda usar fundamentalmente dos categorías: carcinoma escamoso queratinizante (presenta focos de queratinización con formación de perlas córneas, suelen asociarse a un mejor pronóstico) y no queratinizante (bien de células grandes que contiene elementos celulares más indiferenciados o de células pequeñas con elementos marcadamente indiferenciados), siendo esta última variedad la más frecuente (figs. 12, 13 y 14)<sup>53,54</sup>.

El adenocarcinoma constituye el segundo tipo histológico en frecuencia en el cérvix uterino y se define por la formación de estructuras glandulares. Se distinguen diferentes tipos histológicos de adenocarcinoma endocervical, aunque en su mayoría son adenocarcinomas mucinosos en sus diferentes subvariedades (figs. 17 y 18). El adenocarcinoma endometriode representa en algunas series hasta un 30% de los adenocarcinomas endocervicales, mientras que en otras series es prácticamente inexistente, siendo considerado en estas series como adenocarcinoma mucinoso con escaso moco. En cualquier caso el adenocarcinoma endometriode endocervical tiene idéntica relación etiológica con VPH que el resto de los adenocarcinomas

endocervicales y no debe ser confundido con la extensión endocervical de un adenocarcinoma de endometrio (fig. 19).

Los carcinomas adenoescamosos ocupan el tercer lugar en orden de frecuencia. Se caracterizan por la presencia simultánea de diferenciación escamosa y glandular (fig. 21).

Los tumores neuroendocrinos son poco frecuentes pero sus formas más habituales, el carcinoma de células pequeñas y el carcinoma neuroendocrino de células grandes presentan un pronóstico más agresivo. Este diagnóstico debe confirmarse mediante la demostración inmunohistoquímica de la expresión de marcadores neuroendocrinos.

En los últimos años se ha asistido a un aumento de los adenocarcinomas, pasando de un 5% en la década de los sesenta, a casi un 20% en la actualidad, esto es debido por una parte a la disminución de los carcinomas de células escamosas por un mejor diagnóstico precoz, pero también a un aumento absoluto de los adenocarcinomas, especialmente en las mujeres jóvenes.

Desde el punto de vista macroscópico, los cánceres del cérvix los podemos ver como formas endofíticas (destructivas o ulcerativas), exofíticas (nodulares, papilares, o polipoides), o con crecimiento desde el endocérvix hacia el estroma, pudiendo aparecer el epitelio ectocervical normal y tratarse de carcinomas ocultos o bien, si el crecimiento es mayor, como tumores en tonel o barril al distender el cuello. No obstante el aspecto macroscópico más común es el de una lesión exofítica mamelonada, irregular, friable, a menudo ulcerada y que sangra profusamente al contacto (fig. 23).

A continuación exponemos la clasificación de los tipos histológicos de cáncer de cérvix de la OMS diseñada en 2003 (tabla 3).

Tabla 3. Tipos Histológicos cáncer de cérvix (OMS 2003)

<b>Tumores escamosos y precursores</b>	Carcinoma escamoso	Queratinizante	
		No queratinizante	
		Basaloide	
		Verrucoso	
		Condilomatoso (warty)	
		Papilar	
		Tipo linfoepitelioma	
		Escamotransicional	
	Carcinoma escamoso con invasión incipiente		
	Neoplasia escamosa intraepitelial		
<b>Tumores glandulares y precursores</b>	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma mucinoso	Endocervical
			Intestinal
			De células en anillo de sello
			De desviación mínima
			Villoglandular
		Adenocarcinoma endometriode	
		Adenocarcinoma de células claras	
		Adenocarcinoma seroso	
Adenocarcinoma mesonéfrico			
	Adenocarcinoma con invasión incipiente		
	Adenocarcinoma in situ		
<b>Otros tumores epiteliales</b>	Carcinoma adenoescamoso	Variante de células esmeriladas (Glassy)	
	Carcinoma adenoide quístico		
	Carcinoma adenoide basal		
	Tumores neuroendocrinos	Carcinoide	
		Carcinoide atípico	
		Carcinoma de células pequeñas	
		Carcinoma neuroendocrino de células grandes	
		Carcinoma indiferenciado	

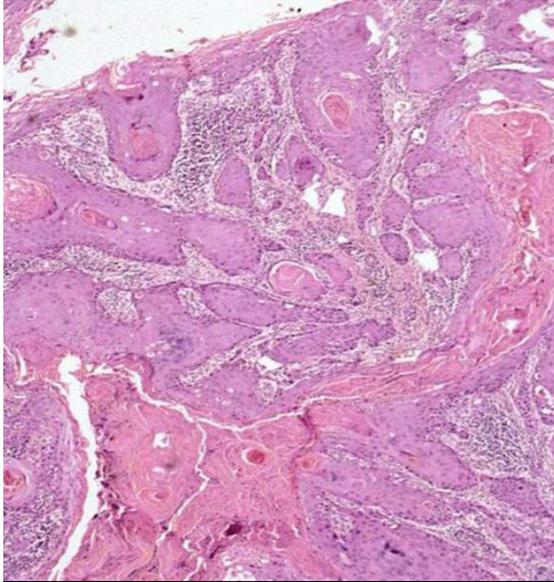


Figura 12. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo queratinizante de célula grande<sup>55</sup>.

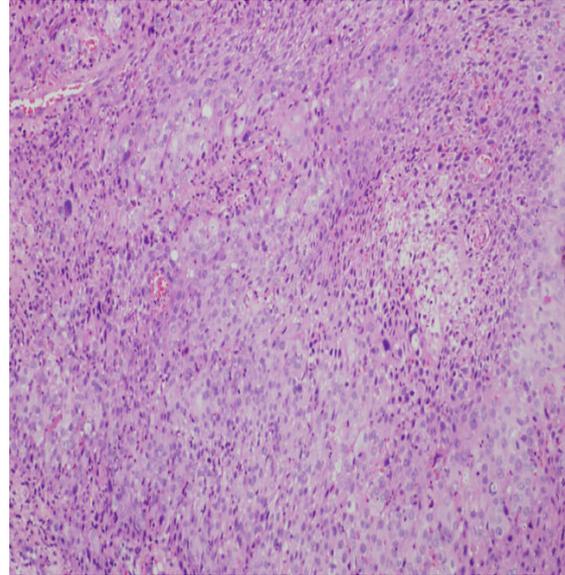


Figura 13. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo no queratinizante de célula grande<sup>55</sup>.

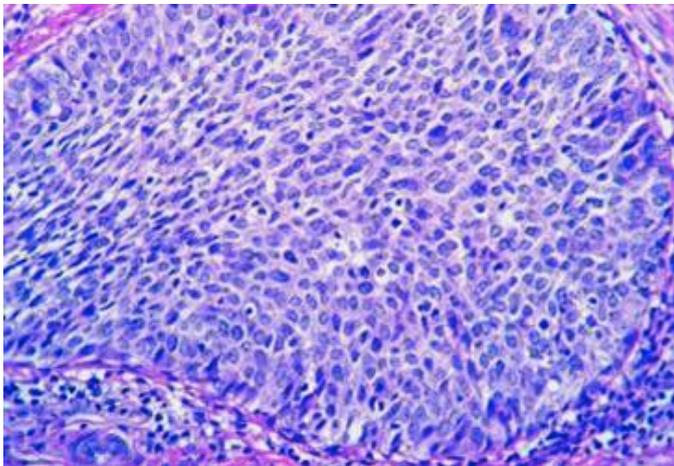


Figura 14. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo no queratinizante de célula pequeña<sup>55</sup>.

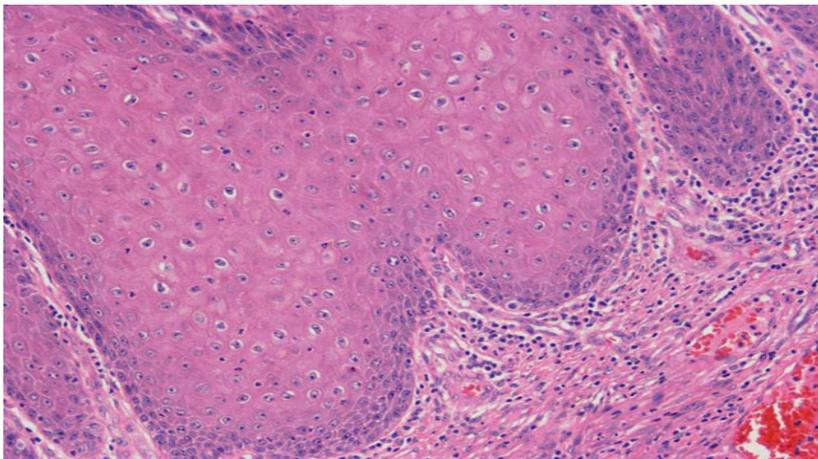


Figura 15. Carcinoma verrucoso de cérvix (patrón de crecimiento expansivo)<sup>55</sup>.

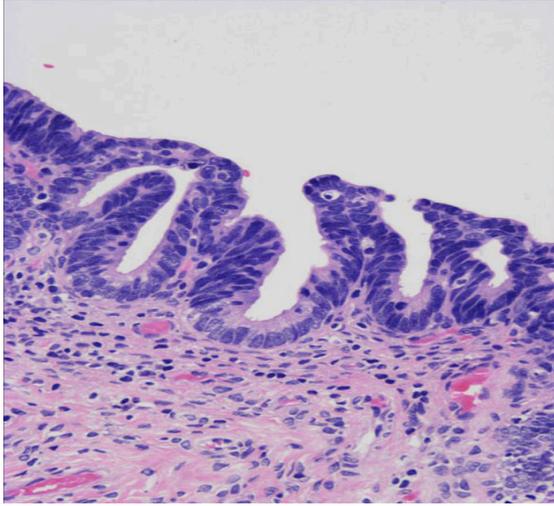


Figura 16. Adenocarcinoma in situ endocervical<sup>55</sup>.

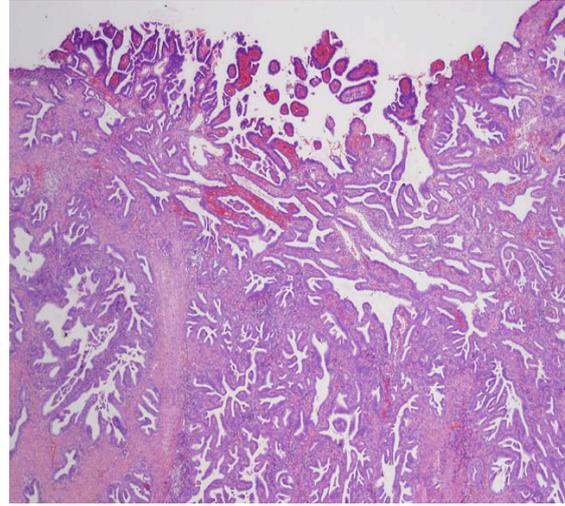


Figura 17. Adenocarcinoma de cérvix de tipo endocervical<sup>55</sup>.

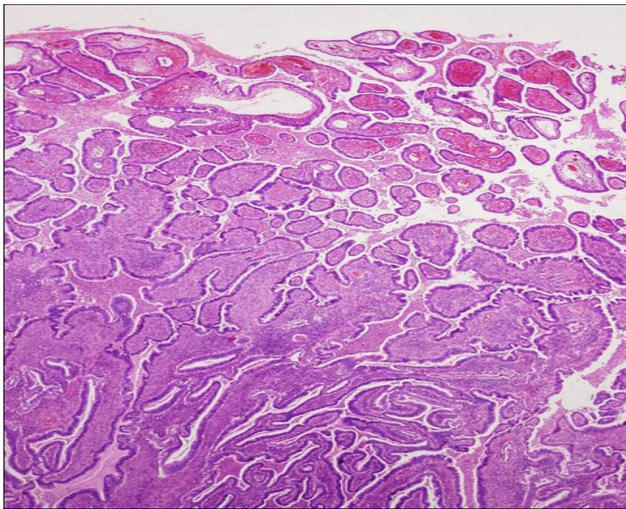


Figura 18. Adenocarcinoma villoglandular de cérvix<sup>55</sup>.

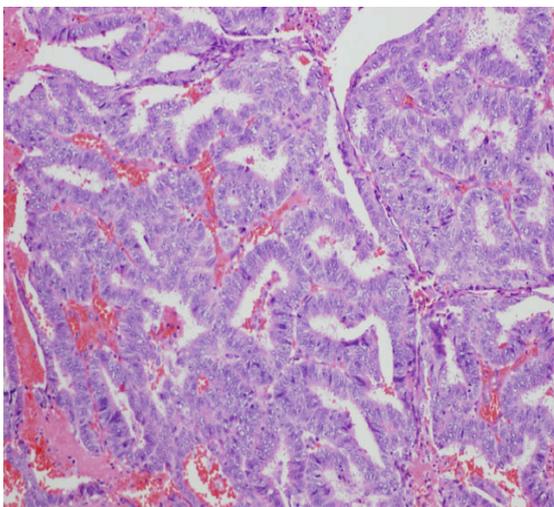


Figura 19. Adenocarcinoma endometriode de cérvix<sup>55</sup>.

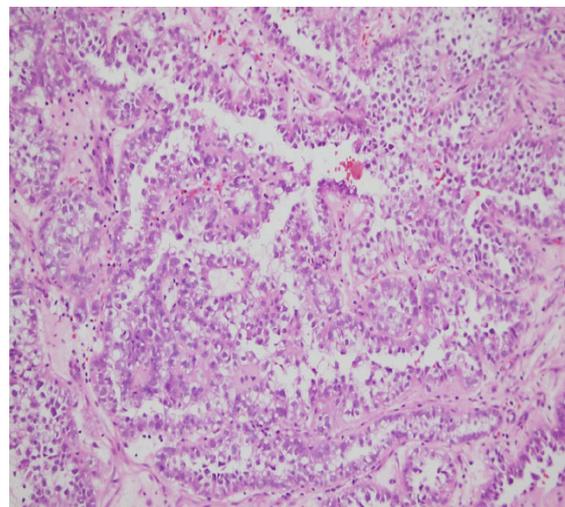


Figura 20. Adenocarcinoma de células claras de cérvix<sup>55</sup>.

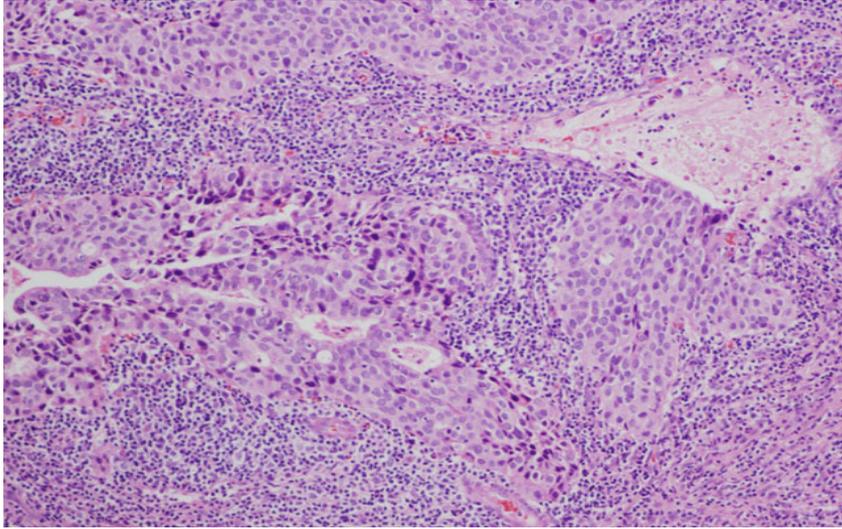


Figura 21. Carcinoma adenoescamoso de cérvix<sup>55</sup>.

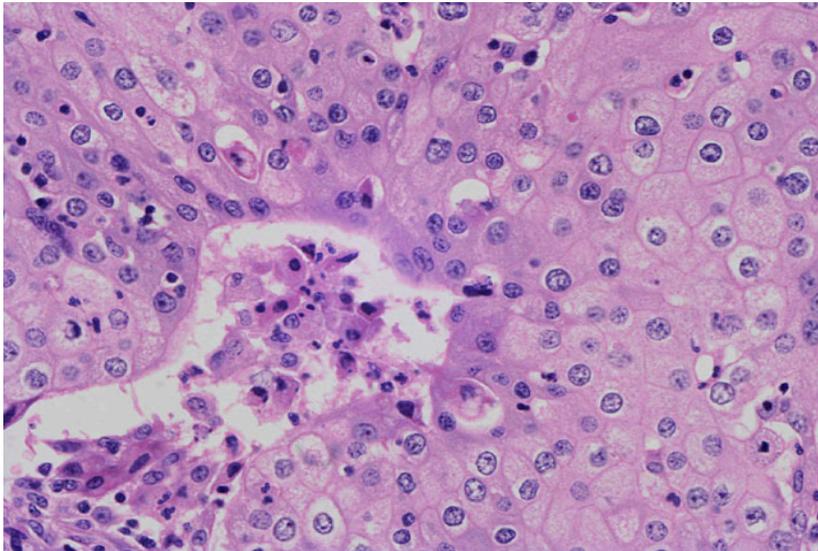


Figura 22. Carcinoma con células en vidrio esmerilado (glassy cell carcinoma)<sup>55</sup>.

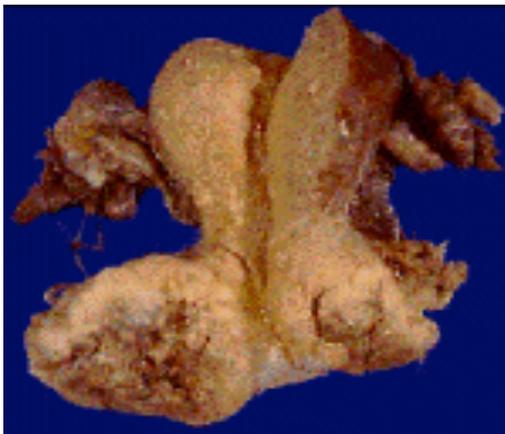


Figura 23. Vista anterior de útero y anejos abierto por el canal endocervical mostrando una lesión invasora de crecimiento exofítico a expensas cuello uterino.

## 1.5 CLÍNICA

El cáncer de cérvix en los estadios iniciales, correspondientes a carcinoma microinvasor, no produce síntomas.

En el estadio de carcinoma invasor, la metrorragia es el síntoma más precoz y característico. Habitualmente es escasa y aparece entre reglas, como un spotting intermenstrual. Rara vez es abundante, puede ser espontánea pero también con frecuencia se presenta en forma de coitorragia, o al hacer una exploración ginecológica. El flujo es otro síntoma frecuente. Habitualmente tiene un aspecto acuoso, teñido de sangre; y en fases avanzadas puede ser sanguino-purulento, con un intenso olor fétido por la presencia de necrosis.

Ya en estadios avanzados nos encontramos generalmente con síntomas ocasionados por la compresión o infiltración tumoral de los órganos vecinos: dolor pélvico o sacro irradiado a miembros inferiores por afectación del nervio ciático, disuria, hematuria, rectorragia, estreñimiento o complicaciones fistulosas hacia la vagina por invasión vesical o rectal, edema de uno o ambos miembros inferiores por bloqueo linfático o venoso, dolor en flanco por compresión ureteral que puede causar hidronefrosis y llevar a la muerte a la paciente por uremia<sup>56</sup>.

También aparecen los síntomas generales propios de los procesos neoplásicos como vómitos, astenia, anorexia, inanición e inapetencia.

## 1.6 DIAGNÓSTICO

A pesar de las campañas de prevención del cáncer de cérvix, solamente un 20 por 100 de las pacientes con enfermedad invasiva son asintomáticas en el momento de establecer el diagnóstico.

El diagnóstico precoz del cáncer cervical puede ser muy complicado debido a tres factores:

1. Naturaleza con frecuencia asintomática de la enfermedad en estadio temprano.
2. Origen de algunos tumores en el interior del canal endocervical o bajo el epitelio del ectocérvix, localización que imposibilita su visualización mediante un examen con espejulo.
3. Importante tasa de falsos negativos de las citologías, aun en mujeres que se someten a pruebas de detección regulares. Nunca puede confiarse en una citología negativa de una paciente sintomática.

La aplicación de los programas de cribado realizados de forma eficaz, ha demostrado ser efectiva en la reducción de la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino en todo el mundo aunque ninguno ha logrado erradicar totalmente la enfermedad.

### 1.6.1 ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE CÉRVIX

El carcinoma cervical tiene sus orígenes en la unión escamo-columnar ya sea en el canal endocervical o en la porción cérvico-uterina. La lesión precursora es la displasia o carcinoma in situ, que posteriormente puede convertirse en cáncer invasor.

Este proceso puede ser muy lento. Algunos estudios prospectivos han revelado que en pacientes con cáncer cervical in situ que no han sido tratadas, entre el 30% y el 70% desarrollarán carcinoma invasor en un período de 10 a 12 años. Sin embargo, en alrededor del 10% de las pacientes, las lesiones pueden progresar de in situ a lesiones invasoras en períodos inferiores a un año. A medida que se hace invasor, el tumor irrumpe a través de la membrana basal e invade el estroma cervical (fig. 24).

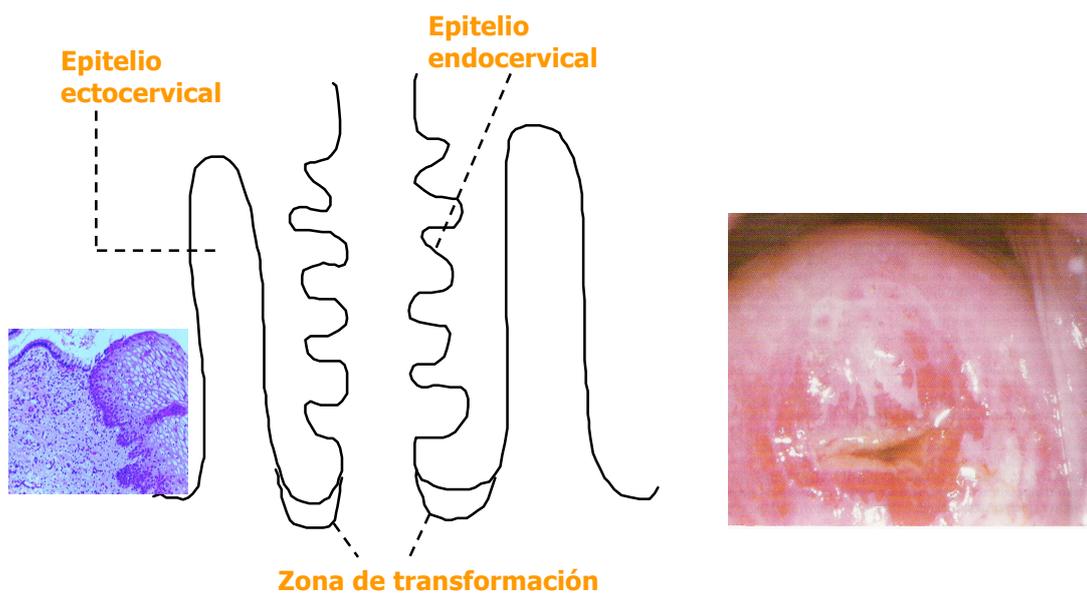


Figura 24. Zona de transformación.

La extensión del tumor cervical puede manifestarse en último término como una ulceración, un tumor exofítico o la infiltración extensa del tejido subyacente incluyendo la vejiga o el recto.

Además de la invasión local, el carcinoma cervical puede diseminarse por vía de los ganglios linfáticos regionales o del torrente sanguíneo como consecuencia de la extensión e invasión de la lesión local<sup>57</sup>. A pesar de que, en general, el cáncer cervical progresa de manera ordenada, ocasionalmente se puede presentar un tumor pequeño

con metástasis distante. Por este motivo, se debe evaluar cuidadosamente a las pacientes en búsqueda de enfermedad metastásica.

Respecto a las vías de diseminación linfáticas la primera estación son los linfáticos de la pelvis: las vías se dirigen hacia los parametrios, ganglios obturadores e hipogástricos, ilíacos externos, presacros e ilíacos comunes. Como segunda estación se dirigen hacia los ganglios paraaórticos, por lo cual estos se deben considerar metastáticos.

En cuanto a las metástasis la localización más frecuente de las primeras metástasis es: ganglios paraaórticos y mediastínicos, pulmón y tejido óseo.

En el cáncer de cérvix, la definición de la extensión de la enfermedad se hace mediante estadificación clínica, estudios diagnósticos no invasivos y en casos seleccionados mediante estadificación quirúrgica. Esta valoración previa al tratamiento nos servirá para establecer el estadio de la enfermedad y para elegir la estrategia más adecuada en cada caso.

El estadio se determina en el momento del diagnóstico primario y no se modifica ni siquiera ante las recurrencias<sup>52</sup>. Se estadificará siguiendo los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

➤ **Estadificación clínica. Criterios de estadificación<sup>58</sup>:**

- Exploración clínica

La estadificación del cáncer de cuello uterino, como se muestra en la figura 25, está basada en la exploración clínica. Esto supone que la exploración cuidadosa por personal experimentado debe ser efectuada en todos los casos. Consiste en un examen ginecológico por vía vaginal y rectal, a ser posible bajo anestesia general, intentando valorar tanto el volumen tumoral como la extensión vaginal, parametrial y del tabique

rectovaginal del proceso neoplásico. En ocasiones, puede resultar dificultoso discernir, por la exploración clínica, una verdadera afectación neoplásica de un proceso inflamatorio reactivo de los tejidos parametrales.

La exploración de áreas ganglionares debe incluir tanto la zona inguinal como el área supraclavicular.

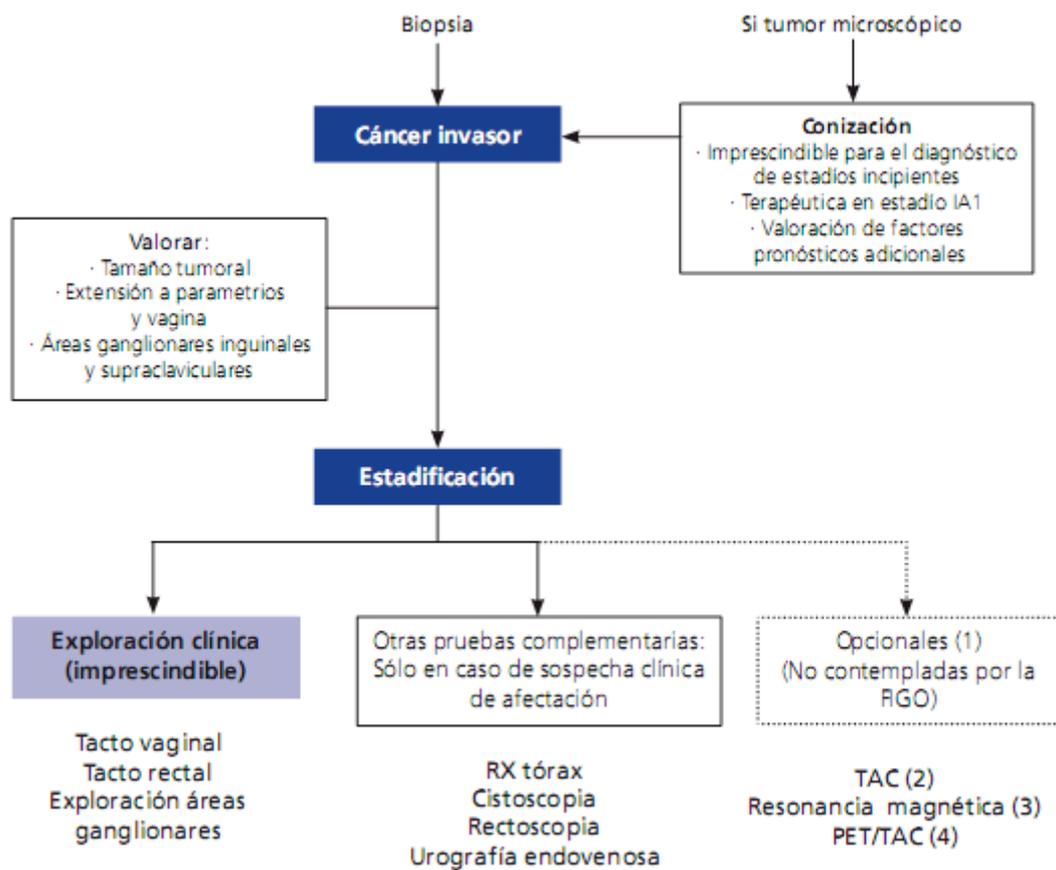


Figura 25. Estadificación clínica Cáncer de Cérnix. (Fuente: Oncogúa Cérnix<sup>52</sup>).

Las pruebas que se pueden utilizar para efectuar la estadificación son: palpación, inspección, colposcopia, biopsia y legrado endocervical. La conización o amputación de cuello forman parte de la exploración clínica.

Todo crecimiento tumoral o ulceración obvios han de someterse a biopsia en sacabocados o escisión con asa de diatermia para confirmación histológica. En caso de

que la paciente presente un cuello uterino de aspecto normal pero sea sintomática o tenga una citología anómala, habrá de realizarse una colposcopia. Si no es posible establecer un diagnóstico definitivo de cáncer invasivo a partir de la biopsia ambulatoria, podría ser necesaria una conización diagnóstica.

- Pruebas Complementarias

Dado que la información sobre la extensión de la enfermedad es fundamental a la hora de planificar el tratamiento, para definir con mayor precisión dicha extensión se han utilizado varios estudios sobre diagnóstico por la imagen.

- Para realizar la estadificación

Se aceptan como pruebas para realizar la estadificación: histeroscopia, cistoscopia, rectosigmoidoscopia, pielografía endovenosa y radiografía de tórax y huesos. La sospecha de afectación de la mucosa rectal o vesical debe ser confirmada por biopsia (histología, no citología). El edema de pared no es prueba suficiente.

- Para modular el tratamiento (fig.25)

Las pruebas complementarias tales como linfografía, TAC, resonancia magnética, PET, arteriografía o venografía, laparoscopia con o sin linfadenectomía, ecografía, PAAF de ganglios guiada por TAC, son útiles para la decisión terapéutica pero no hacen variar el estadio clínico. Su acceso no es universal y no permitiría poder comparar los resultados de centros y países diversos. Por lo que son opcionales, no contempladas por la FIGO (1).

*Tomografía computerizada (2):* desde mediados de la década de 1970, se viene utilizando la TAC para ayudar a establecer el estadio de un cáncer pélvico. Además de

su uso para valoración de la afectación ganglionar, la TAC pélvica y abdominal permite la evaluación del hígado, del tracto urinario y de las estructuras óseas. La TAC detecta únicamente cambios en el tamaño de los ganglios, y generalmente se consideran positivos aquellos de más de 1cm de diámetro. Los ganglios de tamaño normal que contienen depósitos microscópicos dan falsos negativos, mientras que la dilatación ganglionar producida por cambios hiperplásicos o inflamatorios provoca falsos positivos. Si se consideran positivos los ganglios de más de 1.5cm de diámetro, la sensibilidad de la prueba mejora a costa de la especificidad.

*Resonancia magnética (3):* las imágenes por resonancia magnética (RM) poseen una resolución de alto contraste y capacidad de representación multiplanar, por lo que constituye una modalidad valiosa para determinar el tamaño del tumor, el grado de penetración en el estroma, la extensión a la vagina, la extensión al cuerpo uterino, la extensión al parametrio y el estado de los ganglios linfáticos.

La capacidad de la RM de determinar con mayor precisión el diámetro tumoral y la infiltración al parametrio, especialmente en pacientes con tumores cervicales voluminosos, convierte a esta técnica en un auxiliar muy útil para la evaluación clínica destinada a la planificación del tratamiento. La RM es adecuada también para la evaluación de las pacientes embarazadas, porque no supone riesgo para el feto.

*Tomografía por emisión de positrones (PET) (4):* se basa en las alteraciones metabólicas, más que en las anatómicas, para la detección de la enfermedad. La técnica PET tiene la capacidad de determinar la extensión de la enfermedad, especialmente en ganglios linfáticos no dilatados y en puntos remotos, con mayor precisión que los estudios convencionales de diagnóstico por la imagen.

Los estadios se definen por la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) o por la clasificación TNM del Comité Americano Conjunto Sobre el Cáncer (AJCC).

#### A. ESTADIOS DE LA FIGO:

Es un estadiaje clínico, que debe realizarse basándose en los exámenes practicados antes del tratamiento. Los hallazgos posteriores, obtenidos durante la realización del acto quirúrgico o en el análisis de la pieza operatoria, no deben hacer variar el estadio en el que se haya clasificado a la paciente preoperatoriamente<sup>59</sup>.

##### ➤ **Estadificación actualizada de la FIGO 2008 para el cáncer cervical<sup>60</sup>:**

El Comité de la FIGO en Oncología Ginecológica decidió por un lado que la estadificación clínica debería continuar, mientras que la evaluación ganglionar para la estadificación preterapéutica consideró que no se incluyera porque sólo se emplea en los países más avanzados, mientras que en la mayoría de los países con pocos recursos no se puede llevar a cabo.

Dos han sido los cambios que han sido aprobados en la nueva clasificación. En primer lugar, el estadio IIA ha sido subdividido en IIA1 y IIA2, dependiendo de si el diámetro máximo del tumor es mayor o menor de 4cm, tal como se venía dividiendo el estadio IB. En segundo lugar, se ha eliminado el estadio 0 porque se considera una etapa preneoplásica.

- **Estadio I:** Es el carcinoma estrictamente limitado al cérvix; no se debe tener en cuenta la extensión al cuerpo uterino.
  - **Estadio IA:** Carcinomas invasivos sólo diagnosticados por microscopio.
 

Todas las lesiones macroscópicas, incluso con invasión superficial, se consideran como cáncer en estadio Ib. La invasión se limita a la invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm y no más de 7 mm de ancho. La profundidad de la invasión no debe ser mayor de 5 mm desde la base del epitelio, ya se origine en la superficie o en las glándulas. La invasión del espacio vascular, ya sea venoso o linfático, no debe alterar la clasificación.

    - Estadio IA1: Invasión del estroma de no más de 3mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro.
    - Estadio IA2: Invasión del estroma de más de 3mm pero no más de 5 mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro.
  - **Estadio IB:** Lesiones clínicas limitadas al cuello uterino o lesiones preclínicas de mayor extensión que el estadio IA.
    - Estadio IB1: Lesiones clínicas de no más de 4cm de tamaño.
    - Estadio IB2: Lesiones clínicas de más de 4cm de tamaño.
  
- **Estadio II:** El carcinoma se extiende más allá del cérvix uterino, pero no llega a la pared pélvica. El carcinoma afecta la vagina, pero no llega al tercio inferior.
  - **Estadio IIA:** Sin invasión parametrial.
    - Estadio IIA1: Lesión clínicamente visible  $\leq$  4cm en su mayor dimensión
    - Estadio IIA2: Lesión clínicamente visible  $>$  4cm en su mayor dimensión.
  - **Estadio IIB:** Afectación del parametrio proximal, pero sin llegar a la pared pélvica lateral (fig. 26).

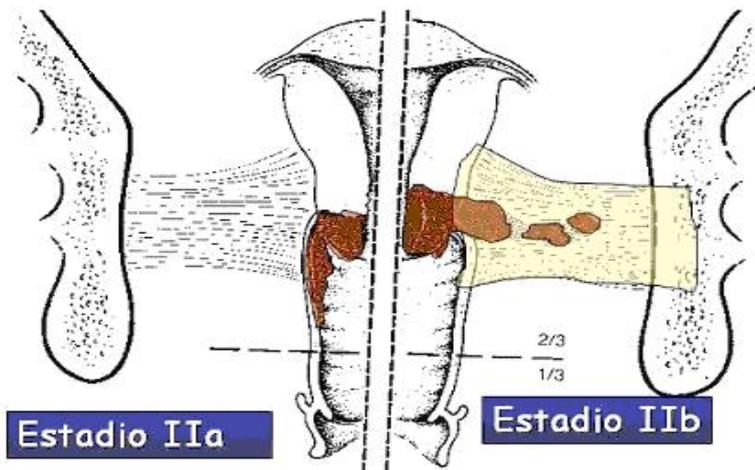


Figura 26. Estadio II. (Fuente: protocolo SEGO sobre cáncer de cérvix<sup>58</sup>).

- **Estadio III:** Implica que el carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. Acorde al examen rectal, no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica. El tumor afecta el tercio inferior de la vagina. Se deben incluir todos los casos con hidronefrosis o con insuficiencia renal, a menos que se sepa que se deben a otras causas (fig. 27) .
  - **Estadio IIIA:** Sin extensión a la pared pélvica, pero sí al tercio inferior de la vagina.
  - **Estadio IIIB:** Extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal.

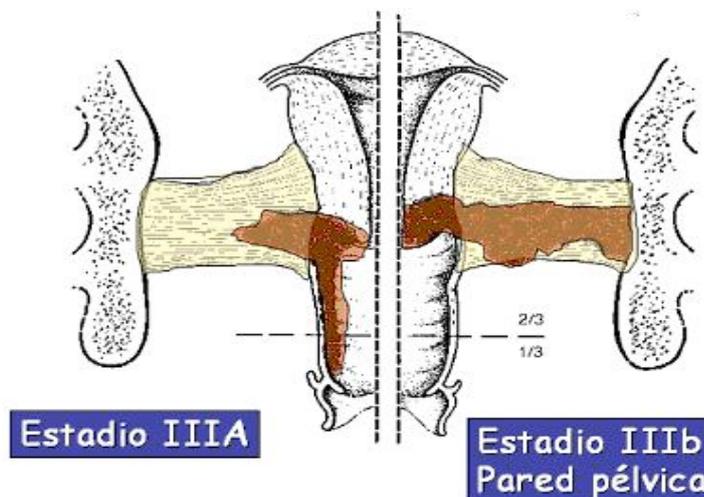


Figura 27. Estadio III. (Fuente: protocolo SEGO<sup>58</sup>).

- **Estadio IV:** Implica que el carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis misma o ha afectado clínicamente la mucosa vesical o rectal (fig. 28).
  - **Estadio IVA:** Propagación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.

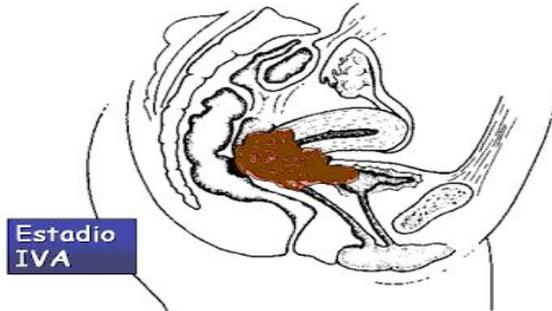


Figura 28. Estadio IV. (Fuente: protocolo SEGO<sup>58</sup>).

- **Estadio IVB:** Propagación a órganos distantes.

Notas sobre la estadificación:

- El diagnóstico del estadio "Ia" debe basarse en el estudio de un cono que tiene que incluir la lesión completamente.
- Un parametrio indurado y fijo a la pared pélvica, pero no nodular, debe ser calificado como estadio "IIb". Debe ser clasificado como estadio III si el parametrio es nodular en la pared pélvica o si el crecimiento tumoral se extiende a la pared pélvica.
- La presencia de edema bulloso como tal no permite clasificar un caso como estadio "IV". Los surcos y retracciones de la pared deben interpretarse como signos de afectación submucosa si permanecen fijos al tumor durante la movilización del mismo en la exploración citoscópica. El hallazgo de una citología maligna en el lavado vesical requiere biopsia de la pared.
- Cuando hay duda con el estadio, es obligatorio asignarlo al más precoz. Una vez asignado y el tratamiento ha sido iniciado no puede ser cambiado como consecuencia de hallazgos posteriores.

## Clasificación TNM:

Las definiciones de las categorías T corresponden a los estadios aceptadas por FIGO.
<b>Tumor Primario (T)</b>
<b>TX:</b> El tumor primario no puede ser evaluado.
<b>T0:</b> No hay evidencia de tumor primario.
<b>Tis:</b> Carcinoma in situ.
<b>T1/I:</b> El carcinoma cervical está estrictamente limitado al útero (no debe tenerse en cuenta la extensión al cuerpo).
<b>T1a/IA:</b> Carcinoma invasor diagnosticado sólo mediante microscopia. Todas las lesiones visibles macroscópicamente, aún con invasión superficial, son T1b/1B. Invasión estromal con profundidad máxima de 5 mm medida desde la base del epitelio y expansión horizontal de 7 mm o menos. Una invasión del espacio vascular, ya sea venosa o linfática, no afecta la clasificación.
<b>T1a1/IA1:</b> Invasión estromal de 3 mm o menos de profundidad y 7 mm o menos de extensión horizontal.
<b>T1a2/IA2:</b> Invasión estromal de más de 3 mm y no más de 5 mm con expansión horizontal de 7 mm o menos.
<b>T1b/IB:</b> Lesión clínicamente visible confinada al cérvix o lesión microscópica mayor de T1a2/IA2.
<b>T1b1/IB1:</b> Lesión clínicamente visible de 4 cm o menos en su mayor dimensión.
<b>T1b2/IB2:</b> Lesión clínicamente visible con más de 4 cm en su mayor dimensión.
<b>T2/II:</b> El carcinoma se ha extendido más allá del útero pero no a la pared pélvica ni al tercio inferior de la vagina.
<b>T2a/IIA:</b> Tumor que no se ha extendido al parametrio.
<b>T2a1/IIA1:</b> Lesión clínicamente visible $\leq 4$ cm en su mayor dimensión. <b>T2a2/IIA2:</b> Lesión clínicamente visible $> 4$ cm en su mayor dimensión.
<b>T2b/IIB:</b> Tumor que se ha extendido al parametrio.
<b>T3/III:</b> Extensión a la pared pélvica y/o se extiende al tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o disfunción renal.
<b>T3a/IIIA:</b> El tumor se ha extendido al tercio inferior de la vagina pero no a la pared pélvica.
<b>T3b/IIIB:</b> Diseminación del tumor a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o disfunción renal.
<b>T4/IVA:</b> El tumor invade la mucosa de la vejiga o el recto y/o se extiende más allá de la pelvis misma (un edema buloso no es suficiente para clasificar un tumor como T4).
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>
<b>NX:</b> Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.
<b>N0:</b> No hay metástasis de ganglios regionales.
<b>N1:</b> Evidencia de metástasis de ganglios regionales.

**Metástasis a distancia (M).** Son las metástasis en ganglios aórticos y mediastínicos, pulmones y esqueleto.

**MX:** La metástasis a distancia no puede ser evaluada.

**M0:** No hay metástasis a distancia.

**M1/IVB:** Existe metástasis a distancia.

## B. AGRUPACIÓN POR ESTADIOS DE LA AJCC (2010)<sup>61</sup>:

Estadio	T	N	M
Estadio 0*	Tis	NO	M0
Estadio I	T1	NO	M0
Estadio IA	T1a	NO	M0
Estadio IA1	T1a1	NO	M0
Estadio IA2	T1a2	NO	M0
Estadio IB	T1b	NO	M0
Estadio IB1	T1b1	NO	M0
Estadio IB2	T1b2	NO	M0
Estadio II	T2	NO	M0
Estadio IIA	T2a	NO	M0
Estadio IIA1	T2a1	NO	M0
Estadio IIA2	T2a2	NO	M0
Estadio IIB	T2b	NO	M0
Estadio III	T3	NO	M0
Estadio IIIA	T3a	NO	M0
Estadio IIIB	T3b	Cualquier N N1	M0 M0
Estadio IVA	T4	Cualquier N	M0
Estadio IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1

\* RGO ya no considera el estadio 0 (Tis).

### ➤ **Estadificación quirúrgica**

Consiste esencialmente en el muestreo linfático aórtico y pélvico, preferiblemente extraperitoneal o transperitoneal laparoscópico, y la exploración directa del sistema parametrial para reconocer de un modo más seguro la extensión de la enfermedad. Su razón de ser deriva de la inexactitud de la estadificación clínica en el 38% de los casos (29% estadios “Ib” y 77% en III-IV).

En casos tratados mediante procedimientos quirúrgicos, los hallazgos del patólogo en los tejidos extirpados pueden servir de base para declaraciones muy precisas sobre la extensión de la enfermedad. Las conclusiones no deben modificar la estadificación clínica, pero deben registrarse de la manera descrita para la estadificación patológica de la enfermedad. La nomenclatura TNM es apropiada para este fin.

Sólo si se utilizan estrictamente las normas de estadificación clínica será posible comparar resultados entre clínicas y diferentes modos de terapia.

## 1.7 TRATAMIENTO

Después de haber llegado al diagnóstico definitivo de cáncer cervical invasor, mediante biopsia y estudio anatomopatológico, y tras haber estudiado la posible extensión de la enfermedad mediante la exploración clínica y pruebas complementarias, habrá que plantearse la estrategia terapéutica a seguir, dependiendo en cada caso particular del estadio tumoral y de la edad y estado general de la paciente<sup>62</sup>.

### 1.7.1 PLANIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO

Existen diversas opciones terapéuticas en función del estadio clínico y factores pronósticos<sup>52</sup>:

- Conización
- Traquelectomía simple o radical
- Histerectomía simple (extrafascial) o radical
- Radioterapia radical (RDT) + Quimioterapia concomitante (QMT)

En estadios precoces se considera de elección el tratamiento quirúrgico (Evidencia 1B), aunque la RDT es una alternativa válida en función de la experiencia del centro y de las condiciones de la paciente. El tratamiento quirúrgico ofrece algunas ventajas como:

- Permite la conservación de la función ovárica
- Mantiene una vagina más funcional
- Facilita el conocimiento de los factores pronósticos anatomopatológicos

Los resultados ofrecidos por las diferentes vías de abordaje (vaginal, abdominal, laparoscópica) se consideran equiparables si son practicadas por personal con suficiente experiencia (Evidencia 1B).

El tratamiento quirúrgico no es recomendable en estadios incipientes con presencia de factores de mal pronóstico que permitan prever la necesidad de tratamiento adyuvante. El objetivo es evitar la suma de morbilidad derivada de la asociación de tratamientos.

El conocimiento previo de la afectación ganglionar permite seleccionar el grupo de pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento RDT-QMT y adecuar los campos de irradiación en caso de afectación ganglionar paraórtica.

Si el conocimiento de los factores pronósticos es posterior a la cirugía, se indica tratamiento adyuvante en función de la presencia de los mismos y grupo de riesgo determinado.

En estadios localmente avanzados el tratamiento de elección es la asociación RDT-QMT con finalidad radical (Evidencia 1A).

### 1.7.2 TRATAMIENTO SEGÚN ESTADIO CÁNCER DE CÉRVIX.

- CARCINOMA IN SITU

El carcinoma in situ de cérvix tiene una tasa de curación muy cercana al 100% si se trata adecuadamente. Es muy recomendable antes de tomar una decisión sobre el tratamiento, conocer la correlación entre la citología y una biopsia guiada con colposcopia. Siempre se necesita una biopsia guiada mediante colposcopia y una conización para excluir la enfermedad invasiva antes de iniciar el tratamiento.

Los métodos para tratar lesiones ectocervicales incluyen:

- Exéresis mediante asa de diatermia de la unión escamo-columnar incluyendo la zona afectada por el carcinoma in situ (fig. 29).



Figura 29. Asa diatermia.

- Conización mediante láser (fig. 30).

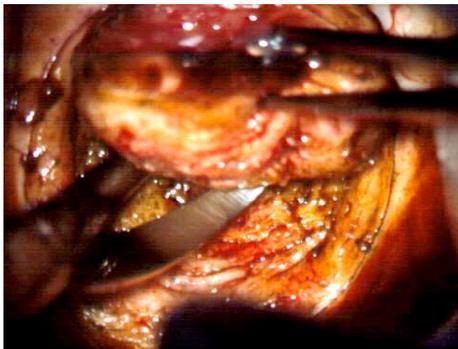


Figura 30. Conización con láser.

- Conización clásica con bisturí frío.

La conización mediante asa de diatermia se considera hoy el tratamiento estándar, sin embargo, en determinados casos donde existe dificultad en la identificación de la enfermedad, falta de correlación entre la citología y los resultados de la colposcopia, adenocarcinoma in situ o extensión de la enfermedad al canal endocervical puede que sea necesario realizar una conización clásica con bisturí frío o con láser. La selección de tratamiento dependerá de varios factores, incluyendo la edad, su deseo de preservar la fertilidad y su condición médica.

La histerectomía vaginal, abdominal total o laparoscópica es un tratamiento aceptado, especialmente en las pacientes postmenopáusicas siempre que se haya

descartado invasión del estroma y se recomienda particularmente cuando el proceso neoplásico se extiende al margen interno del cono.

Para pacientes que no son candidatas a tratamiento quirúrgico por razones médicas, se puede utilizar tratamiento radioterápico mediante braquiterapia.

- ESTADIO I

### **Estadio IA**

Carcinomas invasivos sólo diagnosticados por microscopio en un espécimen de conización. Planear el tratamiento con una biopsia puede dar lugar a errores.

- IAI: Invasión del estroma de no más de 3 mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro. La conización puede ser un tratamiento indicado si:

- Márgenes negativos en el cono.
- Legrado endocervical negativo para invasión o displasia.
- Invasión espacio linfovascular ausente.
- El seguimiento posterior debe ser riguroso mediante citología y colposcopia (cada 3 meses/1 año; 6 meses/2 años; cada año).

La histerectomía total extrafascial se podría realizar cuando no hay deseos de fertilidad si los márgenes son negativos en el cono, ausencia de invasión del espacio linfovascular y la ooforectomía en estos casos es opcional pudiéndose evitar en mujeres jóvenes.

La histerectomía radical modificada tipo II (extirpación de la mitad medial de los ligamentos cardinales y uterosacros; extirpación del tercio superior de vagina) con linfadenectomía pélvica se realizará si los márgenes son positivos en el cono o aparece invasión del espacio linfovascular.

Cuando por razones médicas no es posible la cirugía y no se observa invasión del espacio capilar linfático, la frecuencia de afectación de ganglios es lo suficientemente baja para que se pueda tratar estas pacientes exclusivamente con braquiterapia, en caso contrario se necesitará radioterapia externa.

- IA2: Invasión estroma de más de 3 mm pero no de más de 5 mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro.

Para pacientes con invasión tumoral entre 3 y 5 mm se recomienda la histerectomía radical con disección de ganglios linfáticos pélvicos debido al riesgo conocido de hasta un 10% de metástasis de los ganglios linfáticos. Si existe contraindicación para la cirugía se empleará radioterapia intracavitaria y radioterapia pélvica.

Muchas pacientes con cáncer cervical temprano son jóvenes, por lo que para ellas es importante la conservación de la fertilidad. Por tanto, se han explorado métodos quirúrgicos que extirpan la lesión primaria y los ganglios linfáticos regionales pero conservan el cuerpo uterino para una futura maternidad<sup>63</sup>.

Esta técnica es denominada traquelectomía, exéresis quirúrgica del cérvix por debajo del nivel de la arteria uterina.

- Traquelectomía simple: exéresis extrafascial, respetando el tejido parametrial.
- Traquelectomía radical: incluye colpectomía superior y exéresis del tejido paravaginal y parametrial por debajo del nivel de la arteria uterina. Requiere disección del segmento distal del uréter.

Aunque este procedimiento no haya logrado todavía una amplia aceptación, se ha informado de resultados satisfactorios de embarazo.

Aunque la traquelectomía radical se asocia con un tiempo operatorio menor y una morbilidad inferior a corto plazo que la histerectomía radical, hay algunas

morbilidades a largo plazo. En una revisión retrospectiva de 29 pacientes que se habían sometido a traquelectomía radical, el grupo del Bartholomew's Hospital de Londres informó de dismenorrea en 24% de las pacientes, menstruación irregular en el 17%, candidiasis recurrente en el 14%, problemas con la sutura cervical en el 14%, estenosis ístmica en el 10% y amenorrea prolongada en el 7%<sup>64</sup>.

Una cuestión fundamental para la traquelectomía por cualquier vía es la extensión del tumor hacia el canal endocervical. Para evitar la recurrencia local es fundamental que el margen quirúrgico endocervical sea adecuado, por lo que es deseable algún tipo de diagnóstico por la imagen antes de la operación. La RM parece ser sumamente sensible y específica para determinar la extensión tumoral más allá del orificio interno del útero<sup>65</sup>.

### **Estadio IB**

○ IB1: Tanto la radioterapia como la histerectomía radical más la disección bilateral de ganglios linfáticos, en manos de un experto, resultan en un porcentaje de curación del 85% al 90% para pacientes con tumores menores de 4cm de diámetro. La selección de uno de estos métodos dependerá de factores de la paciente y de la disponibilidad de medios locales. El tamaño del tumor primario es un importante factor de pronóstico y debe ser evaluado cuidadosamente para escoger el tratamiento.

La cirugía primaria tiene la ventaja de extirpar la enfermedad primaria y permitir una estadificación quirúrgica precisa, de modo que permite enfocar con mayor precisión cualquier tratamiento adyuvante<sup>66</sup>.

- Cirugía: Histerectomía radical tipo III (extirpación de la totalidad de los ligamentos cardinales y uterosacos; extirpación del tercio superior de vagina, también denominada intervención de Wertheim-Meigs) con linfadenectomía pélvica (ooforectomía según edad en escamosos y recomendado en adenocarcinomas). Realizar estudio intraoperatorio de ganglios sospechosos y si son claramente positivos valorar suspender cirugía y administrar radioterapia (figs. 31 y 32)<sup>67</sup>.
  
- Radioterapia complementaria tras cirugía: No es necesaria si los ganglios son negativos, parametrios no afectos y los márgenes quirúrgicos son negativos. Por el contrario si alguna de estas tres condiciones fuese positiva tendría que administrarse. Puede ser recomendable si existe invasión del espacio linfovascular o invasión profunda del estroma.
  
- Radioterapia como tratamiento exclusivo: Radioterapia pélvica y braquiterapia. En general, la dosis alcanzada en el punto A (objetivo primario: tumor más útero) debería de ser de 70-80 Gy y en el punto B (objetivo secundario: nódulos linfáticos pélvicos y de la iliaca común) de 60 Gy.
  
- Traquelectomía radical: En casos seleccionados de tumores menores de 2 cm. y en manos expertas se puede preservar la fertilidad mediante la extirpación radical exclusiva del cuello previa linfadenectomía pélvica laparoscópica que confirme la ausencia de afectación ganglionar (fig. 33).
  
- Existe una recomendación consensuada de evitar dos tratamientos (cirugía y radioterapia) en el momento de planificar el enfoque terapéutico.

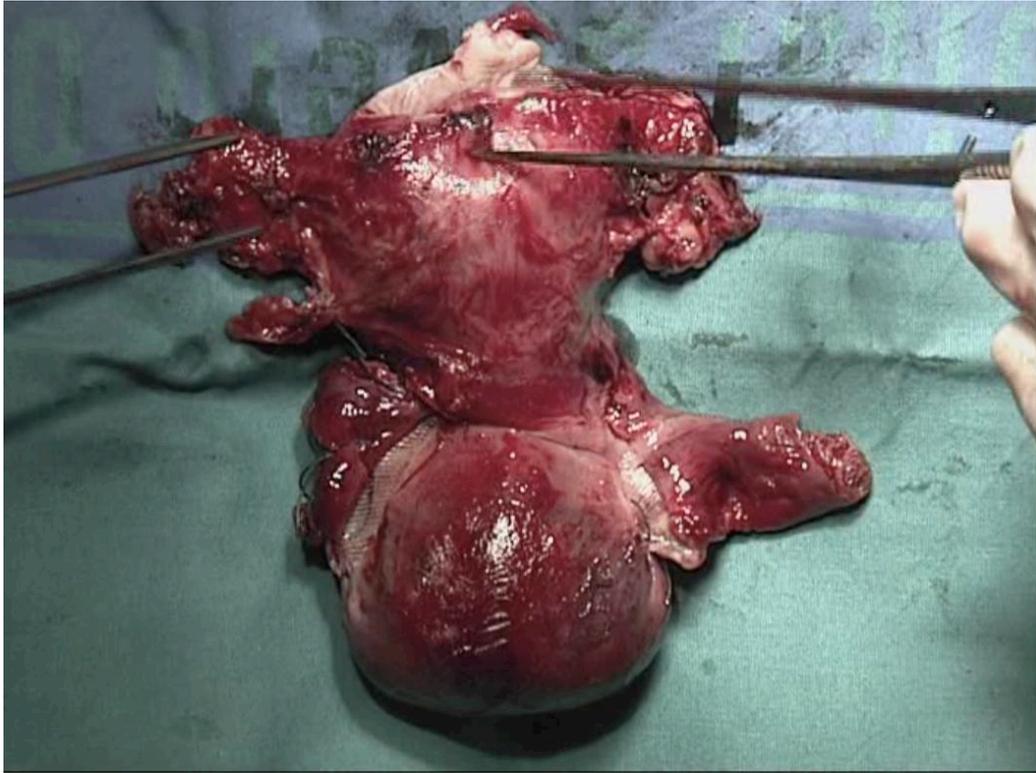


Figura 31. Pieza quirúrgica tras intervención Wertheim-Meigs (I).

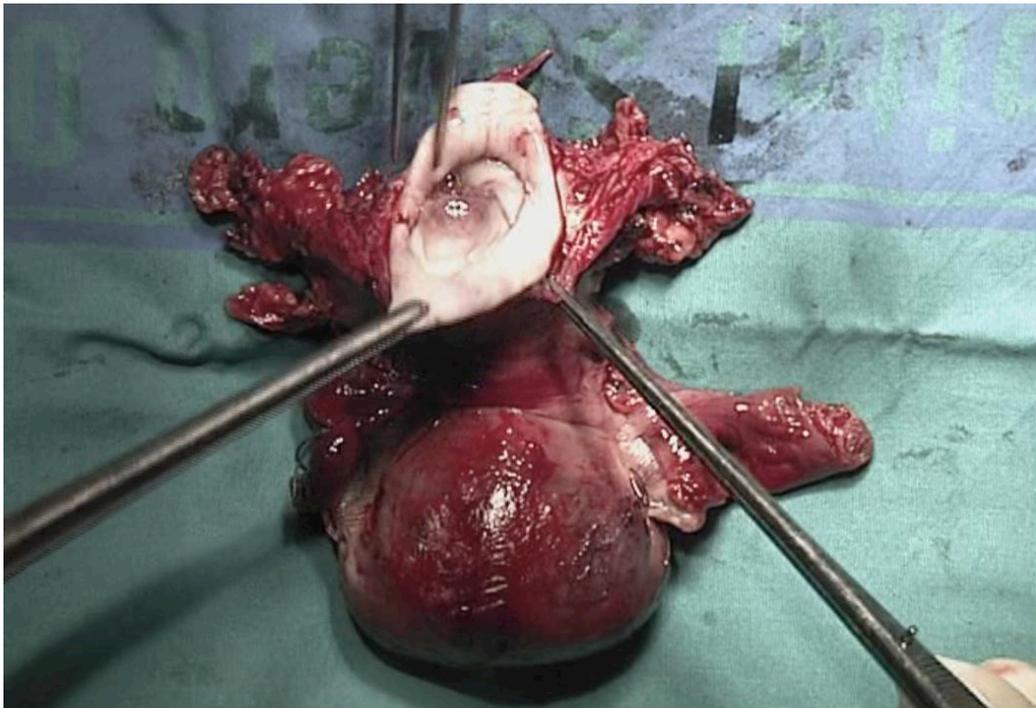


Figura 32. Pieza quirúrgica tras intervención Wertheim-Meigs (II).

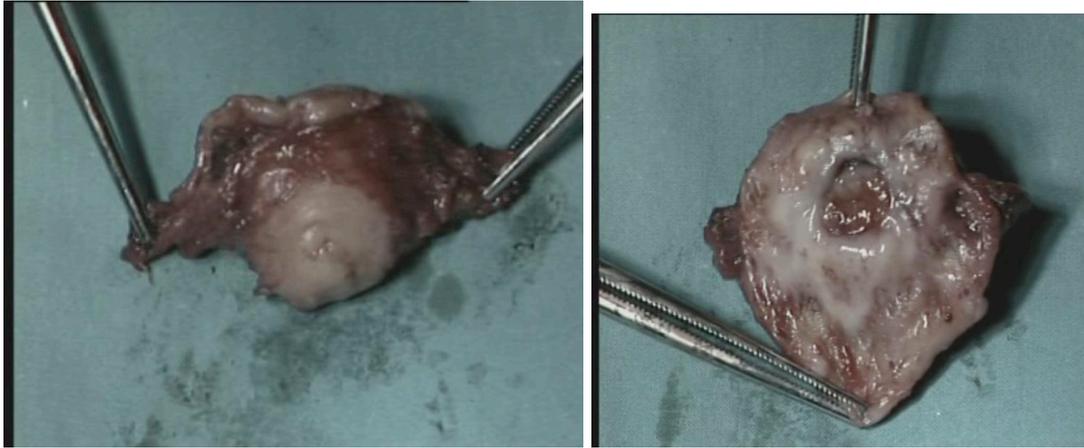


Figura 33. Pieza quirúrgica tras traquelectomía radical.

- IB2: Lesiones clínicas de más de 4 cm de tamaño. La cirugía en la actualidad no es el tratamiento primario aceptado, toda vez que la paciente en un estadio IB2 va requerir siempre de radioterapia complementaria y que la combinación de ambos tratamientos no supone una ventaja en la supervivencia<sup>68</sup>.
  
- Radioterapia pélvica y braquiterapia junto con quimioterapia concomitante. Cinco ensayos clínicos fase III, han mostrado que existe una ventaja en cuanto a la supervivencia en general, cuando se añade quimioterapia con cisplatino conjuntamente con radioterapia<sup>69</sup>. El riesgo de mortalidad por cáncer cervical disminuyó en un 30% a un 50% mediante el uso de quimiorradiación concomitante. Por lo que habría que tener en consideración este nuevo enfoque de modalidad combinada en aquellas mujeres que requieran radioterapia para tratamiento del cáncer cervical<sup>70,71,72</sup>.
  
- Radioterapia aórtica si existen ganglios aórticos positivos, en estadificación quirúrgica o sospecha en pruebas de imagen.

- ESTADIO IIA

La parte superior de la vagina se encuentra afectada sin llegar al tercio inferior. No hay afectación clínica del parametrio. En lesiones clínicas de no más de 4 cm de tamaño se sigue el mismo enfoque terapéutico que el estadio IB1 y en aquellas lesiones clínicas de más de 4cm de tamaño igual manejo que el estadio IB2.

- ESTADIO IIB/III/IVA

Valoración de adenopatías preaórticas mediante TAC abdomino-pélvico/ PET/ Estadificación quirúrgica.

- Adenopatías aórticas negativas:

Radioterapia pélvica y braquiterapia junto con quimioterapia concomitante.

Radioterapia preaórtica opcional a valorar con la paciente.

- Adenopatías aórticas positivas o muy sospechosas (fig. 34):

Radioterapia pélvica y braquiterapia junto con quimioterapia concomitante.

Radioterapia preaórtica.



Figura 34. Adenopatía preaórtica. (Fuente: protocolo SEGO<sup>58</sup>).

- Particularidades del IVA: Fístula recto-vaginal / Fístula vesico-vaginal, valorar exenteración pélvica dependiendo de la afectación preaórtica y parametrial. Otras opciones incluyen derivación fecal o urinaria previamente a quimiorradioterapia.
  
- ESTADIO IVB
  
- Radioterapia pélvica paliativa seguida de quimioterapia sistémica paliativa opcional.
  
- Si hay fístula urinaria o fecal, recomendable primero la derivación correspondiente (salvo en esperanza de vida muy corta).

Evaluación de respuesta dos meses postratamiento: si respuesta completa seguimiento, si persistencia valorar rescate quirúrgico (exenteración pélvica).

## TUMOR RECIDIVANTE DEL CUELLO UTERINO

El cáncer recidivante es aquel que vuelve a aparecer después del tratamiento. Puede volver a localizarse en el cuello del útero o en otro lugar.

### ➤ Recidiva local

Recidiva local o central en paciente radiada (cérvix, vagina, vejiga, recto o parametrio): realizar exenteración pélvica (anterior, posterior o total), se puede obtener una tasa de supervivencia a 5 años de un 32-62% en pacientes seleccionadas (fig. 35).

Si por el contrario aparece en paciente no radiada realizar radioterapia en combinación con quimioterapia, rescata un 40-50% de las pacientes.

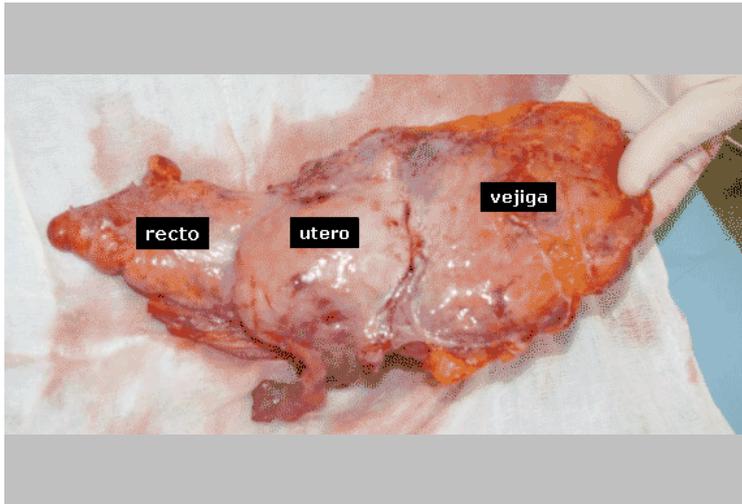


Figura 35. Pieza de exenteración pélvica total. (Fuente: protocolo SEGO<sup>58</sup>).

➤ **Recidiva a distancia**

Si metástasis única con un intervalo libre de enfermedad mayor de 12 meses realizar cirugía, radiación, quimioterapia o combinación de estas modalidades.

No hay tratamiento estándar para el cáncer cervical recidivante que se ha extendido más allá de los límites de un campo radioterapéutico o quirúrgico. Todas las pacientes son candidatas apropiadas para ensayos clínicos que evalúan combinaciones de fármacos o nuevos agentes anticancerosos.

### 1.7.3 BIOPSIA SELECTIVA GANGLIO CENTINELA

La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) es una técnica diagnóstica multidisciplinar, que implica la interrelación entre médicos especialistas en medicina nuclear, ginecólogos y patólogos. La técnica de detección intraoperatoria del ganglio centinela se basa en el patrón ordenado de la diseminación metastásica ganglionar, por lo que la ausencia de metástasis en el ganglio centinela presupone la negatividad de infiltración del resto de ganglios.

Cuando empezamos nuestro proyecto de tesis esta técnica aún no estaba puesta en marcha para el cáncer de cérvix, y en el manejo de nuestros casos no se realizó en ninguno de ellos, sin embargo hoy día es una técnica que ya se está utilizando, se encuentra en proceso de acreditación en algunos centros, por lo que incluimos un breve resumen de la técnica en la revisión del tema que hemos realizado.

El estado ganglionar es uno de los factores pronósticos más importante en el cáncer de cérvix uterino. Como hemos descrito previamente existen unas vías de diseminación linfática establecidas, una vía linfática anterior que pasa a través del ligamento vesicouterino hasta los ganglios interiliacos, una lateral que corre a través del parametrio lateral y que es la principal ruta de drenaje, y una posterior, menor, que pasa a través del ligamento sacro-uterino y a lo largo del uréter, hasta los ganglios presacros y preaórticos. A pesar de la complejidad del drenaje linfático del cérvix uterino, el carcinoma de cuello uterino es un buen candidato para el mapeo linfático ya que de acuerdo a la baja incidencia de afectación nodal en estadios precoces, más del 80 % de las pacientes que son sometidas a linfadenectomía no obtienen beneficio alguno del procedimiento y sin embargo deben estar expuestas a la morbilidad asociada a esta cirugía<sup>73,74</sup>. Por otra parte, una determinación exacta del estado ganglionar en esta

población permite seleccionar aquellas pacientes con ganglios linfáticos afectados para quimiorradiación sin la necesidad de emplear cirugía pélvica radical. La detección de invasión linfática por métodos de estudio diagnósticos preoperatorios, como la ecografía abdominal, la tomografía abdominopélvica y la resonancia magnética nuclear de pelvis, ha demostrado ser poco sensible.

Para la biopsia del ganglio centinela pueden usarse colorantes o coloides marcados con tecnecio 99, o una combinación de ambos métodos, que se inyectan peritumoralmente en el cérvix o en los 4 cuadrantes. La linfogammagrafía localiza el ganglio centinela y mediante la sonda detectora intraoperatoriamente, ya sea laparoscópica o laparotómicamente, y por visión directa del azul, se procede a la exéresis del mismo. Las localizaciones más frecuentes son: ilíaca externa (45-60%), obturatriz (38-50%), interilíacas o en ilíaca común (4-8%), presacros (4%) e intraparametriales (4%). La tasa de falsos negativos oscila entre el 0,5% y el 10%, siendo la localización más frecuente de metástasis en estos casos, los ganglios parametriales<sup>75</sup>.

La eficacia de detección de ganglios centinela es menor en caso de tumores avanzados (IB2-IIA) que en los incipientes (IA2-IB1). La técnica es aplicable en pacientes sometidas a tratamientos neoadyuvantes con quimioterapia y/o radioterapia.

En los últimos años, a medida que aumenta la supervivencia global de las pacientes con cáncer de cuello uterino en estadios precoces, se está prestando más atención a la preservación de la fertilidad y los procedimientos mínimamente invasivos. En este contexto, la aplicación de técnicas de identificación del ganglio centinela por vía laparoscópica en conjunto con la histerectomía radical por este abordaje constituye un avance significativo en el manejo de esta enfermedad, siendo múltiples las series donde se presenta el procedimiento realizado por vía laparoscópica<sup>76,77</sup>.

## 1.8 FACTORES PRONÓSTICOS

El pronóstico del cáncer de cérvix depende en gran medida de lo avanzada que se encuentre la enfermedad en el momento del diagnóstico. Sin embargo, el estadio clínico como factor pronóstico, debe ser complementado mediante varios hallazgos macroscópicos y microscópicos en las pacientes sometidas a cirugía. Estos incluyen: volumen y grado tumoral, tipo histológico, diseminación linfática e invasión vascular<sup>78</sup>.

En un estudio sobre estadificación quirurgicopatológica de pacientes con enfermedad en estadio clínico IB notificado por el Gynecologic Oncology Group (GOG)<sup>79</sup>, los factores que predijeron de forma más prominente las metástasis de ganglio linfático y una disminución en cuanto a la supervivencia sin enfermedad fueron el compromiso del espacio linfático capilar por el tumor, aumento en el tamaño del tumor, y un aumento en la profundidad de la invasión estromal, en lo que esta última fue la más importante y reproducible<sup>80</sup>.

El pronóstico ha ido mejorando a lo largo de los años. Esta mejoría es atribuible tanto a una correcta utilización de los recursos quirúrgicos, como al perfeccionamiento de las diversas técnicas de radioterapia. El pronóstico depende de los siguientes factores básicamente:

- El estadio clínico FIGO (y TNM)
- El volumen y grado del tumor
- El tipo histológico y grado de diferenciación celular
- La extensión linfática
- La invasión vascular

Otros factores, como la profundidad de penetración en el estroma (que al fin y al cabo tiene relación con el estadio), factores moleculares (como la sobreexpresión del oncogén c-myc, el número de células en fase S, etc), así como los derivados del tratamiento son también importantes.

- **Estadio clínico**

Probablemente es el factor pronóstico más significativo. La supervivencia global de una paciente con cáncer de cérvix tratada de forma correcta se sitúa en torno al 65.4% a los cinco años, existiendo una gran variabilidad según el estadio clínico en el que nos encontremos (IA 95-99%, IB 81%, IIA 66.3%, IIB 63.5%, III 33.3-38.7%, IV 9.4-17.1%)<sup>81</sup>.

A su vez, la incidencia de metástasis ganglionares va aumentando a medida que progresa el estadio de la enfermedad.

- **Tamaño tumoral**

Los tumores voluminosos, con diámetro superior a 4 cm. (estadio IB2 de la FIGO), tienen un riesgo de recidiva hasta tres veces superior a los tumores de menor tamaño. De la misma forma, existe una correlación entre el tamaño tumoral y la posibilidad de metástasis ganglionares (fig. 36).

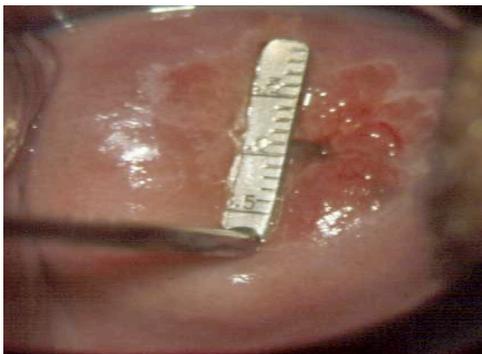


Figura 36. Tamaño de la lesión tumoral.

- **Afectación ganglionar**

El estado de los ganglios linfáticos regionales es un factor de pronóstico básico y de gran importancia en el cáncer de cérvix. La tasa de supervivencia a los cinco años en las pacientes con ganglios negativos oscila entre el 85 y el 90%, mientras que, en las pacientes en las que hay afectación ganglionar, la tasa de supervivencia varía entre el 20 y el 74%, dependiendo del número, tamaño y localización de los ganglios afectados. Las metástasis ganglionares se pueden identificar en el 36% de las pacientes con invasión parametrial y las metástasis para-aórticas suelen estar precedidas por las pélvicas.

- **Profundidad de la invasión tumoral**

La FIGO, en su clasificación por estadios, ya hace referencia a este parámetro subclasificando el estadio I en función de la invasión estromal. Se ha demostrado que el grado de penetración en el estroma condiciona la probabilidad de afectación ganglionar.

- **Tipo histológico**

Dentro de los tumores con mejor pronóstico, por su escasa tendencia a la invasión, tenemos los carcinomas verrucosos, papilares y villoglandulares. Al contrario, los carcinomas de células pequeñas presentan un peor pronóstico, dada su precoz extensión linfática e infiltración profunda del estroma, junto con una notable alta tasa de recidiva locoregional<sup>82</sup>.

- **Densidad vascular**

La densidad de la microvascularización tumoral se ha considerado un parámetro pronóstico independiente relacionado con la agresividad tumoral. Un incremento en la densidad vascular conlleva un mayor riesgo de metástasis linfáticas y una menor supervivencia.

- **Factores moleculares**

Después de varios años de investigación en el campo de la biología molecular están empezando a obtenerse los primeros resultados acerca de aquellos factores moleculares que, junto con parámetros clínicos y anatomopatológicos, pueden aportar información útil sobre las pacientes con tumoraciones más agresivas y con mayor riesgo de afectación linfática y de recidiva local, dotadas, por tanto, de un peor pronóstico y menor supervivencia.

Con todos estos datos disponibles podrían seleccionarse de entrada a estas pacientes susceptibles de beneficiarse de un tratamiento inicial más agresivo.

En este campo es en el que se centra nuestro trabajo y vamos a profundizar a continuación.

## 2. BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CÁNCER DE CÉRVIX

El cáncer es una enfermedad en la que se produce un crecimiento celular incontrolado; y tales células crecen de una manera anormal porque existe una lesión en el ADN. Por tanto, el cáncer es el resultado de un defecto adquirido del ADN celular que provoca una desregulación en el proceso de crecimiento celular. Así, la célula alterada se transforma en maligna y se hace independiente de los mecanismos reguladores normales, convirtiéndose en un clon de células malignas que al crecer producirán un tumor.

Para explicar las causas de la transformación de una célula normal en otra cancerosa, se han presentado numerosas hipótesis, o teorías de la carcinogénesis a lo largo del tiempo. Los estudios en biología molecular han ayudado a descubrir y entender que la transformación maligna ocurre a nivel genético (es decir, se trata de una enfermedad del genoma) aunque el mecanismo exacto no sea totalmente conocido. Además, esos estudios han revelado que la transformación maligna del cáncer es un proceso que engloba múltiples fases, desde la progresiva pérdida del control por parte de la célula cancerosa y el fallo en la reparación del ADN, hasta la pérdida de los sistemas de apoyo que previenen un crecimiento anormal.

Aunque el VPH desempeña un papel fundamental en la patogenia de la mayor parte de los cánceres de cuello de útero, sólo una pequeña minoría de las mujeres infectadas desarrolla un cáncer de cérvix invasivo. Esto sugiere que hay otros factores genéticos o ambientales implicados en la carcinogénesis cervical<sup>83</sup>.

Los genes que desempeñan un papel preponderante en el desarrollo del cáncer se dividen en dos grandes grupos: los oncogenes y los genes de supresión tumoral.

## 2.1 ONCOGENES

Los oncogenes son genes del control del crecimiento celular que están presentes, tanto en el genoma humano como en el de prácticamente todos los organismos multicelulares. El nombre de oncogen se debe a que éste grupo de genes se descubrió inicialmente en células cancerosas. Así que una incorrecta expresión de estos genes supone una alteración en la regulación del crecimiento celular, pero estos oncogenes son necesarios para el crecimiento celular normal.

Muchos de los productos de los oncogenes son parte del proceso de transducción de señales en la célula. La mayoría de las células del organismo son diana de factores de crecimiento, los cuales mediatizan sus acciones a través de la actividad tiroxincinasa de los receptores o de otros mensajeros intracitoplasmáticos. Algunos oncogenes codifican proteínas que actúan como factores de crecimiento, como receptores de estos factores, proteínas transmembrana con acción tiroxincinasa, moduladores de los mensajeros intracitoplasmáticos y hasta como proteínas que se unen al núcleo. Y se han descrito alrededor de 100 oncogenes en los cánceres humanos, y la mayoría de ellos en el proceso de transducción celular.

Algunos oncogenes más conocidos son: K-RAS, EGFR (erb-B), neu (erb-B-2), c-myc, CDKD1, CDK4, MDM-2, GLI...

Los oncogenes presentan dos formas: oncogenes celulares, que se encuentran en el ADN de todas las células, y oncogenes víricos. Estos últimos se presentan en el interior del genoma de un retrovirus, que tienen la capacidad de replicarse en las infecciones agudas o de insertarse en el ADN de las células infectadas y permanecer latentes hasta su reactivación posterior.

## 2.2 GENES DE SUPRESIÓN TUMORAL

Los genes de supresión tumoral su función es inhibir el crecimiento celular de aquellas células que presentan lesiones.

El gen p53 es un perfecto ejemplo de genes de supresión tumoral. Las mutaciones del mismo son las alteraciones genéticas más frecuentes, hasta en un 50% en los cánceres humanos. Este gen codifica una proteína de 53Kd (proteína p53) que se une en el núcleo y que en grandes concentraciones induce a la célula a la autodestrucción o apoptosis. Si el gen p53 se daña o ha sido mutado con anterioridad, no se produce esta autodestrucción, por tanto aunque se produzcan grandes cantidades de proteína p53, esta no será activa, y por tanto, no inducirá la apoptosis.

En síntesis, los genes de supresión tumoral no funcionan como reparadores del ADN, sino que previenen que una célula con lesiones en el ADN pueda replicarse.

Otro de los genes de supresión tumoral que explicaremos más adelante es la proteína del gen supresor tumoral del retinoblastoma (Rb).

## 2.3 CICLO CELULAR Y ONCOGENES

Como se ha mencionado anteriormente durante el proceso de transformación de las células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas. En este proceso de transformación se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como de la segregación del material genético.

Aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia. Avances recientes han permitido enfocar la investigación del cáncer hacia la identificación de algunos de sus factores etiológicos<sup>84</sup>.

El estudio del ciclo celular y su regulación han permitido conocer cómo la fidelidad y la integridad de la replicación del genoma son mantenidas por las funciones coordinadas de los puntos de control y de los sistemas de reparación del ADN. El funcionamiento adecuado de estos procesos puede ser alterado por mutaciones genéticas. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos moleculares de regulación que participan en la transformación celular pueden ser empleados como sistemas potenciales para instrumentar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer.

### CICLO CELULAR

La mitosis es el proceso por el cual una célula se divide dando como resultado dos células hijas genéticamente iguales a la madre, y recibiendo así los 46 cromosomas completos. La mitosis en sí misma, es decir el proceso de división nuclear, se realiza en un corto periodo de tiempo, pero forma parte de un proceso cuidadosamente programado llamado ciclo celular.

Justo después de la división celular, aquellas células que están destinadas a dividirse otra vez entran en el estadio llamado G1, mientras que las que no se dividirán más entran en la fase de reposo llamada G0. Las células en la fase G1 pasan después a la fase S, durante la cual el ADN se duplica. El resultado de ese proceso es que cada uno de los 46 cromosomas se duplica en dos cromátides hermanas exactamente iguales, unidas por una zona de constricción central llamada centrómero. Al final de la fase S se inicia la fase G2 que lleva a la mitosis propiamente dicha. Durante la mitosis, las cromátides hermanas y el centrómero se hacen patentes y se alinean para la separación. Ésta se realiza a nivel del centrómero de todas las 46 cromátides hermanas, de manera que cada una de ellas se dirige a una de las células hijas. Así se completa el ciclo celular normal (fig. 37).

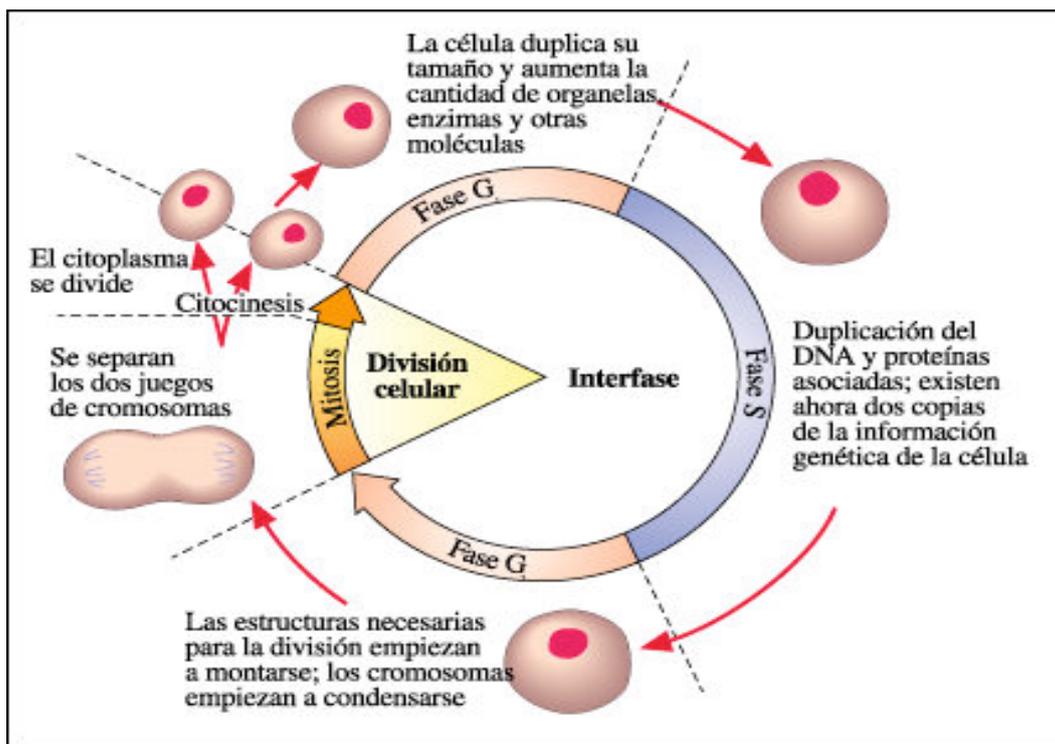


Figura 37. Esquema del ciclo celular (I). La división celular, constituida por la mitosis (división del núcleo) y la citocinesis (división del citoplasma), ocurre después de completarse las tres fases preparatorias que constituyen la interfase. (Fuente: Fisicanet).

Los reguladores de la progresión de la fase G1, es decir, los que permiten que la célula entre en división en vez de entrar en reposo, o fase G0, son los más afectados en la carcinogénesis. Durante la fase G1 la célula responde a ciertas señales extracelulares que le harán dividirse o permanecer en reposo en la fase G0. Al contrario de lo que ocurre en la transición hacia la fase S, G2 y M, la progresión de la fase G1 se basa generalmente en la estimulación por mutágeno y puede ser bloqueada por citoquinas antiproliferativas. Las células cancerosas pierden ese control y tienden a permanecer en el ciclo de replicación celular. Como la maduración y diferenciación celular se favorecen cuando las células salen de ese ciclo celular, las células cancerosas también tienden a perder esa propiedad.

Por tanto la decisión final sobre la división celular se toma cuando la célula pasa por una zona de restricción al final de la fase G1; después de ese punto, son refractarias a las señales extracelulares de regulación de crecimiento. Es por tanto necesario entender el control sobre esta zona, o punto de restricción, para comprender cómo y porqué las células cancerosas se dividen continuamente<sup>85</sup>.

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK: cyclindependent protein Kinases) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina). Los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. Por lo tanto, la dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, entre otros muchos sucesos.

Las cinasas dependientes de las ciclinas conducen el ciclo celular fosforilando determinadas proteínas críticas necesarias para que la célula progrese hacia la fase siguiente. Las CDK se expresan de forma constitutiva durante el ciclo celular, aunque en forma inactiva. Su activación tiene lugar por fosforilación tras su unión a otra

familia de proteínas, llamadas ciclinas. Al contrario que las CDK, las ciclinas sólo se sintetizan durante fases concretas del ciclo celular y su función consiste en activar a las CDK. Una vez completada esta tarea, los niveles de ciclina disminuyen rápidamente. Aunque cada fase del circuito del ciclo celular está cuidadosamente controlada, el paso de G1 a S es un punto de comprobación de extraordinaria importancia, ya que cuando la célula cruza esa barrera, se compromete a progresar indefectiblemente hacia la fase S (fig. 38).

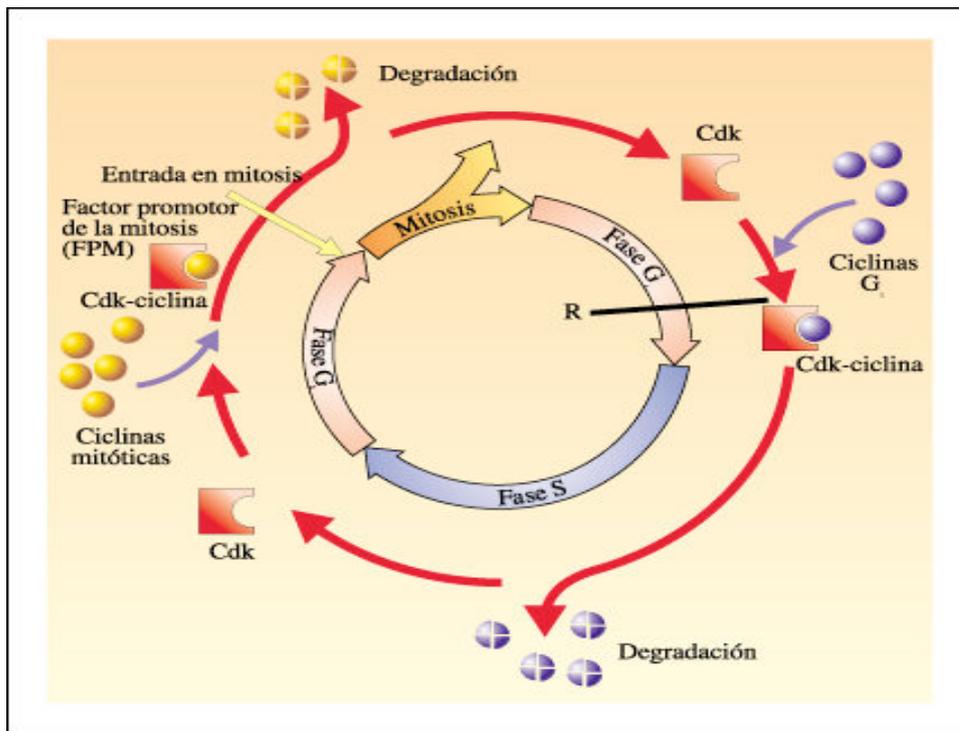


Figura 38. Ciclo celular (II). Las CDK se asocian con distintas ciclinas en las diferentes etapas del ciclo celular, formando el complejo CDK-ciclina. La activación de este complejo dispara procesos que conducen a la célula a través de las distintas fases del ciclo. La degradación de las ciclinas inactiva el complejo. (Fuente: Fisicanet).

El paso por la zona de restricción y la entrada en la fase S para la replicación del ADN, está controlado por unas proteincinasas dependientes de las ciclinas D, E y A.

Las cinasas dependientes de la ciclina D1 deben fosforilar algún sustrato o sustratos cuya modificación es necesaria para la salida del ciclo G1, y la proteína del gen supresor tumoral Rb (del retinoblastoma) es uno de esos sustratos<sup>86</sup>.

La proteína del gen Rb (*pRb*) y proteínas similares (como las p130 y p107) controlan la expresión genética a través de una familia de reguladores transcripcionales denominados colectivamente E2F, los cuales activan genes cuyos productos son importantes para la entrada en la fase S. Por tanto la proteína *pRb* se asocia con E2F durante la fase G1 y cuando *pRb* se fosforila libera a E2F, el cual participa en la transcripción de varios genes requeridos en el ciclo celular.

Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige. La interrupción de la proliferación es mediado por proteínas inhibitoras de la actividad de los complejos CDK-ciclina: la proteína *p27*, *p16* y *p21* las cuales bloquean la progresión del ciclo celular en la fase G1; aunque pueden tener otras funciones aún no conocidas. Estos mecanismos de control pueden ser activados por diferentes señales fisiológicas que pueden actuar sobre diferentes complejos CDK-ciclina.

Aunque la transición del ciclo celular depende del ciclo de las CDK, las zonas de control ayudan a asegurar que algunos procesos terminen antes de que otros empiecen. La diferencia fundamental entre las transiciones del ciclo celular y las operaciones de vigilancia es que éstas no son esenciales para que el ciclo funcione, sino que su papel es el de frenar el ciclo celular cuando se produce una lesión. Al permitir la reparación, los puntos de control son cruciales para mantener la estabilidad del genoma. Como se ha mencionado anteriormente el p53 es el gen que se muta con más frecuencia en los cánceres humanos y uno de los arquetipos de los reguladores de las zonas de

control. Una de sus funciones es asegurar que como respuesta al daño genómico, la célula descansa en la fase G1 e intente reparar su ADN antes de duplicarse. Además, hay evidencias que demuestran que *p53* interactúa con los complejos CDK-ciclina. De esta manera, *p53* puede reprimir la expresión de genes que participan en los procesos de replicación y transcripción del ADN, o bien, activa genes reguladores negativos de la proliferación celular, como *Rb*, produciendo interrupción del ciclo celular o muerte por apoptosis. La parada del ciclo celular inducida por *p53* se produce al final de la fase G1, y se debe a transcripción, dependiente de *p53*, del inhibidor CDK p21, que inhibe los complejos ciclina/CDK, por lo que evita la fosforilación de *Rb* necesaria para que la célula penetre en la fase S (fig. 39).

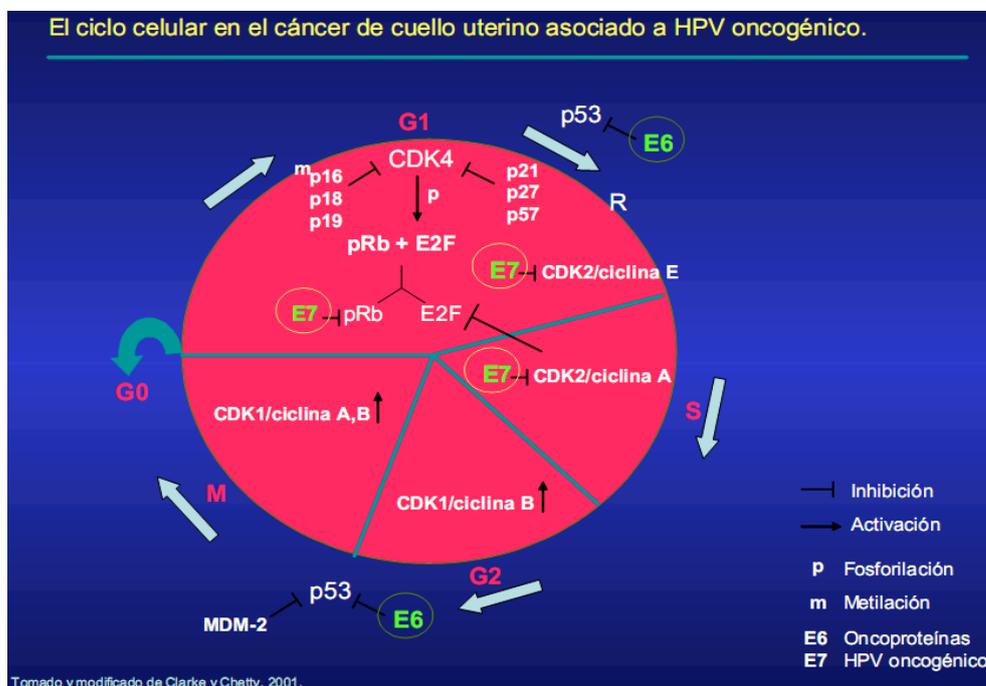


Figura 39. Ciclo celular (III). Ante señales promotoras crecimiento, en fase G1 inicial se estimula la síntesis de ciclina D, que se une a CDK4 y CDK6. En esta misma fase, se estimula la síntesis de ciclina E que se une a CDK2. Los complejos ciclina D/CDK4, D/CDK6 y E/CDK2 fosforilan a la pRb, que libera a las proteínas E2F que activan la transcripción de varios genes, cuyos productos son esenciales para la progresión hacia la fase S. La ciclina A, se une a CDK2 y CDK1 facilita el progreso de la célula por la fase S hacia G2. Al principio de G2 aparece la ciclina B, formación de complejos con CDK1, ayuda a la célula a pasar de G2 a M y fosforila diversas proteínas necesarias para la mitosis. La actividad de las CDK está regulada por dos familias de inhibidores, p21-p27-p57, que produce la inhibición general de las CDK, y p15-p16-p18-p19 que causa efectos selectivos sobre los complejos D/CDK4 y D/CDK6<sup>87</sup>.

La duplicación de los centrómeros empieza generalmente alrededor de la fase G1-S, pero en ausencia de p53 se generan múltiples centrosomas en una sola célula produciendo una segregación aberrante de los cromosomas durante la mitosis. Estos cambios son tan graves que provocan inestabilidad genética desembocando en cambios en el número de cromosomas y ploidia, aumentando la probabilidad de que las células evolucionen hacia la malignidad, escapen al control inmunitario, resistan mejor la hipoxia, se hagan invasivas, metastásicas y finalmente resistentes a la quimioterapia.

La cooperación entre las vías del Rb y del p53, posiblemente determinen si la p53 induce un descanso en la fase G1 o la apoptosis ante la lesión genética, inclinando la balanza hacia la apoptosis cuando se pierde el Rb.

Resumiendo en cuanto a la función de Rb en el control del ciclo celular: Rb es un gen supresor de tumores que inhibe la proliferación celular. Aunque directamente la función de pRb no se asocia con la interrupción del ciclo celular, existen evidencias de que la forma no fosforilada de pRb es responsable de la interrupción de la proliferación celular. Además, la fosforilación de esta proteína es crucial para su unión con otras proteínas involucradas en la activación transcripcional y en la regulación del ciclo celular. En las fases G0 y G1 tempranas del ciclo, pRb se encuentra hipofosforilada (forma activa). La fosforilación de pRb ocurre entre las fases G1 y S, y aumenta en las fases G2 y M (forma inactiva). Cuando la célula termina la mitosis pRb se defosforila. La actividad de pRb está principalmente asociada a inhibición de la proliferación celular.

De todo lo anterior se deduce claramente que, si falta la proteína Rb (por delección del gen correspondiente) o si una mutación altera su capacidad para regular los factores de transcripción E2F, el freno molecular del ciclo celular desaparecerá y la célula avanzará despreocupadamente hacia la fase S.

La expresión anormal de las ciclinas D, E y A, en asociación con varias CDK alteradas, en células deficientes de la función de p53, sugiere un mecanismo adicional de la pérdida de los puntos de control durante la transición de la fase G1 a la fase S en el proceso de tumorigénesis.

## 2.4 APOPTOSIS

La apoptosis es uno de los principales tipos de muerte celular programada. Como tal es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis. La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos pro- o anti-apoptóticos, regulados genéticamente, que actúan de forma activa (pues consumen energía) y equilibrada.

Los defectos en la maquinaria apoptótica, incluyendo sus miembros sensores-efectores y su interrelación, podrían conllevar al surgimiento del cáncer, enfermedades autoinmunes, difusión y persistencia de infecciones virales y desordenes neurovegetativos.

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. Un complejo balance entre la proliferación celular y la apoptosis mantiene la renovación celular normal. Los eventos genéticos conducen a un incremento en la proliferación y a una reducción de la apoptosis, que podría resultar entonces en el desarrollo de neoplasia.

En el ciclo celular, como se ha mencionado anteriormente, hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular G1, síntesis de ADN (S) y fase de control G2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.

Se han identificado una gran familia de genes reguladores de la apoptosis. Dentro de la cadena de apoptosis es donde cobra gran importancia el bcl-2.

Bcl-2 es una familia de proteínas formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular.

Su nombre deriva de la proteína fundadora, el protooncogén Bcl-2 (por sus siglas en inglés B-cell lymphoma 2), segundo miembro de un grupo de proteínas inicialmente descrito en estudios de la translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 observada en linfomas foliculares. A diferencia de otros oncogenes estudiados, bcl-2 no estaba implicado en el control de la proliferación celular sino en el bloqueo de la muerte celular, más específicamente de los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear, desorganización de la membrana plasmática y ruptura endonucleolítica del ADN. A su vez, por su localización mitocondrial, fue un primer indicador de la importancia de este orgánulo en los procesos de apoptosis.

Siguientes investigaciones demostraron la existencia de dos subfamilias homólogas pro-apoptóticas, Bax y BH3. Bax fue el primer homólogo identificado por su interacción con bcl-2: ratones deficientes en Bax presentaban una expansión selectiva de poblaciones celulares y la relación Bcl-2/Bax se describió clave en la susceptibilidad a apoptosis por la vía intrínseca.

Por tanto se conocen tres grupos:

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): Bax, Bak, Bok
- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): Bad, Bid, Bik, Blk, BimL

Estas subfamilias vienen definidas en parte por la homología con cuatro regiones denominadas dominios de homología Bcl-2 (BH). La subfamilia antiapoptótica presenta una conservación de los 4 dominios y estudios con Bcl-W permitieron determinar que los dominios BH1, BH2 y BH3 eran los responsables de formar una región hidrofóbica de interacción con los dominios BH3 de las proapoptóticas, produciendo su inhibición. Los miembros de la subfamilia Bax presentan dominios BH1-3 por lo que también se les conoce como subfamilia “multidominio”, en contraposición con la subfamilia BH3 que sólo presenta homología en el mínimo dominio de muerte celular, la hélice antipática BH3.

Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo *BH3-only* activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis.

Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia bcl-2 actúan como un reóstato, regulando la muerte celular programada. El cociente entre los antagonistas de la muerte (bcl-2, bcl-X1) y sus promotores (bax, bcl-Xs, bad, bid) determina la forma en que la célula responde a un estímulo apoptótico. El control de este reóstato radica, al menos en parte, en la dimerización competitiva entre diversos miembros de la familia. Así, mientras los homodímeros bcl-2 favorecen la supervivencia celular (posiblemente separando a la proteína formadora de canales bax de la membrana de las mitocondrias), los homodímeros bax favorecen la apoptosis. La consecuencia es que los factores que regulan la transcripción de los miembros de la familia bcl-2 pueden influir en la apoptosis (fig. 40).

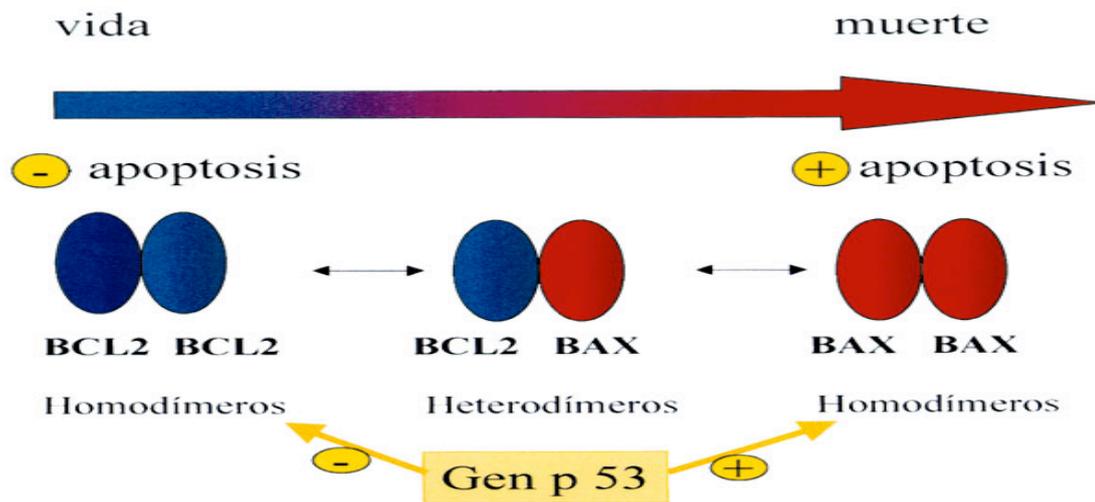


Figura 40. Genes reguladores de la apoptosis.

#### MECANISMO DEL PROCESO DE APOPTOSIS:

La apoptosis es el punto final de una cascada, dependiente de energía, de acontecimientos moleculares iniciada por determinados estímulos y constituida por cuatro componentes:

- Vías de señalización, que inician la apoptosis.
- Control e integración, donde moléculas reguladoras intracelulares inhiben, estimulan o favorecen la apoptosis y, por tanto, determinan la evolución.
- Una fase de ejecución común, consistente en el programa de muerte real y que se lleva a cabo principalmente por la familia caspasa de las proteasas.
- Eliminación de las células muertas mediante fagocitosis.

## 1. Vías de señalización

Los estímulos apoptóticos generan señales que, o bien son transmitidas a través de la membrana plasmática hasta moléculas reguladoras intracelulares, o bien se dirigen de manera más directa a ciertos objetivos presentes en el interior de la célula (fig. 41).

Las señales transmembrana pueden ser determinantes negativos o positivos de la apoptosis. Por ejemplo, ciertas hormonas, factores de crecimiento y citocinas generan cascadas de transformación de señal que suprimen programas de muerte preexistentes y que son, por tanto, estímulos normales para la supervivencia. Por el contrario, la ausencia de algunos de estos factores conduce al fracaso de la supresión de los programas de muerte y, de esta manera, desencadena la apoptosis. Otros reguladores positivos transmembrana de la apoptosis son las interacciones receptor-ligador en la membrana plasmática, que generan señales para la activación de los programas de muerte celular. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF).

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas -8 y -10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteín-kinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores.

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteín-quinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario.

Las señales intracelulares también pueden causar apoptosis. Como ejemplos podemos citar los agentes fisicoquímicos, como el calor, la radiación, radicales libres, la hipoxia y las infecciones virales.

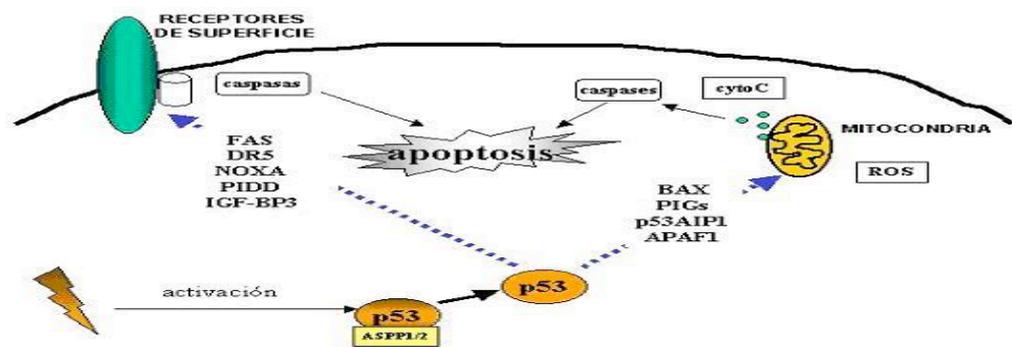


Figura 41. Inducción de las diferentes vías de apoptosis. (Fuente: Silva A y Gutiérrez A).

## 2. Fase de control e integración

Esta fase la llevan a cabo proteínas específicas que establecen la conexión entre las señales de muerte y el programa de ejecución. Las proteínas implicadas en esta regulación tienen un significado clínico: al determinar la vida o la muerte de grupos celulares implicados en procesos biológicos importantes (como la respuesta inmunitaria o el cáncer), pueden influir en la evolución de las enfermedades.

En términos generales, para esta fase existen dos amplios esquemas, que no tienen un carácter mutuamente excluyente (fig. 42):

- uno de ellos implica la transmisión directa de señales mediante proteínas adaptadoras específicas para el mecanismo de ejecución, como ocurre con el modelo de ligador Fas-Fas y para la destrucción de células efectoras por linfocitos T citotóxicos.
- el segundo esquema se refiere a los miembros de la familia bcl-2 de proteínas, que desempeñan principalmente una función mitocondrial reguladora.

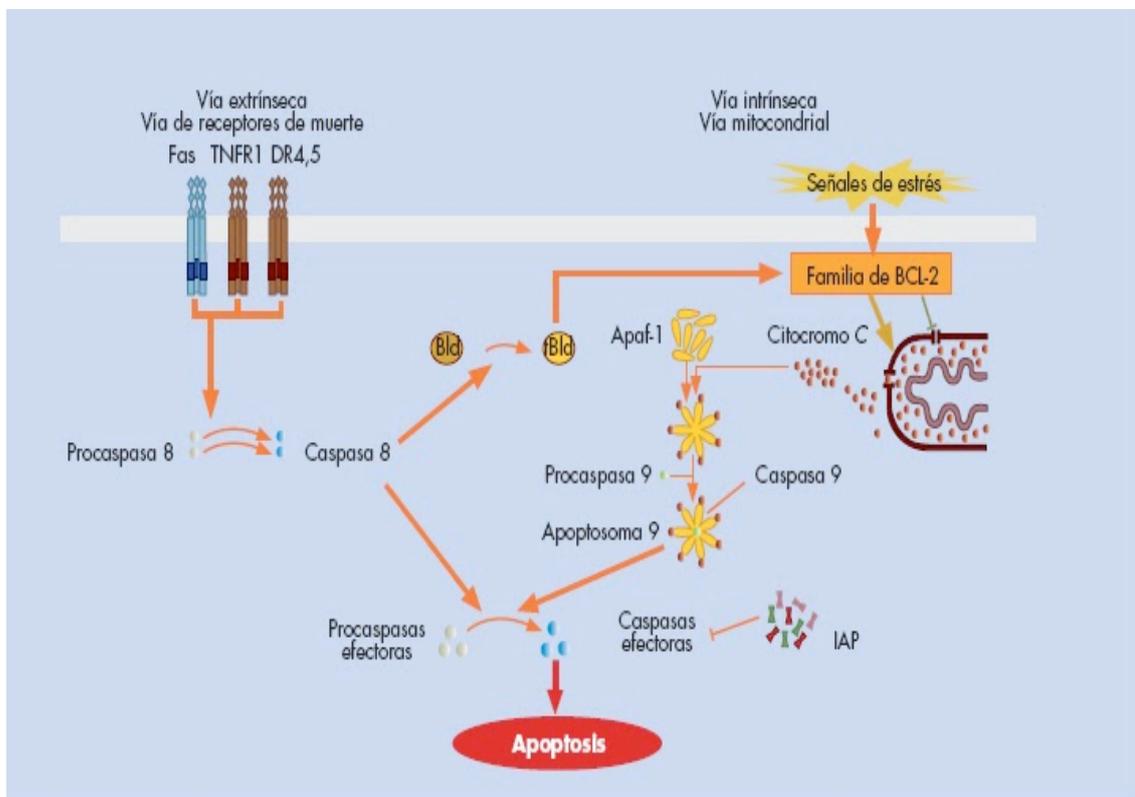


Figura 42. Vías de inducción de la apoptosis. (La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía extrínseca, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9). (Fuente: oncorred.blogspot.com)

Los agonistas de la muerte pueden generar señales que afectan a las mitocondrias de dos maneras:

- las señales apoptóticas dan lugar a transiciones de permeabilidad mitocondrial. La formación de poros en la membrana mitocondrial interna causa la reducción del potencial de membrana con tumefacción o hinchazón mitocondrial.
- las señales también producen un aumento de la permeabilidad de las membranas mitocondriales externas, con liberación de un estimulador de la apoptosis, el citocromo c, desde las mitocondrias al citosol. El citocromo c se localiza entre las membranas mitocondriales interna y externa, y constituye un componente integral, pero soluble, de la vía respiratoria. La liberación de citocromo c antecede a los cambios morfológicos de apoptosis, lo que demuestra que representa una función reguladora de inicio precoz. En muchos modelos de apoptosis, parece que un paso esencial en la cadena de acontecimientos es la liberación de citocromo c de las mitocondrias. Se cree que una de las funciones del citocromo c liberado consiste en ayudar a la activación de la enzima proteolítica caspasa 9.

Diversas proteínas regulan estos procesos de permeabilidad mitocondrial, pero las más importantes son los miembros de la familia bcl-2, que están implicados de forma importante en la carcinogénesis. Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplásmico y la cubierta nuclear. Su función está regulada por otros miembros de la familia. La forma precisa en que los miembros de la familia bcl-2 influyen en la activación de las caspasas es objeto de continua investigación.

Bcl-2 suprime la apoptosis de dos maneras:

- Por acción directa sobre las mitocondrias para impedir el aumento de la permeabilidad, y con efectos mediados por interacciones con otras proteínas. En efecto, se supone que la permeabilidad mitocondrial está determinada por el cociente entre miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia bcl-2 en la membrana. Hay ciertos datos que indican que Bax forma un canal en la membrana mitocondrial para permitir la salida del citocromo c (y, por tanto, la apoptosis), mientras que bcl-2 bloquea la actividad formadora de canales de bax.
- En ciertas células, bcl-2 también puede suprimir la apoptosis actuando como proteína de atracción, fijando proteínas del citosol y secuestrándolas en la membrana mitocondrial. La fijación de proteínas puede regular la función del propio bcl-2 o dirigir la proteína “atracada” para su interacción con otras proteínas. Entre estas proteínas fijadas por bcl-2, destaca el factor activador de proteasa proapoptótico (Apaf-1). Esta proteína también se asocia con formas inactivas de zimógeno de ciertas caspasas iniciadoras por ejemplo la caspasa 9. Se ha especulado con la posibilidad de que cuando el citocromo c es liberado de la mitocondria por señales de muerte celular, se une al Apaf-1 y lo activa, estimulando la caspasa iniciadora y poniendo en marcha los acontecimientos proteolíticos que destruyen la célula. En este escenario, la fijación que lleva a cabo bcl-2 tiene un carácter de protección debido a que secuestra el Apaf-1 e inhibe su función catalítica activadora de la caspasa, incluso aunque el citocromo c haya salido de la mitocondria (fig. 43).

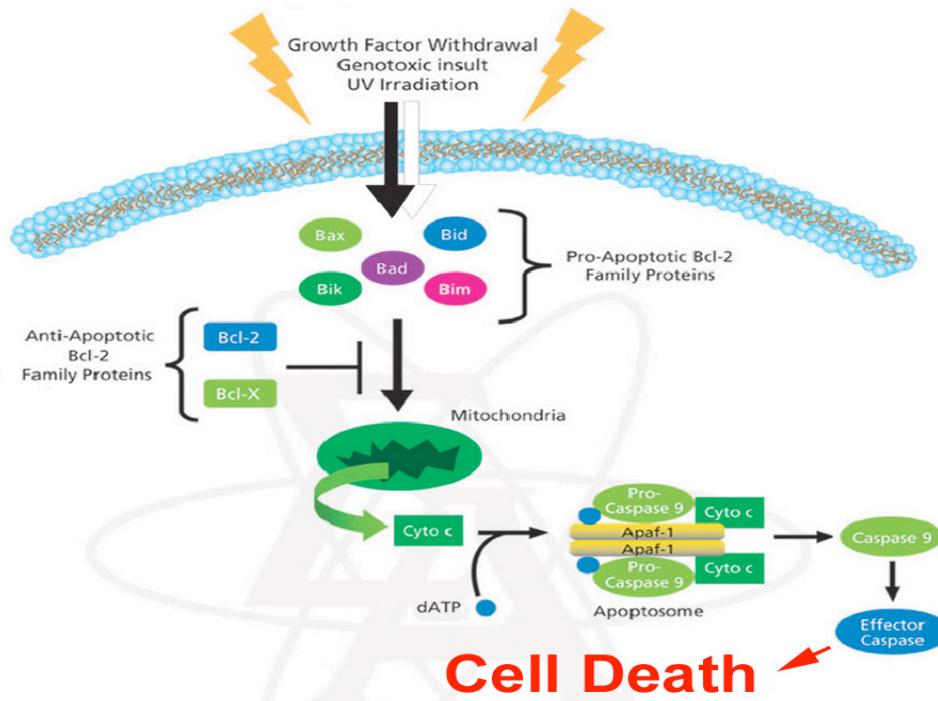


Figura 43. Vía intrínseca apoptosis. Mecanismo de actuación de bcl-2.

Los dos escenarios de las acciones antiapoptóticas de bcl-2, es decir, la inhibición directa de la liberación del citocromo c y la inhibición de la activación de la caspasa inducida por Apaf-1 a pesar de la liberación del citocromo c, no son mutuamente excluyentes.

Por último, aunque la familia de los genes bcl-2 desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis, existen al menos otros dos genes asociados al cáncer íntimamente relacionados con dicho fenómeno: el ya mencionado gen p53 y el protooncogén c-myc. El mecanismo molecular de la muerte celular inducida por estos dos genes establece intersecciones con las vías de acción de bcl-2. La activación de p53 provoca un aumento de la síntesis de bax, contrarrestando así la acción antiapoptótica de bcl-2. Por su parte, c-myc induce la apoptosis cuando las células se encuentran bajo el control de la activación de c-myc, pero en una situación en la que la disponibilidad de factores de crecimiento existentes en el medio es limitada. Al enfrentarse a estas

señales contradictorias, p53 y otras señales aún no definidas claramente, programan a las células para que mueran. La sobreexpresión de bcl-2 puede rescatar a las células de la apoptosis iniciada por c-myc. Por tanto, parece que c-myc y bcl-2 colaboran en la tumorigénesis: c-myc desencadena la proliferación, mientras que bcl-2 evita la muerte celular, incluso en situaciones de limitación de factores de crecimiento.

### **3. Fase de ejecución**

Esta fase de la apoptosis representa la vía final (una cascada proteolítica) hacia la que convergen múltiples señales heterogéneas y mecanismos reguladores. Las proteasas que inician y median en la fase de ejecución pertenecen a la familia caspasa (cisteinil-aspartato proteasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas, que se puede dividir funcionalmente en dos grupos básicos, iniciador y de ejecución del proceso catalítico. Al igual que muchas proteasas, las caspasas existen como zimógenos y deben sufrir una fragmentación de activación para que se inicie la apoptosis lo cual se realiza por diversas vías en las que participan varios complejos moleculares. Después de que se estimula una caspasa iniciadora, se pone en marcha el programa de muerte enzimática a través de una activación rápida y secuencial, actúan sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN.

### **4. Eliminación de las células muertas**

Las células apoptóticas y sus fragmentos presentan moléculas marcador en su superficie, lo que facilita su reconocimiento precoz por células adyacentes o fagocitos de manera que pueden ser fagocitadas y eliminadas.

## CÁNCER DE CÉRVIX Y BCL 2

Considerando que la infección por el VPH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la neoplasia cervical, muchas investigaciones han evaluado el impacto de esta infección viral en los eventos involucrados en la regulación del ciclo celular, como la apoptosis, para obtener un mejor entendimiento de la carcinogénesis cervical asociada al VPH oncogénico<sup>88</sup>.

Los papilomavirus humanos oncogénicos podrían modular el proceso de apoptosis y de las proteínas reguladoras apoptóticas por medio de la interacción directa de la oncoproteína viral E6-VPH alto riesgo con la p53, prolongando la expresión de bcl-2 y reduciendo la elevación de Bax<sup>83,89</sup>. Pero, además, E6 interactúa con otras proteínas involucradas en la apoptosis como Bak, el receptor del factor de necrosis tumoral, Fas y FasL y proteínas reparadoras del ADN (fig. 44)<sup>90</sup>.

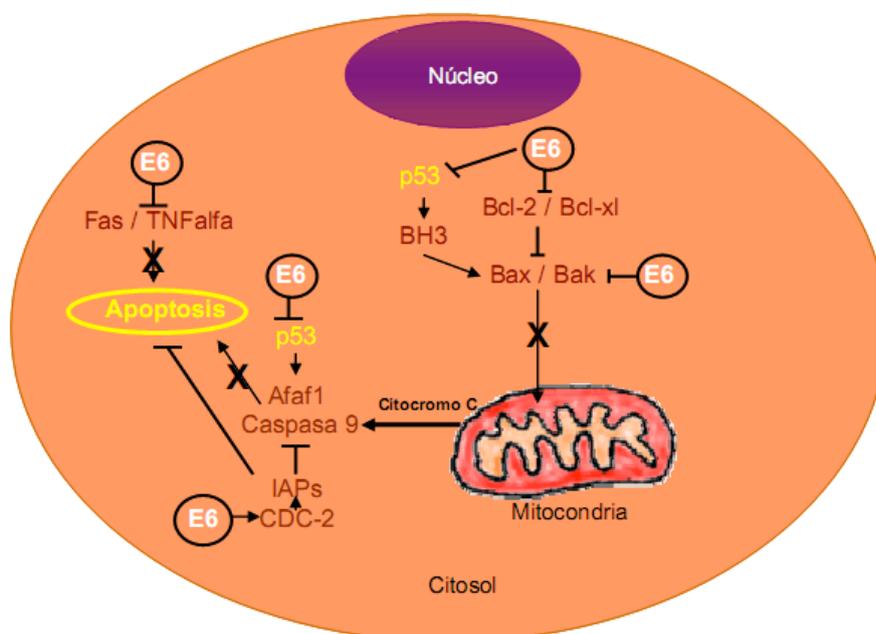


Figura 44. Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 del VPH. (Fuente: Li, et al<sup>88</sup>).

En varios tumores humanos, como los de origen mamario, colorectal, ovárico y en linfomas, se ha observado una asociación inversa entre los niveles de expresión de p53 y bcl-2. Sin embargo, en el caso del cáncer de cuello uterino existen controversias en los hallazgos encontrados al comparar la inmunodetección de estos biomarcadores<sup>91</sup>. Se ha observado según estudios, expresión incrementada tanto de p53 como de bcl-2, pero también se han obtenido resultados opuestos en la expresión elevada de p53 y bcl-2 disminuida<sup>92,93</sup>.

La inmunoreactividad elevada de bcl-2 se ha observado en más del 60% de las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado y también puede verse esta positividad, aunque con menor intensidad, en células malignas bajo condiciones de p53 inactiva<sup>94</sup>. Esta característica le confiere a dichas células una ventaja selectiva para la supervivencia y, a su vez, favorece el proceso de transformación maligna asociado a la presencia de VPH alto riesgo<sup>95</sup>. Por ello, podría atribuirse a bcl-2 un carácter de marcador de evolución o progresión<sup>90</sup>. Además, también podría ser considerado un marcador molecular para predecir el pronóstico de la enfermedad, por lo que sería de gran utilidad clínica<sup>93,96</sup>.

En lesiones cervicales in situ e invasoras de origen glandular también se observa expresión elevada de bcl-2, como lo demuestran diversos estudios<sup>97</sup>.

En resumen, el patrón de expresión de bcl-2 en lesiones del cuello uterino es variable. Aunque en la literatura predomina el hecho de que las neoplasias intraepiteliales escamosas muestran una positividad para bcl-2 que se va incrementando a medida que la lesión aumenta en severidad, tanto aquellas de origen glandular como escamoso, para los casos de cáncer cervical la variabilidad de patrones de expresión es más acentuada. Por esto, se precisan más estudios para aclarar su utilidad clínica en cuanto a marcador de evolución y de pronóstico.

## 2.5 PROLIFERACIÓN CELULAR

La proporción de células tumorales que se encuentra en el conjunto de proliferación se denomina fracción de crecimiento; en la fase inicial del crecimiento tumoral, la inmensa mayoría de las células transformadas forman parte de la fracción de crecimiento. A medida que el tumor va creciendo, las células malignas se mudan a la fase G0/G1.

Por lo tanto, el crecimiento tumoral es intenso en fases iniciales o subclínicas, para luego disminuir de manera tal que cuando se hace clínicamente detectable, la fracción de crecimiento puede estar bastante reducida.

La fracción de crecimiento tumoral es un factor que influye en el comportamiento de la neoplasia, por lo que la medición de este parámetro proporcionaría al clínico información de pronóstico y también sobre la respuesta tumoral ante la instauración de cualquier terapia.

La actividad proliferativa de un tumor se mide a través de la expresión inmunohistoquímica de diferentes antígenos, que sólo se expresan en células que se encuentren en fase proliferativa. Entre los antígenos que se han evaluado ampliamente en las neoplasias tenemos a Ki-67 y PCNA.

El antígeno Ki-67, es una proteína nuclear implicada en la regulación de la proliferación celular, se expresa exclusivamente en el núcleo de las células que se encuentran en fase de proliferación (G1, S, G2 y M) del ciclo celular y no se detecta en aquellas en fase G0, en reposo, o en fase G1 inicial. La utilización del anticuerpo monoclonal MIB-1 contra Ki-67 es considerada un medio sencillo, reproducible y confiable para evaluar en muestras de tejido, la fracción de crecimiento de las neoplasias malignas con relativa exactitud.

## PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL CÁNCER DE CÉRVIX

Las determinaciones de la proliferación celular y las anomalías en el contenido nuclear del ADN se han evaluado en lesiones precursoras y en tumores malignos del cuello uterino asociados a la infección por el VPH, como un marcador adjunto de diagnóstico y pronóstico<sup>98,99</sup>.

La evaluación inmunohistoquímica del antígeno Ki-67/MIB-1<sup>100</sup> se utiliza para predecir la progresión de las neoplasias intraepiteliales del cuello uterino hacia el carcinoma in situ y también, en el caso de cáncer cervical, para determinar el grado de agresividad tumoral y metástasis, demostrando tener en este último aspecto un valor pronóstico<sup>101</sup>.

La actividad proliferativa se expande por todo el espesor del epitelio displásico, observándose mayor intensidad a medida que la lesión aumenta en severidad. Por el contrario en el epitelio cervical normal los índices proliferativos elevados se ubican a nivel del estrato profundo y parabasal, mientras que las capas superiores e intermedias no muestran reactividad.

Por otra parte, la interacción de las oncoproteínas virales de los VPH de alto riesgo con las proteínas reguladoras del ciclo celular p53 y pRb que ocurre en la neoplasia cervical invasora, puede verse reflejada entre otras, mediante la expresión anormal de Ki-67. También se ha estudiado la proteína p16 que es un inhibidor de las ciclinas que participa en el “check point” G1 del ciclo celular, junto con la pRb y la ciclina D1. La p16 se encuentra sobreexpresada en las lesiones cervicales asociadas a cepas de alto riesgo del VPH. Con frecuencia coinciden la sobre-expresión de p16 y la expresión de Ki67 hasta en los estratos superiores del epitelio, descrito en lesiones intraepiteliales de alto grado<sup>102</sup>.

Por lo tanto, en la evolución de la patología del cuello uterino, Ki-67 es considerado un marcador de proliferación celular que debe evaluarse en conjunto con otros biomarcadores específicos que permitan revelar la existencia de alteraciones en el ciclo celular de la neoplasia cervical, incluyendo el estatus de la infección por VPH, con la finalidad no sólo de acertar en cuanto a pronóstico de la lesión, sino también para determinar su utilidad en la pesquisa de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras.

### 3. VACUNACIÓN PROFILÁCTICA

Las vacunas profilácticas frente al VPH han mostrado un impacto significativo en la prevención del cáncer de cérvix.

Las vacunas profilácticas utilizan como inmunógenos los antígenos de la cápside, ya que son accesibles a la respuesta clásica de anticuerpos neutralizantes (respuesta humoral)<sup>103</sup>. Mediante ingeniería genética y sistemas de recombinación, utilizando células eucariotas a las que se les ha insertado un fragmento de ADN, se sintetizan proteínas del antígeno mayor de la cápside L1 que poseen la capacidad intrínseca de autoensamblaje formándose partículas semejantes a virus o pseudovíricas denominadas VLP (virus like particles)<sup>104,105</sup>. Las VLP están desprovistas de ADN, por lo que carecen de capacidad infectiva, pero son antigénicamente semejantes a los viriones e inducen una potente respuesta humoral, con producción de anticuerpos neutralizantes (fig. 45)<sup>106, 107</sup>.

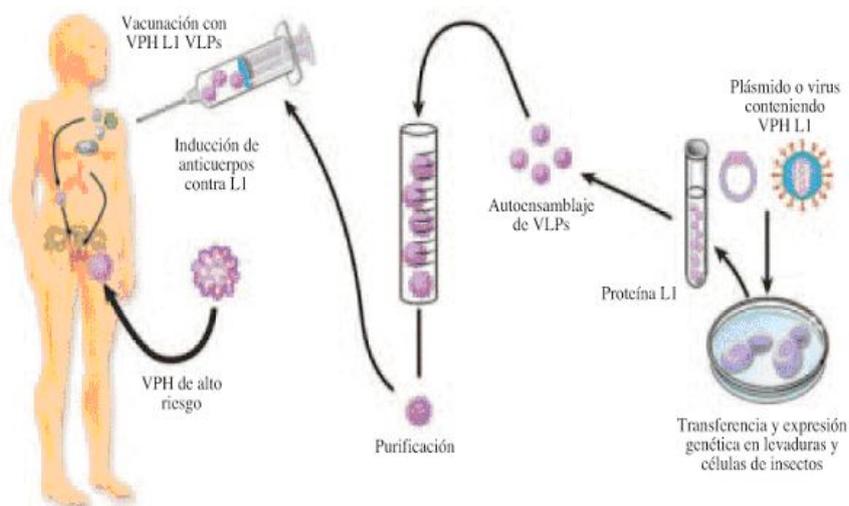


Figura 45. Síntesis de la vacuna profiláctica frente a VPH e inducción de inmunidad. (Fuente: Berzosky JA, et al<sup>107</sup>).

Existen dos modelos de vacuna VPH-VLP L1 que se han desarrollado comercialmente y se han evaluado en ensayos clínicos:

- Vacuna VPH-16/18 o bivalente (Cervarix®) desarrollada por GlaxoSmithKline. Dicha vacuna contiene VLPs no infecciosos producidos por la tecnología del ADN recombinante mediante la utilización de un sistema de expresión en Baculovirus, combinado con un compuesto de aluminio más lípido A monofosforilado (AS04), que permite protección e inducción de altos y prolongados títulos de anticuerpos, además de un aumento de la inmunidad mediada por células. Se administra vía i.m 0.5 ml, en 3 dosis a los 0, 1 y 6 meses<sup>108, 109</sup>.

- Vacuna VPH-6/11/16/18 o tetravalente (Gardasil®) desarrollada por Merck. Se trata de una vacuna recombinante no infecciosa preparada a partir de partículas similares al virus (VLPs) altamente purificadas de la proteína mayor de la cápside L1, expresada en células de levadura y adyuvada con hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo. Se administra intramuscular en tres dosis a los 0, 2 y 6 meses<sup>110</sup>.

Las vacunas frente al VPH han demostrado una elevada inmunogenicidad con títulos de anticuerpos 40-100 veces superiores a los inducidos por la infección natural tras la tercera dosis<sup>111</sup>. El 98.8% de las mujeres vacunadas con Cervarix® siguen siendo seropositivas frente al VPH 16 y 18 (con títulos entre 11-13 veces superiores, que tras infección natural) después de más de 7 años de seguimiento<sup>112,113</sup>. En las vacunadas con Gardasil®, el título de anticuerpos para el VPH 16 se mantiene por encima de la inmunidad natural en el 98% de las mujeres a los 60 meses, pero sólo el 60% son seropositivas a partir de los 44 meses para el VPH 18. Hasta el momento la caída de anticuerpos no se ha asociado a disminución de la eficacia<sup>114,115</sup>.

La eficacia de las vacunas frente al VPH radica en la inducción de elevados títulos de anticuerpos neutralizantes en plasma que alcanzan las mucosas por

trasudación/exudación, y bloquean a los VPH impidiendo la infección de las células nucleadas de la membrana basal<sup>116</sup>.

La protección cruzada de las vacunas frente a otros genotipos de VPH no incluidos en su composición se fundamenta en la relación filogenética que existe entre los distintos tipos de VPH. Las dos vacunas disponibles han demostrado cierto grado de protección cruzada, si bien los resultados en cuanto a la eficacia preventiva conferida por cada una de ellas es distinta.

Los efectos adversos más frecuentes consisten en reacciones locales y urticarias, pero se han documentado casos no esperados de síncope y eventos tromboembólicos agudos.

Ensayos clínicos con estos dos prototipos de vacunas profilácticas han demostrado su eficacia en la prevención de infecciones cervicales incidentes, transitorias y persistentes causadas por los VPH 16 y 18 así como para las alteraciones citológicas y las lesiones cervicales asociadas a dichos virus<sup>117,118</sup>. La reciente introducción de vacunas profilácticas contra el VPH permitirá en los próximos años una notable reducción del cáncer de cérvix y de la patología relacionada con el VPH entre la población vacunada<sup>119,120</sup>.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA**

---

---

Uno de los agentes etiológicos involucrados en el cáncer de cérvix es el virus del papiloma humano (VPH). Distintas líneas de investigación sugieren que en la patogénesis del cáncer del cuello uterino, la infección por VPH de alto riesgo condiciona la pérdida de algunas vías de regulación celular. Los genes E6 y E7 del VPH no sólo pueden ser importantes en el inicio del proceso de transformación, sino que parece que pueden desempeñar también un papel importante en el mantenimiento de la proliferación y del fenotipo maligno.

Además de la detección y tipificación del ADN-VPH, en la actualidad se están validando una serie de biomarcadores tumorales que permitan identificar aquellas pacientes con infección por VPH y cuya presencia provoque alteraciones celulares que evolucionen a un cáncer. Dichos biomarcadores son de interés cuando se usan en muestras citológicas obtenidas en el proceso de cribado de lesiones cervicales, como posibles marcadores de diagnóstico y de pronóstico. Concretamente, en la práctica clínica, se ha puesto en marcha la detección conjunta de las proteínas p16 y Ki-67 en muestras citológicas. Se trata de un biomarcador diseñado para la detección precoz de lesiones de alto grado, que proporciona un criterio más objetivo para identificar las mujeres que tienen más probabilidades de padecer una lesión de alto grado.

Hoy día nos encontramos que, a pesar de las campañas de screening y el éxito de las mismas, el problema del cáncer de cérvix aún no está resuelto. Siguiendo con las líneas de investigación comentadas previamente hemos planteado nuestro estudio con la intención de aportar más datos que ayuden al conocimiento y manejo del cáncer invasor de cérvix.

La progresión del cáncer de cérvix va a determinar el pronóstico de la paciente, por lo que el fin de nuestro estudio es intentar encontrar los puntos clave de la progresión neoplásica, buscar biomarcadores cada vez más específicos, y así poder predecir la evolución de la enfermedad, realizar un seguimiento más individualizado de cada paciente y buscar nuevos tratamientos más efectivos.

Para llevar a cabo el proyecto, en una serie de 78 casos de cáncer de cérvix hemos realizado:

1º) Estudio de la inmunoexpresión de los marcadores del ciclo celular, concretamente de la ciclina D1, del marcador de proliferación celular Ki-67, y marcadores de la vía de la apoptosis, como el bcl-2, con el objetivo de investigar si estos agentes moleculares permiten predecir la evolución y progresión de la enfermedad.

2º) Correlacionar la inmunoexpresión de estos marcadores con el tipo histológico, el grado de diferenciación y el estadio del tumor, y valorar si nos aportan información complementaria sobre aquellos tumores más agresivos, con peor pronóstico y menor supervivencia.

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---

## 1. MUESTRA DE PACIENTES Y MARCO DEL ESTUDIO

El estudio realizado es retrospectivo de una cohorte de pacientes diagnosticadas de cáncer invasor de cérvix.

La población objetivo del estudio está compuesta por pacientes diagnosticadas de cáncer invasor de cérvix durante los años 2004-2006 en la Sección de Oncología de la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Obstetricia y Ginecología del Hospital Materno Infantil (HMI), Carlos Haya de Málaga.

- Criterios inclusión: utilizando los archivos existentes se obtuvo el listado de casos de cáncer cervical durante los años mencionados y se seleccionaron los bloques de parafina con el tejido neoplásico incluido, así como las correspondientes preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina eosina, que en su momento, sirvieron para emitir el diagnóstico definitivo. Se seleccionaron los bloques más representativos de cada caso de carcinoma invasor de cérvix para llevar a cabo el estudio tanto de ciclina D1, bcl-2, Ki-67, así como la identificación y genotipado de VPH.
- Criterios exclusión: fueron excluidos 21 casos bien porque no se encontró el bloque de parafina correspondiente debido a que fueron biopsias extraclínicas (16 casos) o bien porque la pieza se obtuvo tras radioterapia por lo que no había hallazgo de tumor en el estudio histopatológico (5 casos).

Desde el año 2004 al 2006 se diagnosticaron 99 casos de cáncer de cérvix en la UGC de Obstetricia y Ginecología del HMI de Málaga. En términos de viabilidad de la muestra nos quedamos con 78 casos de cáncer de cérvix.

## 2. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del cáncer de cérvix se realizó a través de una serie de pasos, ya comentados previamente. Primero mediante la anamnesis se identificó a aquellas pacientes de riesgo, y se valoró los datos clínicos. Luego se pasó a la exploración, visualizando el cérvix mediante espéculo ya que en ocasiones se puede comprobar la existencia de una masa exofítica, friable, sangrante al contacto o un cuello deformado en tonel (barril) o una zona ulcerada como un auténtico cráter. También se realizó un tacto bimanual para valorar el tamaño y características del cérvix y útero y un tacto rectal para valorar la invasión parametrial. Luego se realizaron las pruebas complementarias oportunas y por último el estudio anatómo-patológico como prueba diagnóstica fundamental y definitiva, que se realizó mediante:

- Biopsia en sacabocados de la lesión. Es el método más usual, bien por visualización directa o bien guiado por las imágenes colposcópicas.
- Legrado del canal endocervical para los localizados en este conducto.
- Conización diagnóstica.

Por último se realizaron otras exploraciones dirigidas más hacia un diagnóstico de extensión loco-regional y a distancia, donde se incluyeron: analítica de sangre y orina, exploración del aparato urinario y digestivo, TAC, RMN, gammagrafía ósea y Rx de tórax.

En este apartado lo que queremos resaltar es a través de que técnicas utilizadas en estas pacientes se llegó al diagnóstico anatómo-patológico (tabla 4).

Tabla N° 4. Método diagnóstico del cáncer invasor de cérvix en nuestra serie de casos.

DIAGNÓSTICO	N° CASOS	%
LEGRADO	5	6,4%
CONIZACIÓN	8	10,3%
COLPOSCOPIA + BIOPSIA	7	9,0%
EBA + BIOPSIA	42	53,8%
LESIÓN MACROSCÓPICA + BIOPSIA	10	12,8%
AP PÓLIPO/HISTERECTOMIA	5	6,4%
DESCONOCIDO	1	1,3%
TOTAL	78	100,0%

(EBA: exploración bajo anestesia, AP: anatomía patológica)

La técnica más frecuentemente empleada, que se realizó en 42 de los casos ante la sospecha diagnóstica, fue la exploración bajo anestesia y toma de biopsia. En segundo lugar en 10 de los casos de nuestro estudio al realizar la exploración clínica se observó la lesión cervical macroscópica por lo que se tomó la respectiva biopsia. Le sigue en tercer lugar 8 casos en los que se realizó una conización tras informe citológico patológico, con su respectiva biopsia, y en el estudio histopatológico del cono obtenido vino informado de carcinoma invasor de cérvix. En 7 casos el estudio se realizó mediante colposcopia y toma de biopsia, suele ser en aquellos casos en los que la citología ha sido informada como patológica. En 5 de los casos que debutaron con metrorragia se realizó un legrado a través del cuál se llegó al diagnóstico. Y por último 5 de los casos se diagnosticaron tras estudio anatomo-patológico de la pieza quirúrgica tras intervención por patología benigna, 2 tras realizar una histerectomía total y 3 polipeptomias.

### 3. DATOS CLINICO-PATOLÓGICOS

De las historias clínicas se evaluaron y se recogieron en una base de datos las siguientes variables:

- *Edad paciente* (años)
- *Antecedentes gineco-obstétricos*: menarquia (edad), menopausia (edad), paridad (número de hijos)
- *Motivo de consulta* a través del cual se diagnosticó el cáncer de cérvix (1 metrorragia posmenopáusica, 2 hallazgo citológico, 3 síntomas, 4 diagnóstico extraclínico, 5 hallazgo histológico pieza quirúrgica)
- *Diagnóstico* (técnicas empleadas: 1 legrado, 2 conización, 3 colposcopia y biopsia, 4 EBA y biopsia, 5 lesión macroscópica, 6 estudio pieza quirúrgica)
- *Tipo histopatológico* (1 escamoso, 2 adenocarcinoma, 3 adenoide quístico, 4 adenoescamoso)
- *Grado de diferenciación histopatológica* (1 bien diferenciado, 2 moderadamente diferenciado, 3 pobremente diferenciado)
- *Afectación ganglionar* (1 si, 2 no)
- *Estadio del tumor* (I, IA, IB, II, IIA, IIB, III, IIIA, IIIB, IV, IVA, IVB)
- *Tratamiento realizado* (1 RT adyuvante, 2 Cirugía radical más RT+QT, 3 Cirugía radical más RT, 4 Cirugía radical, 5 RT+QT adyuvante, 6 RT+QT, 7 RT, 8 histerectomía seguida RT)
- *Supervivencia*: el calculo de la supervivencia se ha realizado desde el momento de la confirmación diagnóstica (fecha diagnóstico) hasta el 31 Diciembre del 2012, momento

en el que se revisó el estado actual de las pacientes (1 fallecida, 2 viva sin recidiva, 3 recidiva, 4 perdida seguimiento).

El resto de variables que se han evaluado, han sido resultado del estudio biomolecular realizado para la detección del VPH, y de los estudios de expresión inmunohistoquímica de los diferentes marcadores moleculares. Estos estudios se han realizado en el Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, y las variables son:

- *VPH* (1 positivo o 2 negativo)
- *Genotipo VPH* (numérica)
- *Biomarcadores*:
  - Ciclina D1: (1 Positivo, 2 Negativo)
  - Patrón expresión ciclina D1: 1 núcleo, 2 citoplasma, 3 núcleo más citoplasma, 4 negativo.
  - Ki-67: Porcentaje proliferación celular
  - Bcl-2: 1 negativo, 2 positivo

#### 4. ESTUDIO BIOMOLECULAR PARA DETECCIÓN DEL ADN DEL VPH POR PCR

El VPH es uno de los principales agentes patógenos asociados con el desarrollo de cáncer de cuello de útero. Hasta el momento se han identificado al menos 20 isotipos oncogénicos de VPH en el 95% de los tumores cervicales preinvasivos e invasivos.

Clínicamente la detección del virus VPH es importante para identificar a pacientes que pueden tener alto riesgo para desarrollar neoplasia cervical. El Kit para identificación y genotipado del VPH que hemos utilizado proporciona un método rápido para la detección de 21 isotipos de VPH, que representan el 95% de las infecciones por VPH en cérvix. Dentro de estos 21 tipos se incluyen cinco tipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44), catorce tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) y dos tipos de riesgo intermedio (53 y CP8304).

##### ▪ Procedimiento

El proceso se realizó manualmente siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

A) Extracción de ADN (aislamiento del ADN de las muestras). El protocolo de extracción de ADN se realizó a partir de tejidos incluidos en parafina (1-4 secciones de tejido de 10  $\mu$ m de grosor).

B) Amplificación por PCR. En la mezcla de amplificación se incluyeron todos los reactivos necesarios para la amplificación de un fragmento específico del genoma del VPH, así como un fragmento de ADN genómico conocido que se utilizó como control interno (se amplificó el gen de la p53), para comprobar que el procesamiento de la

muestra había sido correcto y que el ADN era de calidad óptima. Los productos de PCR que se obtuvieron estaban marcados con biotina.

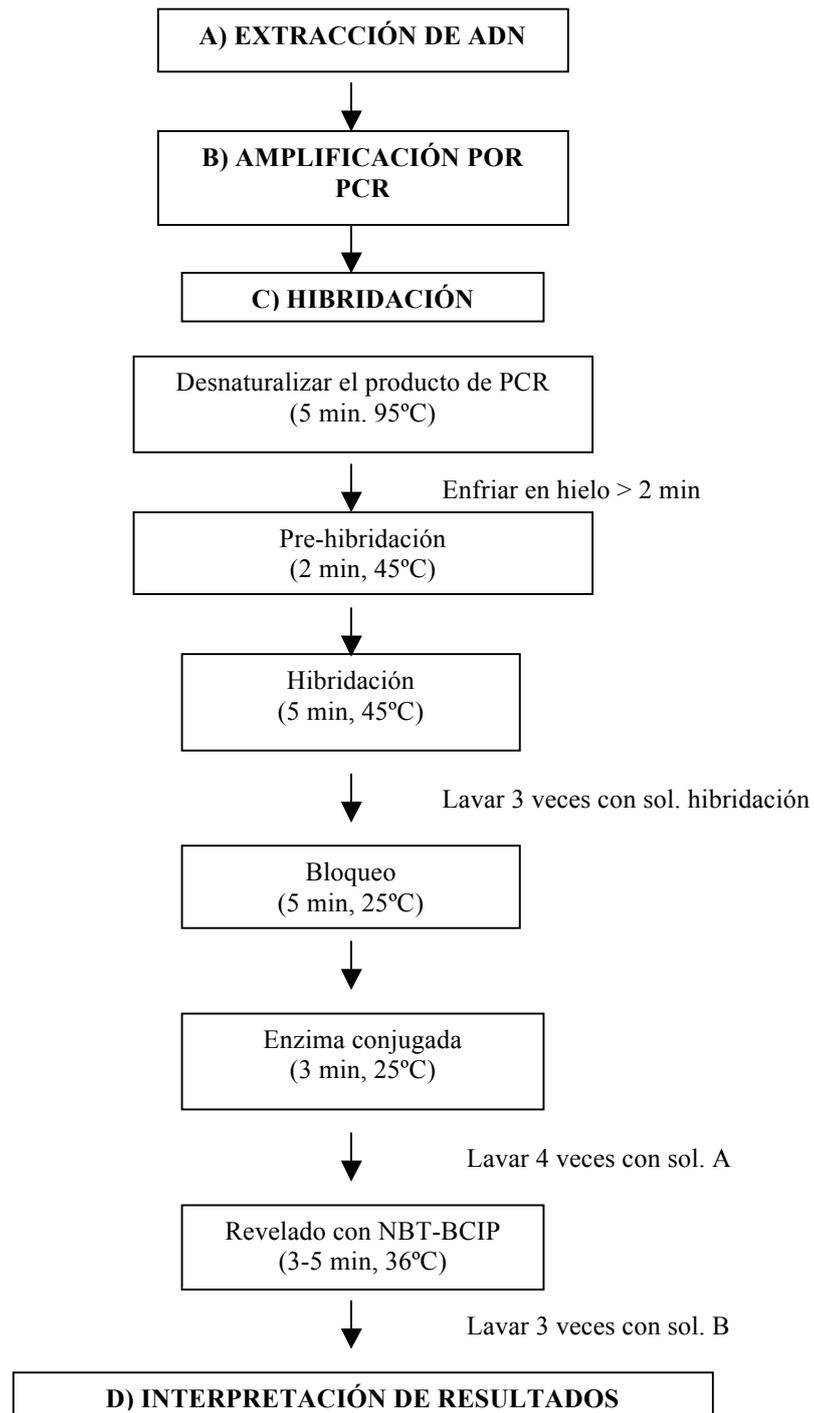
Control de calidad para PCR: Es importante incluir un control positivo y negativo de VPH en cada ensayo de PCR. El control positivo es necesario para demostrar la eficacia y especificidad de la PCR, mientras que el control negativo puede indicar si los reactivos para la PCR están contaminados. Como control negativo se utilizó una muestra donde se incluyeron todos los reactivos excepto el material genómico.

C) Hibridación

D) Interpretación de resultados. Se hizo utilizando un diagrama en el que se ilustra la localización de las 21 sondas específicas para cada tipo VPH en la membrana HybriMem VPH21. En la esquina superior izquierda se colocó biotina como control del proceso de hibridación, en el cuadrado inferior contiguo a éste, está la sonda para el control interno de ADN.

La determinación del VPH tras realizarlo en el estudio de investigación preliminar (34 casos), los datos obtenidos fueron acordes a lo publicado en la literatura, en el 97.1% de los casos el VPH fue positivo, y el genotipo más frecuente el VPH 16, por lo que asumimos para nuestra serie de cáncer de cérvix estos datos y no continuamos con el estudio en el resto de casos.

Resumen del procedimiento:



5. ESTUDIO DE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CICLINA D1,  
BCL-2 Y KI-67

La valoración inmunohistoquímica de los marcadores moleculares se realizó por dos observadores y en caso de duda un tercero.

Se realizaron cortes consecutivos, de 4-5 micras, en portas silanizados capilares y cada una de las preparaciones fue sometida al protocolo de tinción inmunohistoquímica que se describe a continuación, empleando, para visualización de la reacción antígeno-anticuerpo, el sistema de polímeros de MasVision (Master Diagnóstica).

- Tinción inmunohistoquímica:
  - 1) Desparafinar con xilol e hidratación en alcoholes decrecientes hasta agua destilada
  - 2) Recuperación antigénica en olla a presión ultrarrápida, utilizando como solución recuperadora de antígenos tampón citrato a pH=6
  - 3) Aclarar las preparaciones con agua destilada
  - 4) Lavar con PBS
  - 5) Colocar los portas, con sus controles correspondientes, en el equipo, donde se llevará a cabo de manera programada el proceso de tinción inmunohistoquímica
  - 6) Lavar con agua destilada
  - 7) Deshidratación en alcoholes crecientes, xilol y montaje

- Protocolo de inmunotinción:

<i>Paso programado</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>
Lavado buffer (PBS)	3.00
Anticuerpo primario	25.00
PBS	4.00
Anticuerpo secundario	25.00
PBS	2.00
Solución peroxidasa bloqueante	7.00
PBS	2.45
Estreptavidina-peroxidasa	25.00
PBS	4.00
Cromógeno (DAB)	5.00
PBS	2.15
Cromógeno (DAB)	5.00
PBS	2.15
Cromógeno (DAB )	5.00
PBS	1.50
Hematoxilina	1.00
PBS	4.50
Lavado (H2O)	1.30

Para el estudio inmunohistoquímico se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- **Ciclina D1**: anticuerpo monoclonal obtenido en conejo, clon SP4, isotipo Ig G de conejo, prediluido listo para uso. (Master Diagnóstica).

- **Bcl-2**: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, clon 100/D5, isotipo IgG1/kappa, prediluido listo para uso. (Master Diagnóstica).

- **Ki-67**: anticuerpo monoclonal obtenido en conejo, clon SP6, contra el antígeno Ki-67, que reconoce epítomos de proteínas entre 345 y 395 Kda, que se expresan en el núcleo de las células en proliferación. Prediluido listo para uso. (Master Diagnóstica).

- Análisis cuantitativo de la inmunotinción:

La cuantificación de la inmunotinción de ciclina D1 se valoró tanto en núcleo como citoplasma. Se consideró positivo  $\geq 5\%$  células reactivas.

En cuanto a la cuantificación de la inmunotinción de bcl-2 se valoró como positivo ( $\geq 5\%$  células reactivas) o negativo ( $< 5\%$  células reactivas).

Respecto a Ki-67 se cuantificó el número de núcleos tumorales positivos en relación al total de núcleos tumorales de cada campo seleccionado, y la cantidad de inmunotinción positiva detectada en esos núcleos. De esta manera se obtuvo el porcentaje de núcleos tumorales inmunorreactivos.

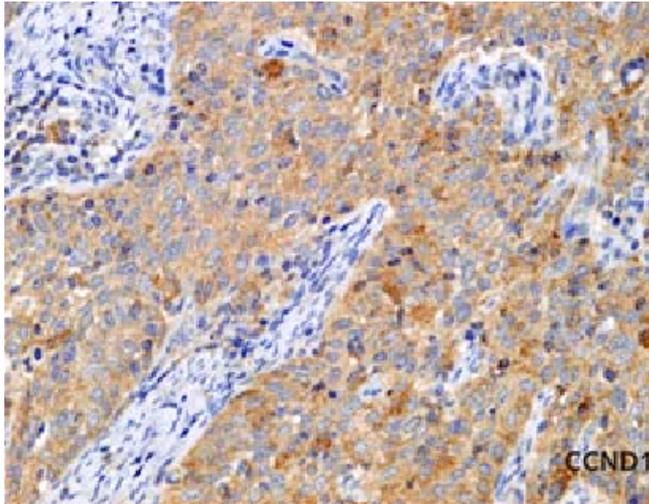


Figura 46. Carcinoma escamoso infiltrante. Ciclina D1 40x <sup>121</sup>.

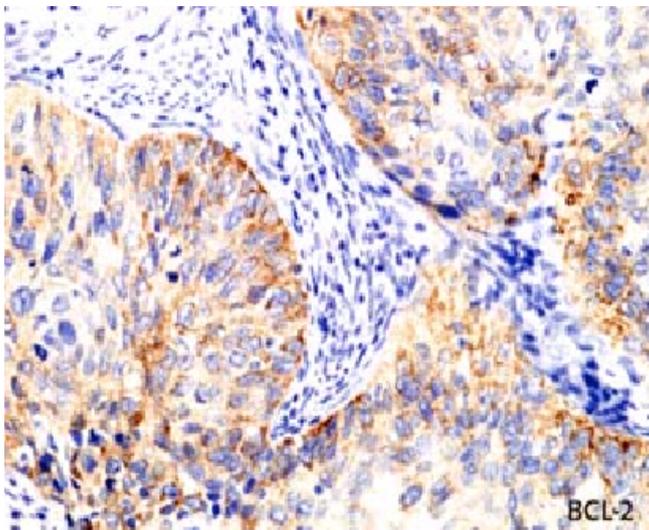


Figura 47. Carcinoma escamoso infiltrante. Bcl-2 40x <sup>121</sup>.

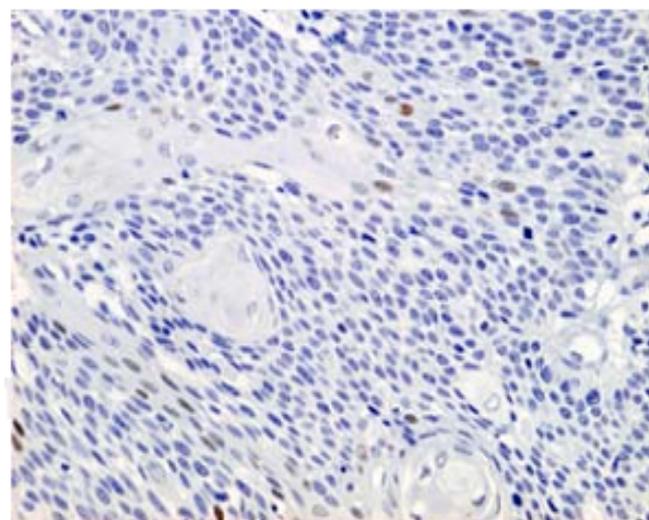


Figura 48. Carcinoma escamoso infiltrante. Ki-67 40x <sup>121</sup>.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información se procesó mediante el programa informático para bases de datos Microsoft Excel y se analizó mediante el programa estadístico Statical Package for the Social Science (SPSS, versión 19) para Windows.

La valoración estadística de los resultados se ha realizado mediante pruebas estadísticas descriptivas y analíticas o inferenciales.

### 6.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO

Su objetivo es obtener una descripción general de la distribución de las distintas variables en nuestra muestra.

El resumen de la información de las variables tratadas se presenta:

- Estudio de las variables cualitativas: mediante porcentajes o mediante distribución de frecuencias.
- Estudio de las variables cuantitativas: determinación de medias o determinación de la desviación estándar.

### 6.2 ESTUDIO ANALÍTICO O INFERENCIAL

Para contrastar las posibles asociaciones entre dos o más variables y la intensidad de esa asociación.

- Cuando se comparan dos variables de grupos independientes que siguen una distribución normal, se emplea el test t-Student. En caso de no cumplirse la

normalidad, se ha llevado a cabo el contraste de hipótesis mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

- En el caso de comparar más de dos grupos de una variable cuantitativa se ha hecho el Análisis de la Varianza (ANOVA), cuando la variable ha seguido una distribución normal. En el caso de no cumplirse la normalidad y/o homocedasticidad (igualdad de la varianza), se ha utilizado el test no paramétrico Kruskal-Wallis.
- En el caso de la relación entre dos variables cualitativas, se ha utilizado las tablas de contingencia para su descripción y el test Chi-Cuadrado como test de independencia/homogeneidad.

En todos los casos se ha considerado la existencia de significación estadística a aquella con  $p \leq 0.05$ , y el intervalo de confianza se estableció en el 95%.

### 6.3 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA

En todos los pacientes se estudió, mediante curvas de Kaplan y Meier, la supervivencia global considerando el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta la muerte del paciente y el tiempo hasta la primera recidiva y/o progresión. Estos tiempos se relacionaron con variables clínico-terapéuticas y tumorales seleccionadas y las curvas resultantes se compararon mediante los test de Long Rank y Wilcoxon con el objeto de conocer las diferencias significativas.

## 7. ASPECTOS ÉTICOS Y PROTECCIÓN DE DATOS

El estudio se adaptó estrictamente a las leyes de protección de datos y de protección de los derechos de los pacientes. No se hizo referencia alguna a sus nombres ni se les identificó en ningún informe o publicación.

Los datos personales se desvincularon permanentemente de los datos clínicos con el fin de proteger la identidad de las participantes (método de “anonización” de datos).

## **IV. RESULTADOS**

---

---

## 1. ESTUDIO DESCRIPTIVO: DATOS CLINICO-PATOLÓGICOS

En primer lugar presentaremos los resultados del análisis estadístico de algunos parámetros clinicopatológicos generales de nuestra serie de casos, seguido de los hallazgos correspondientes a la determinación biomolecular de VPH y a la expresión inmunohistoquímica de los marcadores estudiados, ciclina D1, bcl-2 y Ki-67 en el cáncer invasor de cérvix.

### ▪ EDAD

El rango de edad de las pacientes diagnosticadas de cáncer invasor de cérvix fue de 35 a 84 años, con una media de edad de 52.17 años.

En el siguiente gráfico observamos como se distribuyen los casos de cáncer de cérvix por intervalos de edad (fig. 49).

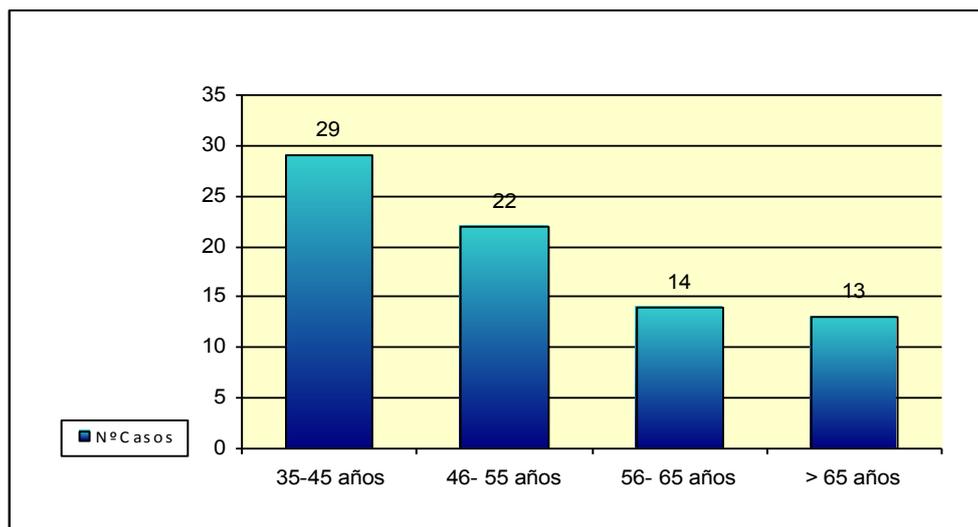


Figura 49: Distribución de los casos de cáncer invasor de cérvix por grupos de edad (años). N=78

Observamos como en nuestra serie la incidencia mayor de cáncer invasor de cérvix lo tenemos en el grupo de pacientes con una edad comprendida entre los 35-45 años, con 29 casos, seguido del grupo de pacientes con edades comprendidas entre los

46 y 55 años, donde tenemos 22 casos y como luego el número de casos disminuye a partir de los 56 años.

Por lo tanto, la mayor proporción de pacientes se encontró en el intervalo de edad comprendido entre lo 35 y 55 años, que representa el 65%. Importante el dato de un 37% de casos entre 35 y 45 años porque dentro de este grupo mayoritario es donde se encuentra pacientes en edad reproductiva aún.

Si consideramos la edad de las pacientes de acuerdo al tipo histológico de cáncer cervical encontramos que de los 15 casos de adenocarcinoma el mayor número de casos se encontraba en el grupo de edad de los 35 a los 45 años.

▪ ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

- ✓ En cuanto a la **menarquia** en la mayor parte de las pacientes fue a los 11-13 años (tabla 5). La **formula menstrual** (FM) de las pacientes se caracterizó por ser ciclos regulares en la mayoría de los casos y con una duración normal (FM 4/28).
- ✓ Respecto a la **menopausia**, 40 de las pacientes ya se encontraban en este estado, en el mayor número de ellas se produjo en el intervalo de edad de los 48 a los 53 años (tabla5).

Tabla N° 5. Edad de la menarquia y menopausia de las pacientes.

ANTECEDENTES		N° CASOS	%
MENARQUÍA	≤ 10 años	3	5,1%
	11-13 años	47	79,7%
	≥ 14 años	9	15,2%
MENOPAUSIA	42-47 años	5	16,1%
	48-53 años	23	74,2%
	≥ 54 años	3	9,7%

(Menarquia N=59, Menopausia N=31)

- ✓ En cuanto a la **paridad** (fig. 50) el número medio de hijos fue de 2.04. En el siguiente gráfico podemos ver como se distribuye:

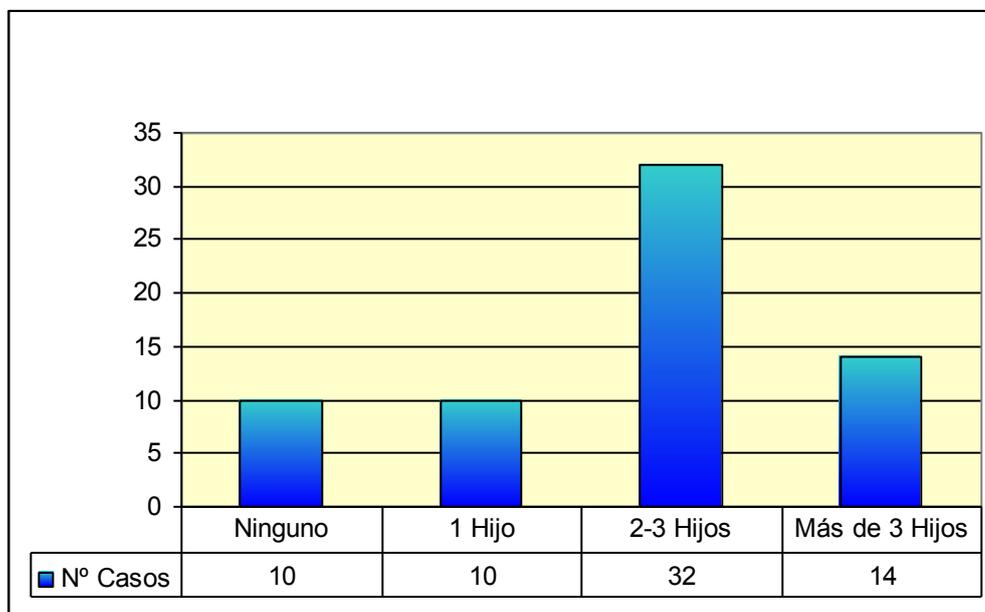


Figura 50: Distribución del número de hijos en las pacientes diagnosticadas cáncer de cérvix. N=66

En doce de las pacientes no constaba este dato por lo que no las hemos incluido en este análisis.

Con el gráfico observamos que lo más frecuente en nuestra serie de casos, donde se concentra el mayor número, es en la columna de dos o tres hijos, la mayor incidencia de cáncer de cérvix por tanto se agrupa en aquellas pacientes multíparas.

- **MOTIVO DE CONSULTA**

Nos ha parecido interesante analizar el motivo de consulta de las pacientes, es decir, como se presentó el cuadro en cada una de ellas y por lo que acudieron al servicio de nuestro hospital (fig. 51). De los 78 casos analizados obtuvimos los siguientes datos:

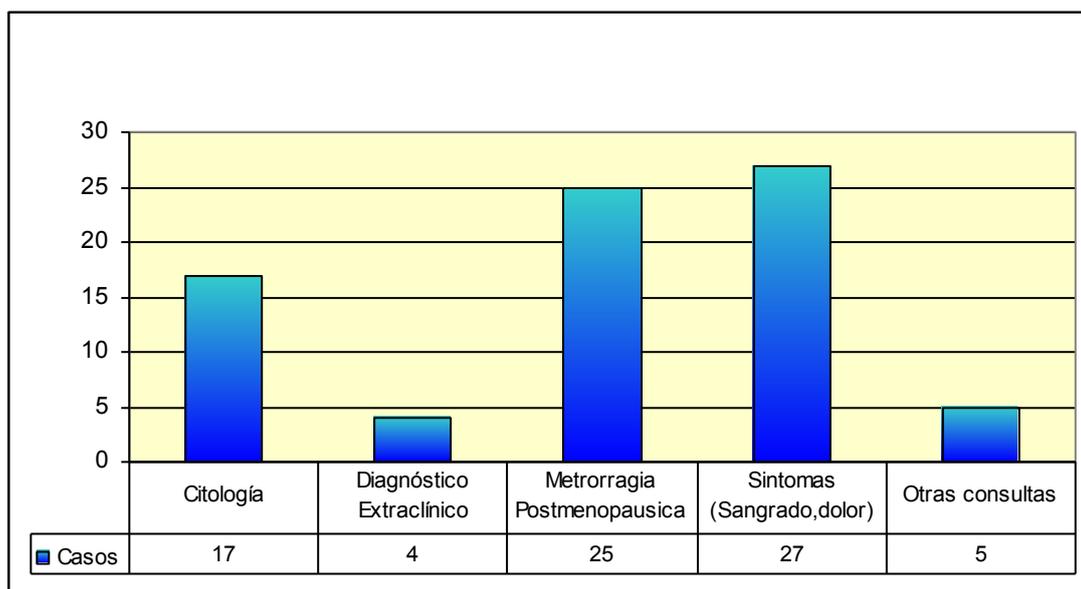


Figura 51: Distribución de los casos por motivo de consulta. N=78

El grupo más numeroso fue aquel en el que englobamos a aquellas pacientes que debutaron con algún síntoma propio del carcinoma invasor de cérvix. La mayor parte de los casos consultaron por sangrado, que suele ser el síntoma más precoz y característico. En este grupo englobamos a aquellas pacientes que aún no se encontraban en la menopausia ya que las metrorragias postmenopáusicas las clasificamos en un grupo aparte. También otro de los síntomas referidos fue la coitorragia y ya en estadios más avanzados un caso consultó por dolor pélvico, otro por masa cervical y otro por un cuadro de uropatía obstructiva.

Es de destacar cómo de las 40 pacientes que eran ya menopáusicas en 25 de ellas el primer síntoma con el que debutó el cuadro, previo al diagnóstico de carcinoma invasor de cérvix, fue la metrorragia.

También observamos cómo de los 78 casos en 17 de ellos se llegó al diagnóstico tras el hallazgo inicial de una citología patológica.

Cuatro casos fueron remitidos de otros centros con el diagnóstico ya realizado de carcinoma invasor de cérvix por lo que no tenemos recogido en la historia clínica el cuadro con el que debutó el proceso en la paciente.

Por último englobamos como otras consultas: tres casos que fueron diagnosticados tras el estudio de polipos endocervicales que se extirparon en consulta y 2 casos fueron hallazgo anatomopatológico de histerectomías realizadas por patología benigna.

#### ▪ ESTADIO

En cuanto al estadio en el que se encontraban los 78 casos de carcinoma de cérvix en el momento del diagnóstico lo describimos a continuación en la tabla 6.

Tabla N° 6. Estadio Cáncer de Cérvix. (N=78)

ESTADIO	Nº CASOS	%
IA	2	2,6%
IB	20	25,6%
IIA	4	5,1%
IIB	33	42,3%
III	1	1,3%
IIIA	1	1,3%
IIIB	12	15,4%
IVA	3	3,8%
IVB	2	2,6%
TOTAL	78	100,0%

Podemos observar como el mayor número de pacientes se encontraban en el estadio IIB en el momento del diagnóstico.

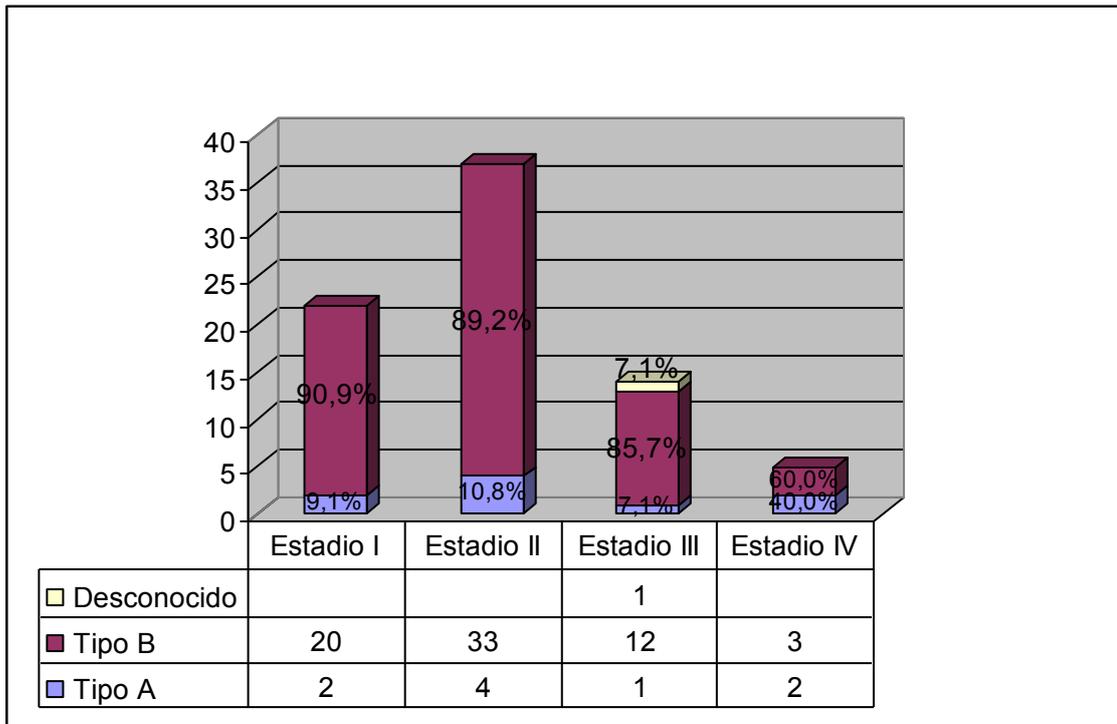


Figura 52: Distribución de casos según estadio. N=78

Como podemos observar en la figura 52, de los 22 casos que tenemos en estadio I, que es el carcinoma estrictamente limitado al cérvix, 2 se encontraban en estadio IA (carcinoma invasivo sólo diagnosticado por microscopio; invasión del estroma con una profundidad máxima de 5mm y no más de 7mm de diámetro), los otros 20 casos eran estadio IB (lesiones clínicas limitadas al cérvix o lesiones preclínicas de mayor extensión que IA).

En el estadio II el carcinoma se extiende más allá del cérvix uterino, pero no llega a la pared pélvica. En nuestro estudio 4 casos se encontraban en estadio IIA (la parte superior de la vagina se encuentra afectada sin llegar al tercio inferior) y los 33 casos restantes en estadio IIB (afectación del parametrio proximal, pero sin llegar a la pared pélvica lateral).

En el estadio III el carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. En el IIIA hay extensión al tercio inferior de vagina, donde tenemos un caso, y en el IIIB existe extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal, estadio en el que se

encontraban 12 casos. Tenemos un caso que se encontraba clasificado en estadio III pero no especificaba si A o B.

El estadio IV implica: IVA, el tumor se ha propagado a órganos adyacentes a la pelvis y IVB en el cual la propagación es a órganos distantes. De los 5 casos en este estadio, dos se encontraban en estadio IVA por infiltración de la vejiga y 3 en estadio IVB por la existencia de metástasis distales.

#### ▪ TRATAMIENTO

Respecto al tratamiento aplicado en las 78 pacientes, a continuación exponemos el tratamiento definitivo realizado después de que en cada caso en particular fuese valorada la estrategia terapéutica, dependiendo del estadio tumoral, de la edad de la paciente y dependiendo de su estado general (tabla 7).

Tabla Nº 7. Tratamiento realizado en los casos de cáncer de cérvix. (N=78)

TRATAMIENTO	Nº CASOS	%
RT ADYUVANTE	4	5,1%
CIRUGIA (WM)+RT+QT	4	5,1%
CIRUGIA (WM)+RT	11	14,1%
CIRUGIA (WM)	11	14,1%
RT+QT ADYUVANTE	6	7,7%
RT+QT	19	24,4%
RT	20	25,6%
HISTERECTOMIA+RT	3	3,8%
TOTAL	78	100,0%

(WM: Wertheim–Meigs, RT: radioterapia, QT: quimioterapia)

En 19 casos se empleó como tratamiento la radioterapia y quimioterapia conjunta de intención radical. Uno de estos casos pasó posteriormente a cuidados paliativos. En 20 casos se empleó la radioterapia como único tratamiento. En 4 casos se empleó la radioterapia previa a una cirugía posterior, o bien radioterapia más quimioterapia previa a cirugía de rescate, lo cuál se realizó en 6 casos (fig. 53). Este nuevo enfoque de combinar quimioterapia en aquellas pacientes que requieren radioterapia para el tratamiento del cáncer cervical es debido a la publicación de ensayos clínicos que han mostrado que existe una ventaja en cuanto a la supervivencia en general, cuando se añade quimioterapia con platino conjuntamente a la radioterapia.

De los 29 casos en los que se aplicó cirugía, en 26 casos se realizó la intervención de Wertheim – Meigs (WM) y en tres casos lo que se realizó fue una histerectomía más doble anexectomía seguido de radioterapia. En 4 casos se realizó la cirugía (WM) seguida de quimioterapia más radioterapia y en 11 casos la intervención fue seguida de radioterapia (dependiendo de si los ganglios extirpados estaban infiltrados, los márgenes de la pieza estaban afectados o bien en algunos de los casos en los que existía infiltración de parametrios).

El tratamiento realizado habría que analizarlo desarrollando cada caso en concreto.

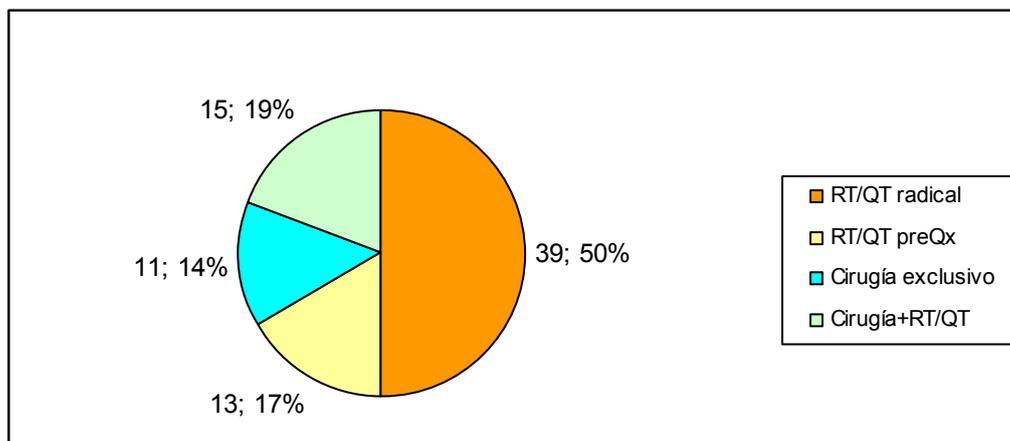


Figura 53. Distribución porcentual de casos en función del tratamiento empleado.

- **HISTOPATOLOGÍA**

En nuestro estudio, de los 78 casos de carcinoma invasor de cérvix la variedad más frecuente fue el carcinoma epidermoide, del cuál existen 57 casos (73.1%), a continuación nos encontramos con 15 casos de adenocarcinomas (19.2%), y por último dentro del grupo de otros tumores epiteliales con 5 casos de carcinoma adenoescamoso y un caso de carcinoma adenoide quístico (tabla 8).

Tabla N° 8. Histopatología en nuestra serie de casos de cáncer de cérvix.

HISTOPATOLOGÍA	Nº CASOS	%
CA. ESCAMOSO	57	73,1%
ADENOCARCINOMA	15	19,2%
ADENOIDE QUÍSTICO	1	1,3%
ADENOESCAMOSO	5	6,4%
TOTAL	78	100,0%

- **GRADO DE DIFERENCIACIÓN HISTOPATOLÓGICA**

Respecto al grado de diferenciación histopatológica, que es importante para el pronóstico de estas pacientes, tras el estudio anatomo-patológico nos encontramos con que la mayor parte de los casos (43) se trataban de tumores moderadamente diferenciados (G2), 17 casos se trataban de carcinomas de cérvix pobremente diferenciados (G3) y 10 casos se trataban de carcinomas de cérvix bien diferenciados (G1). En el resto de casos (8) el grado de diferenciación no constaba en el informe anatomo-patológico (fig. 54).

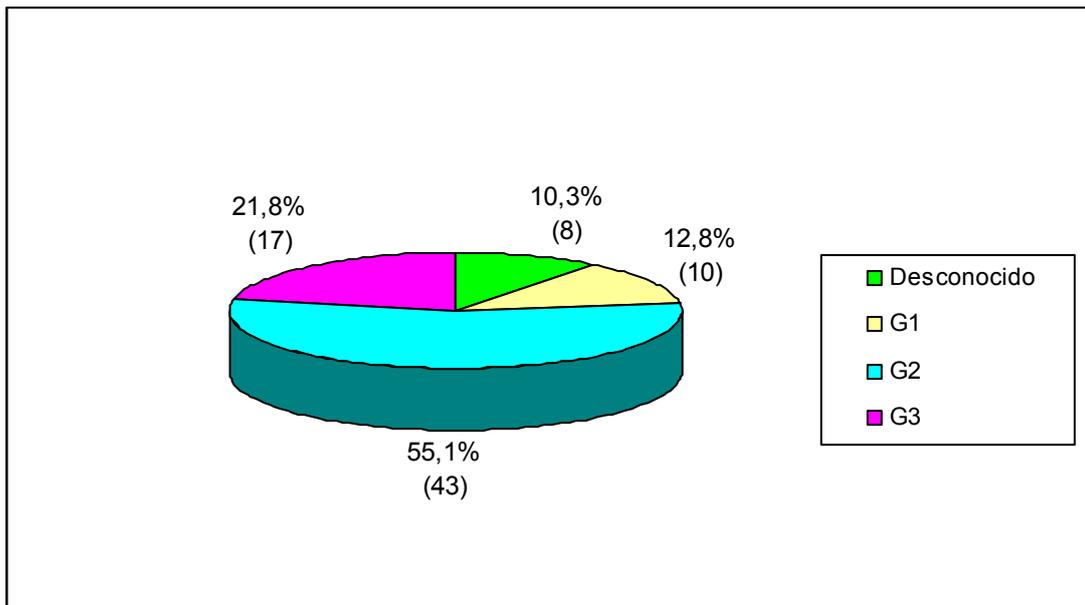


Figura 54. Distribución porcentual de los casos de cáncer de cérvix de acuerdo al grado de diferenciación tumoral. N=78

Así pues, el tipo histológico de cáncer de cuello uterino encontrado con mayor frecuencia en este estudio fue el carcinoma moderadamente diferenciado.

▪ **GANGLIOS LINFÁTICOS**

Respecto a la afectación de los ganglios linfáticos, en aquellos casos en los que se ha realizado linfadenectomía, hemos valorado si tras el estudio anatómico-patológico de los ganglios estaban afectados o no (tabla 9).

Tabla Nº 9. Estudio afectación ganglios linfáticos. (N=28)

GANGLIOS AFECTADOS	Nº CASOS	%
SI	7	25,0%
NO	21	75,0%
TOTAL	28	100,0%

De los 28 casos en los que se realizó cirugía (linfadenectomía) en 7 casos los ganglios se encontraban afectados y en 21 casos los ganglios fueron negativos. En el resto de casos, como el tratamiento no fue quirúrgico, no tenemos el grado de afectación ganglionar. En este campo es donde cobra importancia hoy día, como hemos comentado previamente, el empleo de la biopsia selectiva del ganglio centinela.

La media de ganglios resecaos fue de 24 ganglios y la de ganglios afectados de 2.42.

- DETERMINACIÓN VPH

En cuanto a la identificación y tipaje del VPH lo hemos realizado en un grupo de 34 casos y nos hemos encontrado con los siguientes resultados (figs. 55 y 56).

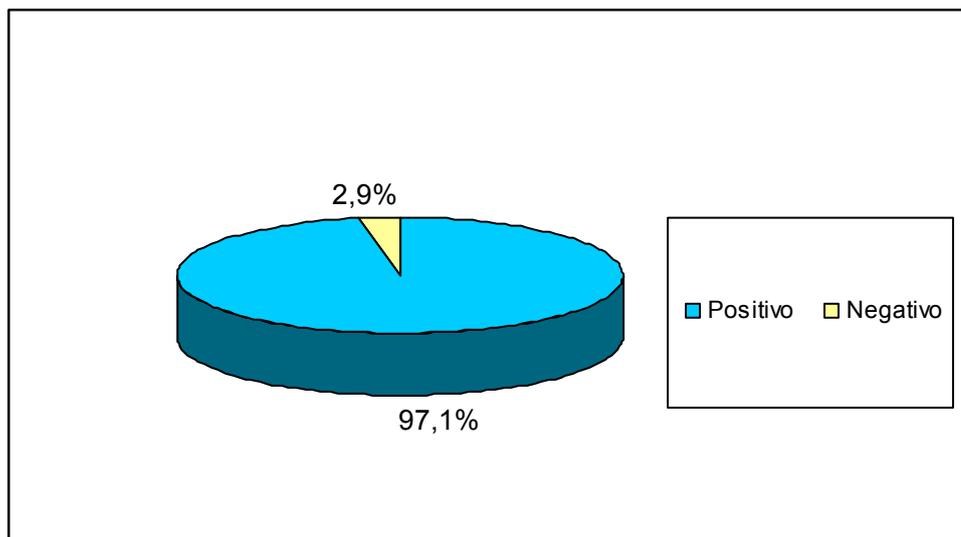


Figura 55. Distribución porcentual según identificación o no de VPH. (N=34)

La presencia de VPH positivo fue del 97.1%, sólo en uno de los casos no se identificó.

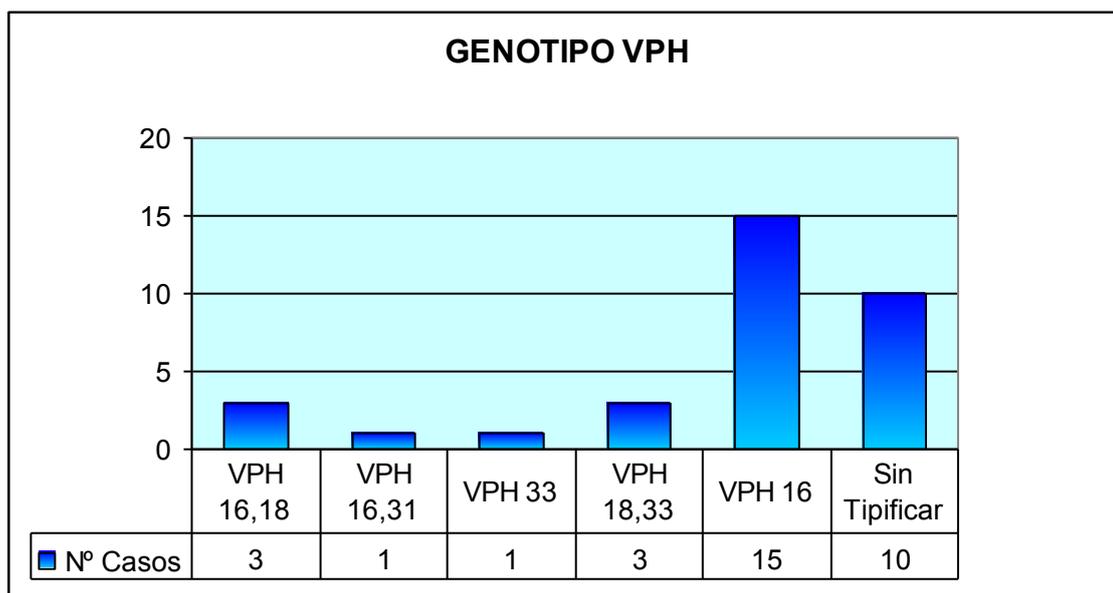


Figura 56. Distribución según genotipo VPH. (N=33)

En cuanto a su tipaje, observamos como todos los genotipos encontrados son de alto riesgo y el más frecuente el genotipo 16.

Estudiamos también la distribución de los genotipos en relación al tipo histológico, lo cuál no fue concluyente debido al bajo tamaño muestral.

De los 15 adenocarcinomas, la determinación y tipaje sólo se realizó en 4 casos: los cuatro casos fueron positivos para el VPH y en cuanto al genotipo, uno VPH 16, otro VPH 33, y 2 quedaron sin tipificar. El único caso de carcinoma adenoide quístico fue VPH positivo, genotipo 16. De los 5 adenoescamosos, se realizó el estudio en 3, que resultaron VPH positivo, dos eran genotipo 16 y uno sin tipificar. En los 26 casos de carcinoma escamoso, la mayoría (11 casos) VPH 16, tres casos VPH 16-18, tres casos VPH 18-33, un caso VPH 16-31, 7 sin tipificar y uno VPH negativo.

- ESTUDIO DE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES

A continuación exponemos los hallazgos inmunohistoquímicos para los marcadores moleculares estudiados incluyendo el análisis de frecuencias y una breve descripción de lo observado durante el análisis de los casos de cáncer de cérvix.

En aquellos casos en los que no fue posible realizar la evaluación inmunohistoquímica de alguno de los marcadores fue debido a que la presencia de células tumorales en el material de estudio no alcanzaba el número mínimo necesario para la lectura, sobre todo por pérdida de material tumoral.

- **Inmunoexpresión Ki-67**

Para determinar la actividad proliferativa en nuestra serie de casos de cáncer de cérvix mediante la inmunoexpresión del antígeno Ki-67, consideramos positivas aquellas muestras con tinción nuclear.

La expresión inmunohistoquímica de Ki-67 pudo evaluarse en 69 de los 78 casos de cáncer de cuello uterino, los cuales revelaron diferentes porcentajes de inmunoreactividad. El rango fue desde el 1% al 98% y la media fue de un 27%.

Dividimos el patrón de expresión de Ki-67 en grupos, según porcentaje de actividad proliferativa, menos del 10% de las células teñidas se consideró inmunoreactividad baja, del 10 al 30% moderada y mayor del 30% alta. Encontramos que el mayor número de casos en nuestra serie presentaban actividad proliferativa moderada seguido del grupo con actividad proliferativa alta (tabla 10).

Tabla N° 10. Patrón expresión Ki-67 en los casos de cáncer de cérvix.

KI-67	Nº CASOS	%
< 10%	16	23,2%
10-30%	34	49,3%
> 30%	19	27,5%
TOTAL	69	100,0%

▪ **Inmunoexpresión Ciclina D1**

La expresión inmunohistoquímica de la ciclina D1 en nuestra serie de casos se estudió tanto en el núcleo como en el citoplasma. Dicha evaluación pudo llevarse a cabo en 75 de los 78 casos de cáncer de cérvix; 28 (37.3%) fueron negativos, sin expresión de ciclina D1, y 47 (62.7%) revelaron inmunoreactividad para la ciclina D1, bien nuclear o citoplasmática. En la tabla 11 resumimos el patrón de expresión de la ciclina D1.

Tabla N° 11. Expresión de la ciclina D1 en los casos de cáncer de cérvix.

CICLINA D1	Nº CASOS	%
NÚCLEO	7	9,3%
CITOPLASMA	5	6,7%
NÚCLEO+CITOPLASMA	35	46,7%
NEGATIVO	28	37,3%
TOTAL	75	100,0%

De los casos positivos a ciclina D1 lo más frecuente en nuestra serie fue la positividad tanto nuclear como citoplasmática.

## ▪ Inmunoexpresión Bcl-2

Al realizar el estudio de la presencia de células con inmunotinción citoplasmática para la proteína antiapoptótica bcl-2, fue considerada positivo cuando el porcentaje de células reactivas fue mayor al 5%.

De los 78 casos de cáncer de cérvix fueron evaluados 77 para la expresión de bcl-2. Hemos encontrado que de los 77 casos, 55 (71.4%) no revelaron inmunoreactividad para esta proteína y 22 casos (28.6%) fueron positivos. Dentro del grupo de casos positivos lo más frecuente fue la inmunoreactividad citoplasmática leve (tabla 12).

Tabla N° 12. Expresión de bcl-2 en los casos de cáncer de cérvix.

BCL-2	Nº CASOS	%
NEGATIVO	55	71,4%
POSITIVO	22	28,6%
TOTAL	77	100,0%

## 2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN FUNCIÓN DEL TIPO HISTOLÓGICO, GRADO DE DIFERENCIACIÓN Y ESTADIO

### ▪ ESTUDIO EXPRESIÓN BCL-2

El estudio de inmunoexpresión de bcl-2 según el diagnóstico histopatológico, grado de diferenciación y estadio del tumor lo presentamos a continuación (tabla 13).

Tabla N° 13. Expresión bcl-2 según tipo histológico, grado de diferenciación y estadio.

	BCL-2		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
<b>TIPO HISTOLOGICO</b>			
CA ESCAMOSO	16 (28,1%)	41 (71,9%)	57 (100%)
ADENOCARCINOMA	4 (28,6%)	10 (71,4%)	14 (100%)
ADENOIDE QUÍSTICO	1 (100%)	0	1 (100%)
ADENOESCAMOSO	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
TOTAL	22 (28,6%)	55 (71,4%)	77 (100%)
<b>ESTADIO</b>			
I	9 (42,9%)	12 (57,1%)	21 (100%)
II	10 (27%)	27 (73%)	37 (100%)
III	1 (7,1%)	13 (92,9%)	14 (100%)
IV	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)
TOTAL	22 (28,6%)	55 (71,4%)	77 (100%)
<b>DIFERENCIACIÓN</b>			
BIEN DIFERENCIADO	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9 (100%)
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	10 (23,3%)	33 (76,7%)	43 (100%)
POBREMENTE DIFERENCIADO	7 (41,2%)	10 (58,8%)	17 (100%)
DESCONOCIDO	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)
TOTAL	22 (28,6%)	55 (71,4%)	77 (100%)

- **Tipo histológico:** de los 77 casos en los que hemos estudiado el marcador bcl-2, 57 son carcinomas escamosos y 14 adenocarcinomas. La inmunexpresión de bcl-2 fue negativa en 41 casos (71.9%) de los escamosos y en 10 casos (71.4%) de los adenocarcinomas. De los 5 tumores adenoescamosos, bcl-2 fue negativo en 4 de ellos (80%), y en el único caso de tumor adenoide quístico la expresión de bcl-2 citoplasmática fue positiva. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.442$ ).
  
- **Grado de diferenciación:** cuando estudiamos la distribución de la inmunexpresión de bcl-2 según el grado de diferenciación tumoral, nos encontramos con que el mayor porcentaje de casos fue negativo a la inmunexpresión de bcl-2 en cada grupo de diferenciación tumoral, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.492$ ).
  
- **Estadio:** no se observaron diferencias significativas ( $p=0.132$ ) según la inmunexpresión de bcl-2 en función del estadio. El mayor número de casos son negativos para la expresión bcl-2 en los diferentes estadios.

- ESTUDIO EXPRESIÓN CICLINA D1

- **Ciclina D1- Histopatología**

La expresión de la ciclina D1 según el tipo histológico del tumor se muestra en la tabla 14.

El 69.6% de los carcinomas escamosos y el 53.3% de los adenocarcinomas resultaron positivos para la inmunexpresión de la ciclina D1, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.313$ ).

Tabla N° 14. Expresión ciclina D1 según tipo histopatológico.

TIPO HISTOLOGICO	CICLINA D1		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
CA ESCAMOSO	39 (69,6%)	17 (30,4%)	56 (100%)
ADENOCARCINOMA	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15 (100%)
ADENOIDE QUÍSTICO	0	1 (100%)	1 (100%)
ADENOESCAMOSO	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)
TOTAL	50 (64,9)	27 (35,1%)	77 (100%)

También realizamos el estudio según donde mostrara positividad la ciclina D1. En nuestra serie de casos el patrón de expresión en aquellos casos positivos era tanto nuclear como citoplasmático (tabla 15), sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.772$ ).

Tabla N° 15. Patrón expresión ciclina D1 según tipo histopatológico.

TIPO HISTOLÓGICO	POSITIVIDAD CICLINA D1				TOTAL
	NUCLEO	CITOPLASMA	N+C	NEGATIVO	
CA ESCAMOSO	4 (7,3%)	4 (7,3%)	29 (52,7%)	18 (32,7%)	55 (100,0%)
ADENOCARCINOMA	2 (14,3%)	1 (7,1%)	4 (28,6%)	7 (50,0%)	14 (100,0%)
ADENOIDE QUÍSTICO	0 (,0%)	0 (,0%)	0 (,0%)	1 (100%)	1 (100%)
ADENOESCAMOSO	1 (20,0%)	0 (,0%)	2 (40%)	2 (40%)	5 (100%)
TOTAL	7 (9,3%)	5 (6,7%)	35 (46,7%)	28 (37,3%)	75 (100%)

(N+C: núcleo más citoplasma)

### ➤ **Ciclina D1- Grado de diferenciación**

En el estudio de la inmunexpresión de ciclina D1 en los diferentes grados de diferenciación (tabla 16), observamos que, en el grupo moderadamente y pobremente diferenciado, el porcentaje de casos que expresan ciclina D1 es mayor que los que no lo expresan pero con una diferencia muy escasa, por lo que el análisis estadístico no es significativo ( $p=0.588$ ).

Tabla N° 16. Inmunoexpresión ciclina D1 según diferenciación tumoral.

DIFERENCIACIÓN	CICLINA D1		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
BIEN DIFERENCIADO	5 (50%)	5 (50%)	10 (100%)
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	29 (69,0%)	13 (31%)	42 (100%)
POBREMENTE DIFERENCIADO	10 (58,8%)	7 (41,2%)	17 (100%)
DESCONOCIDO	6 (75%)	2 (25%)	8 (100%)
TOTAL	50 (64,9)	27 (35,1%)	77 (100%)

Atendiendo al patrón de expresión de ciclina D1 (tabla 17), lo más frecuente fue la expresión tanto nuclear como citoplasmática (significación estadística  $p=0,753$ ).

Tabla N° 17. Patrón expresión ciclina D1 según diferenciación tumoral.

DIFERENCIACIÓN	POSITIVIDAD CICLINA D1				TOTAL
	NUCLEO	CITOPLASMA	N+C	NEGATIVO	
BIEN DIFERENCIADO	1 (10%)	0 (,0%)	4 (40%)	5 (50%)	10 (100,0%)
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	3 (7,3%)	3 (7,3%)	22 (53,7%)	13 (31,7%)	41 (100,0%)
POBREMENTE DIFERENCIADO	1 (6,3%)	1 (6,3%)	7 (43,8)	7 (43,8)	16 (100%)
DESCONOCIDO	2 (25%)	1 (12,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)	8 (100%)
TOTAL	7 (9,3%)	5 (6,7%)	35 (46,7%)	28 (37,3%)	75 (100%)

(N+C: núcleo más citoplasma)

➤ **Ciclina D1- Estadío**

La inmunopresión de ciclina D1 según el estadio en el que se encontraba el tumor (tabla 18), observamos como a medida que el estadio del tumor es más avanzado, aumenta el número de casos con expresión a ciclina D1 con respecto a los negativos. Así en el estadio III tenemos un 84.6% de casos positivos a ciclina D1 con respecto a un 15.4% que no tienen expresión y en el estadio IV un 100% de casos positivos a ciclina D1. Estas diferencias son estadísticamente significativas con una  $p=0.039$ .

Tabla N° 18. Inmunoexpresión ciclina D1 según el estadio del tumor.

ESTADIO	CICLINA D1		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
I	13 (59,1%)	9 (40,9%)	22 (100%)
II	21 (56,8%)	16 (43,2%)	37 (100%)
III	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)
IV	5 (100%)	0	5 (100%)
TOTAL	50 (64,9%)	27 (35,1%)	77 (100%)

Si estudiamos el patrón de expresión según sea nuclear o citoplasmático obtenemos los siguientes resultados expuestos en la tabla 19.

Tabla N° 19. Patrón Inmunoexpresión ciclina D1 según el estadio del tumor.

ESTADIO	POSITIVIDAD CICLINA D1				TOTAL
	NUCLEO	CITOPLASMA	N+C	NEGATIVO	
I	4 (18,2%)	0 (,0%)	9 (40,9%)	9 (40,9%)	22 (100,0%)
II	2 (5,7%)	5 (14,3%)	11 (31,4%)	17 (48,6%)	35 (100,0%)
III	1 (7,7%)	0 (,0%)	10 (76,9%)	2 (15,4%)	13 (100,0%)
IV	0 (,0%)	0 (,0%)	5 (100,0%)	0 (,0%)	5 (100,0%)
TOTAL	7 (9,3%)	5 (6,7%)	35 (46,7%)	28 (37,3%)	75 (100,0%)

(N+C: núcleo más citoplasma)

Por tanto a medida que avanza el estadio del tumor (III y IV) va a su vez aumentando el número de casos que presentan positividad para este marcador tanto en núcleo como en citoplasma, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.013$ ).

▪ ESTUDIO EXPRESIÓN KI-67

El estudio de inmunexpresión de Ki-67, en función de su media en nuestra serie de casos, y según el diagnóstico histopatológico, grado de diferenciación y estadio lo presentamos a continuación (tabla 20).

Tabla N° 20. Expresión Ki-67 en función de la media de proliferación celular y según tipo histológico, estadio y grado de diferenciación del cáncer de cérvix.

	KI-67		TOTAL
	≤ 27%	> 27%	
<b>TIPO HISTOLOGICO</b>			
CA ESCAMOSO	27 (52,9%)	24 (47,1%)	51 (100%)
ADENOCARCINOMA	9 (75%)	3 (25%)	12 (100%)
ADENOIDE QUÍSTICO	0	1 (100%)	1 (100%)
ADENOESCAMOSO	3 (60%)	2 (40%)	5(100%)
TOTAL	39 (56.5)	30 (43.5%)	69 (100%)
<b>ESTADIO</b>			
I	14 (73.7%)	5 (26.3%)	19 (100%)
II	19 (57.6%)	14 (42.4%)	33 (100%)
III	6 (46.2%)	7 (53.8%)	13 (100%)
IV	0	4 (100%)	4 (100%)
TOTAL	39 (56.5%)	30 (43.5%)	69 (100%)
<b>DIFERENCIACIÓN</b>			
BIEN DIFERENCIADO	6 (85.7%)	1 (14.3%)	7 (100%)
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	18 (47.4%)	20 (52.6%)	38 (100%)
POBREMENTE DIFERENCIADO	11 (64.7%)	6 (35.3%)	17 (100%)
DESCONOCIDO	4 (57.1%)	3 (42.9%)	7 (100%)
TOTAL	39 (56.5%)	30 (43.5%)	69 (100%)

- **Tipo histológico:** en general los casos demostraron heterogeneidad en la expresión de Ki-67 (porcentaje de células teñidas), con mayor número de casos con una proliferación moderada en todos los tipos histológicos, pero sin alcanzar significación estadística ( $p=0.293$ ).
- **Grado de diferenciación:** en todos los grados de diferenciación tumoral hubo desde baja expresión hasta alta, la mayor reactividad fue en los casos de cáncer de cérvix moderadamente diferenciados ( $52.6\% > 27\% \text{ Ki-67}$ ) y los de menor reactividad los bien diferenciados ( $85.7\% \leq 27\% \text{ Ki-67}$ ), aunque sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.210$ ).
- **Estadio:** al realizar el estudio observamos como en los estadios más avanzados, el porcentaje de inmunoexpresión de Ki-67 es mayor, con respecto a estadios precoces, resultando estadísticamente significativo con una  $p=0.045$ .

Cuando hemos evaluado la media de proliferación celular según los diferentes tipos histológicos (tabla 21), observamos como el índice de proliferación celular es de un 98% en el único caso de tumor adenoide quístico y una media del 30% en el grupo de los adenoescamosos (significación estadística  $p=0,03$ ).

Tabla N° 21. Expresión Ki-67 en función de su media en los diferentes tipos histológicos.

HISTOPATOLOGÍA	N° CASOS	MEDIA KI-67
CA ESCAMOSO	51	27,922%
ADENOCARCINOMA	12	21%
ADENOIDE QUÍSTICO	1	98%
ADENOESCAMOSO	5	30%
TOTAL	69	27,884%

La media de proliferación celular según estadios, observamos como va aumentado a medida que avanza el estadio del tumor, destaca una media del 42,5% en el estadio IV (tabla 22). (Significación estadística  $p=0,312$ ).

Tabla N° 22. Expresión Ki-67 en función de su media en los diferentes estadios.

ESTADIO	N° CASOS	MEDIA KI-67
I	19	22,211%
II	33	28,848%
III	13	29,231%
IV	4	42,500%
TOTAL	69	27,884%

### 3. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES.

Estudiamos la correlación entre los diferentes marcadores moleculares para determinar las posibles asociaciones en relación a la inmunoreactividad.

#### ▪ **Correlación Ki-67-bcl2**

Cuando estudiamos la correlación Ki-67-bcl-2 (tabla 23) no encontramos ninguna relación a destacar en la inmunoexpresión de estos 2 marcadores moleculares. (Significación estadística  $p < 0.504$ ).

Tabla N° 23. Correlación inmunoexpresión Ki-67- bcl-2.

BCL-2	KI-67		TOTAL
	≤ 27%	> 27%	
NEGATIVO	25 (56,8%)	19 (43,2%)	44 (100%)
POSITIVO	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100%)
TOTAL	34 (55,7%)	27 (44,3%)	61 (100%)

#### ▪ **Correlación Ki-67-ciclina D1**

Nos pareció interesante el estudio de la correlación entre inmunoexpresión ciclina D1-Ki67 y ver si en nuestra serie de casos cuanto mayor proliferación, más número de células en fase de síntesis y en consecuencia habría mayor expresión de ciclina D1 citoplasmática (tabla 24).

Tabla N° 24. Correlación inmunoexpresión Ki-67-ciclina D1.

CICLINA D1	KI-67		TOTAL
	≤ 27%	> 27%	
POSITIVO	21 (50,0%)	21 (50,0%)	42 (100%)
NEGATIVO	17 (65,4%)	9 (34,6%)	26 (100%)
TOTAL	38 (55,9%)	30 (44,1%)	68 (100%)

En nuestro estudio no existe correlación entre estos dos marcadores del ciclo celular. Observamos el mismo número de casos positivos a ciclina D1 en los 2 grupos, según proliferación celular menor o mayor a la media. (Significación estadística  $p < 0.214$ ).

- **Correlación bcl2-ciclina D1**

En cuanto a la correlación bcl-2-ciclina D1 no se encuentran diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0.248$  (tabla 25).

Tabla N° 25. Correlación inmunoexpresión bcl-2- ciclina D1.

CICLINA D1	BCL-2		TOTAL
	NEGATIVO	POSITIVO	
POSITIVO	37 (75,5%)	12 (24,5%)	49 (100%)
NEGATIVO	17 (63%)	10 (37%)	27 (100%)
TOTAL	54 (71,1%)	22 (28,9%)	76 (100%)

#### 4. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

La media de seguimiento fue de 46 meses (rango 2-78), cuarenta y una de las pacientes (52.6%) estaban vivas sin recidiva, en 7 pacientes (9%) se había producido recidiva, 14 pacientes (17.9%) habían fallecido y 16 (20.5%) perdidas para seguimiento.

Por tanto podemos presentar nuestra curva de supervivencia según el siguiente gráfico (fig. 57), en el cual la supervivencia en nuestro grupo de casos fue del 82.1%, con una media de 67 meses (IC 95% 62-72).

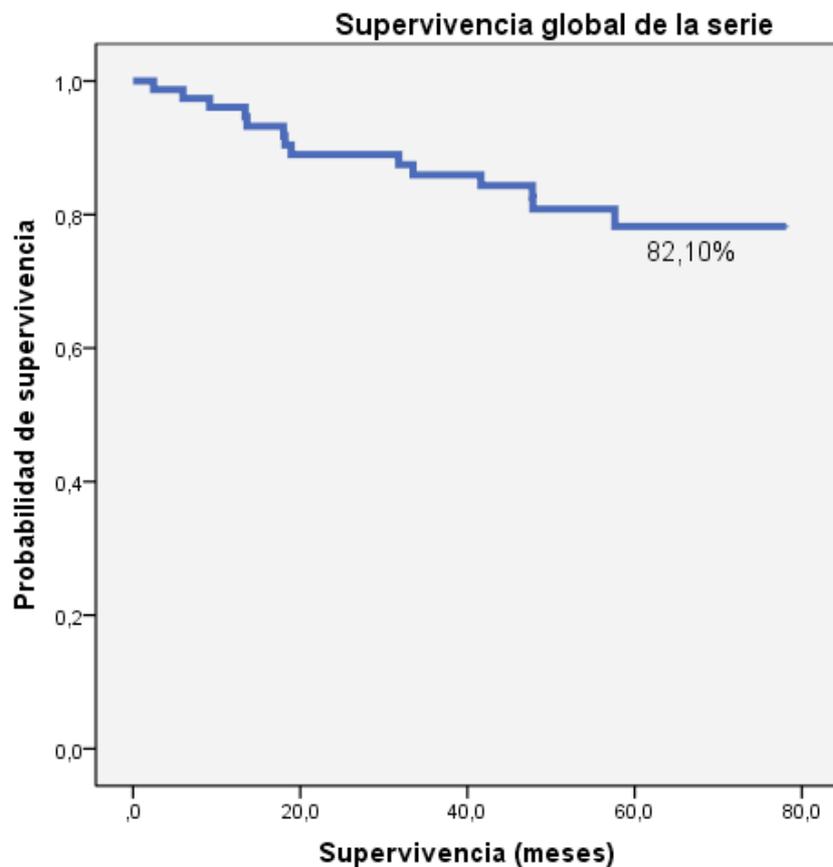


Figura 57. Curva de Supervivencia de la serie completa de cáncer de cérvix.

- **DISTRIBUCIÓN SUPERVIVENCIA SEGÚN DIFERENTES VARIABLES**

En los 78 casos se ha determinado la supervivencia según diferentes variables como son el grado de diferenciación, el estadio y la inmunoexpresión de ciclina D1, bcl-2 y Ki 67. La influencia de cada uno de ellos en la supervivencia se expone a continuación.

- **Supervivencia-Estadio**

La estadificación es un factor de mal pronóstico conocido, pero en nuestra serie de casos no alcanzó significación estadística ( $p=0.083$ ). La media de supervivencia para el estadio I fue de 74 meses (IC 95% 68-81), estadio II 65 meses (IC 95% 58-72), estadio III 53 meses (IC 95% 38-69) y el estadio IV 62 meses (IC 95% 41-84) (fig. 58).

Estos datos que hemos obtenido (tabla 26) tienen la limitación de que en los 5 casos que teníamos en estadio IV, solo en uno de ellos es conocido el fallecimiento de la paciente, ya que en 1 perdimos el seguimiento desde el inicio, en dos de ellos a los 3 años se perdió el seguimiento y en el último caso la paciente estaba viva pero con metástasis en el momento de cierre del estudio. Por lo que la supervivencia estimada en este estadio no es objetiva.

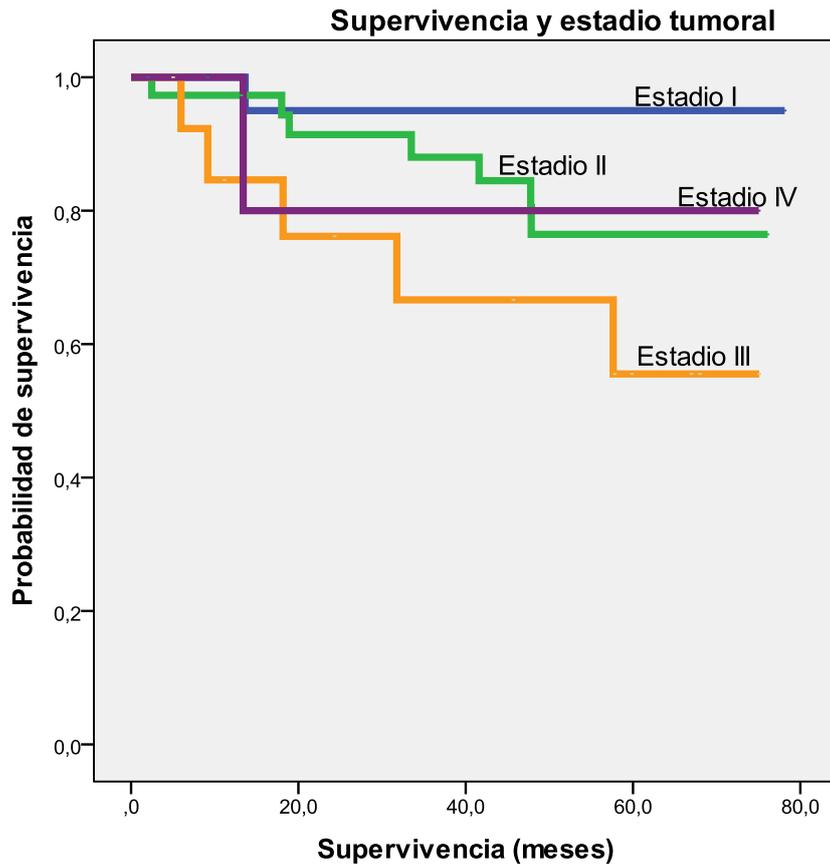


Figura 58. Curva de Supervivencia según estadio.

Tabla N° 26. Supervivencia según estadio tumoral.

ESTADIO	N° CASOS	FALLECIDAS	VIVAS	
			N°	%
I	22	1	21	95,5%
II	37	7	30	81,1%
III	14	5	9	64,3%
IV	5	1	4	80,0%
TOTAL	78	14	64	82,1%

También realizamos el análisis de supervivencia especificando estadio A o B, observando que a partir del estadio IIB comenzaba a disminuir la supervivencia, pero sin llegar a alcanzar significación estadística ( $p=0.092$ ).

▪ **Supervivencia-Grado de Diferenciación**

No encontramos diferencias significativas ( $p=0.300$ ) en la supervivencia respecto al grado diferenciación tumoral. En nuestro grupo de casos el tumor bien diferenciado, un total de 10, la supervivencia fue del 100%, y en el moderadamente y pobremente diferenciado fue de un 81,4% y 82,4%, respectivamente (fig. 59, tabla 27).

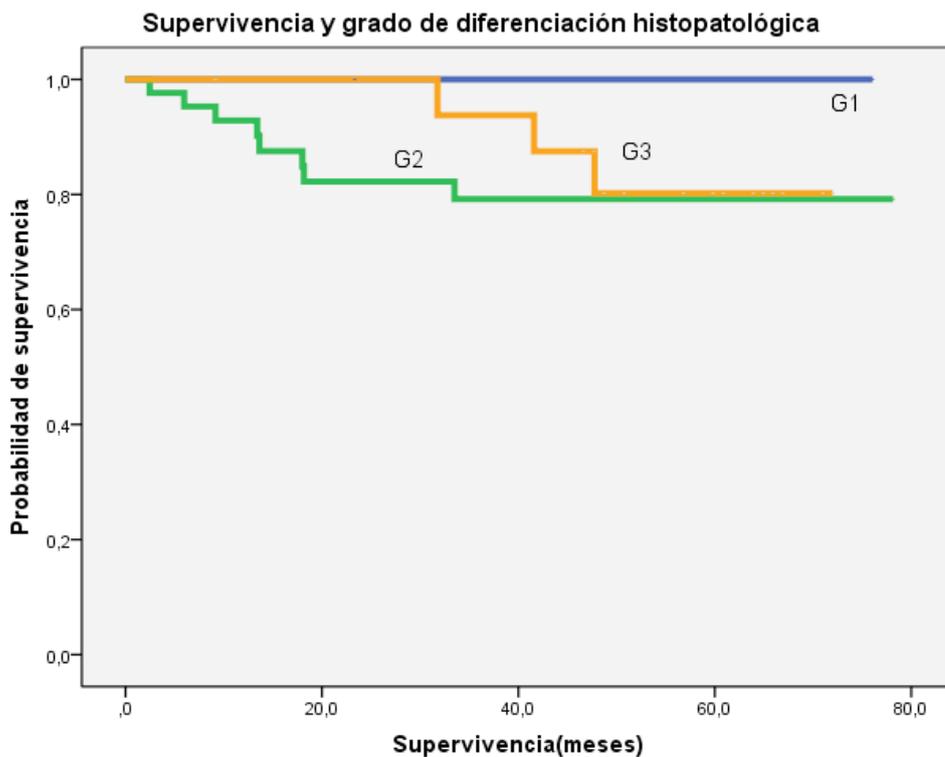


Figura 59. Supervivencia según grado de diferenciación.

Tabla N°27. Supervivencia según Grado de diferenciación tumoral.

DIFERENCIACIÓN	N° CASOS	FALLECIDAS	VIVAS	
			N°	%
BIEN DIFERENCIADO	10	0	10	100,0%
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	43	8	35	81,4%
POBREMENTE DIFERENCIADO	17	3	14	82,4%
TOTAL	70	11	59	84,3%

- **Supervivencia-Expresión ciclina D1**

Como podemos observar en el siguiente gráfico (fig. 60), la supervivencia fue ligeramente mayor en los casos que no hay expresión de ciclina D1, media 67 meses (IC 95% 60-75), respecto a los casos con expresión ciclina D1, media 65 meses (IC 95% 58-72), pero sin llegar a ser estadísticamente significativo ( $p=0.535$ ). Si el grupo con inmunexpresión positiva a ciclina D1 lo dividimos según expresión en núcleo o citoplasma la supervivencia iba siendo menor a medida que la expresión era citoplasmática pero sin llegar a existir significación estadística ( $p=0.758$ ).

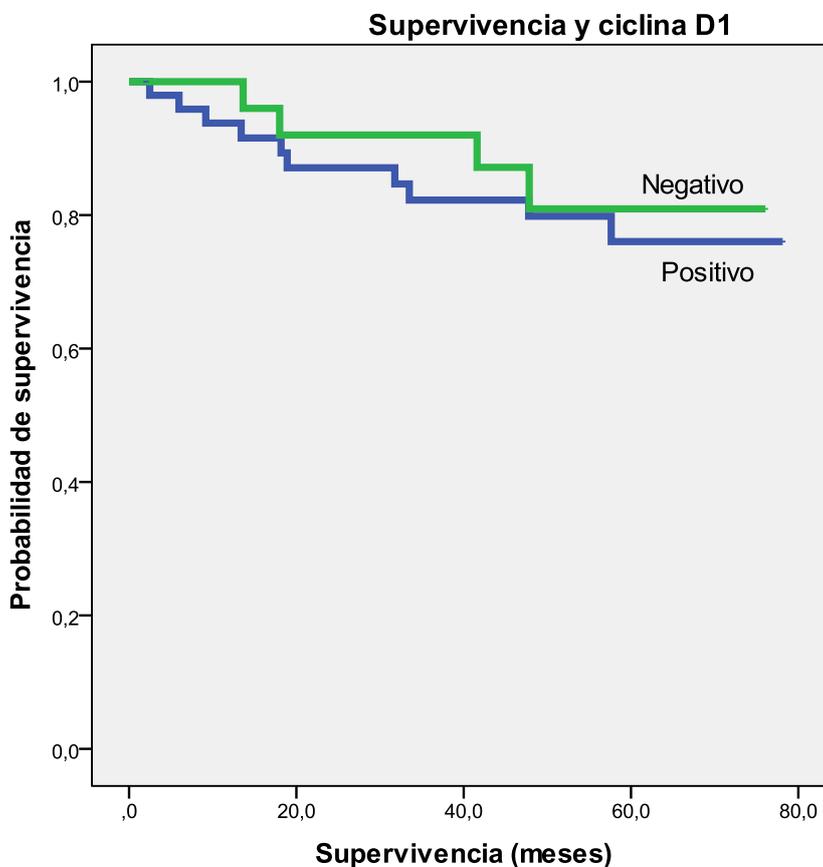


Figura 60. Supervivencia según inmunexpresión ciclina D1.

Tabla N° 28. Resumen supervivencia según inmunexpresión ciclina D1.

CICLINA D1	N° CASOS	FALLECIDAS	VIVAS	
			N°	%
POSITIVO	50	10	40	80,0%
NEGATIVO	27	4	23	85,2%
TOTAL	77	14	63	81,8%

▪ **Supervivencia-Expresión bcl-2**

Respecto a la supervivencia según la inmunexpresión de bcl-2 en nuestra serie de casos no hubo diferencias significativas ( $p=0.590$ ) (fig. 61).

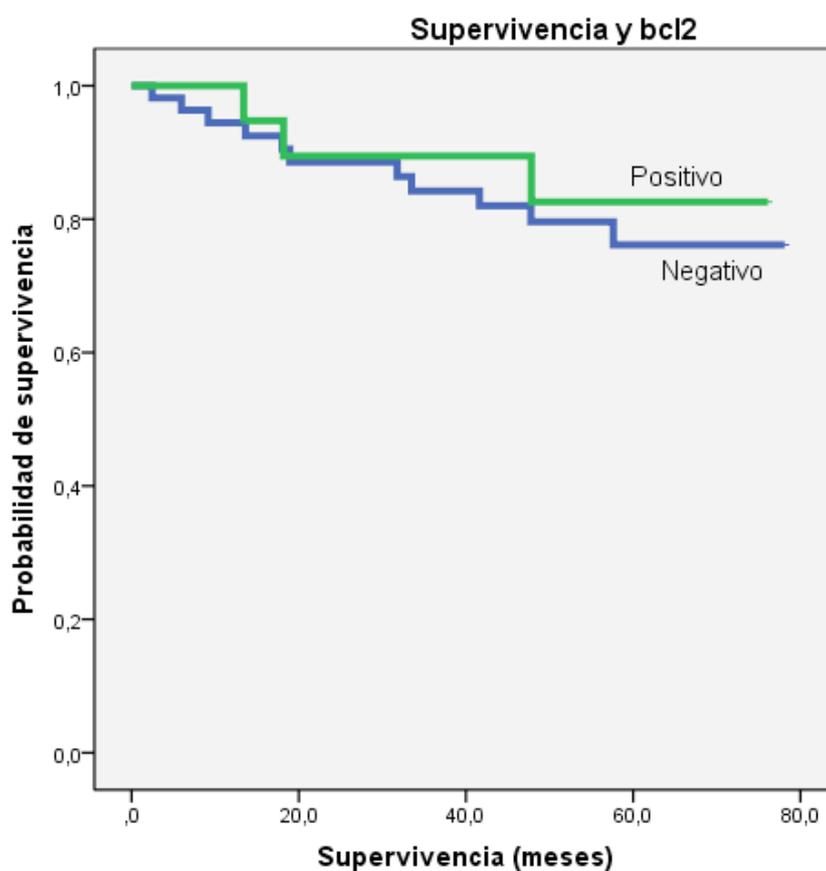


Figura 61. Supervivencia según inmunexpresión bcl-2.

En el grupo bcl-2 positivo la supervivencia fue de un 86,4% y en el grupo bcl-2 negativo del 80% (tabla 29).

Tabla N° 29. Resumen supervivencia según inmunoexpresión Bcl-2.

BCL-2	N° CASOS	FALLECIDAS	VIVAS	
			N°	%
POSITIVO	22	3	19	86,4%
NEGATIVO	55	11	44	80,0%
TOTAL	77	14	63	81,8%

▪ **Supervivencia-Expresión Ki-67**

Realizamos dos grupos en nuestra muestra para calcular la supervivencia, según el índice de proliferación Ki-67 fuese mayor o menor a nuestra media (fig. 62, tabla 30). La supervivencia fue menor para el grupo con proliferación mayor al 27%, media supervivencia 63 meses (IC 95% 53-72), y media supervivencia para grupo con índice de proliferación celular  $\leq 27\%$  fue 66 meses (IC 95% 59-73). Estos resultados no fueron significativos ( $p=0.461$ ).

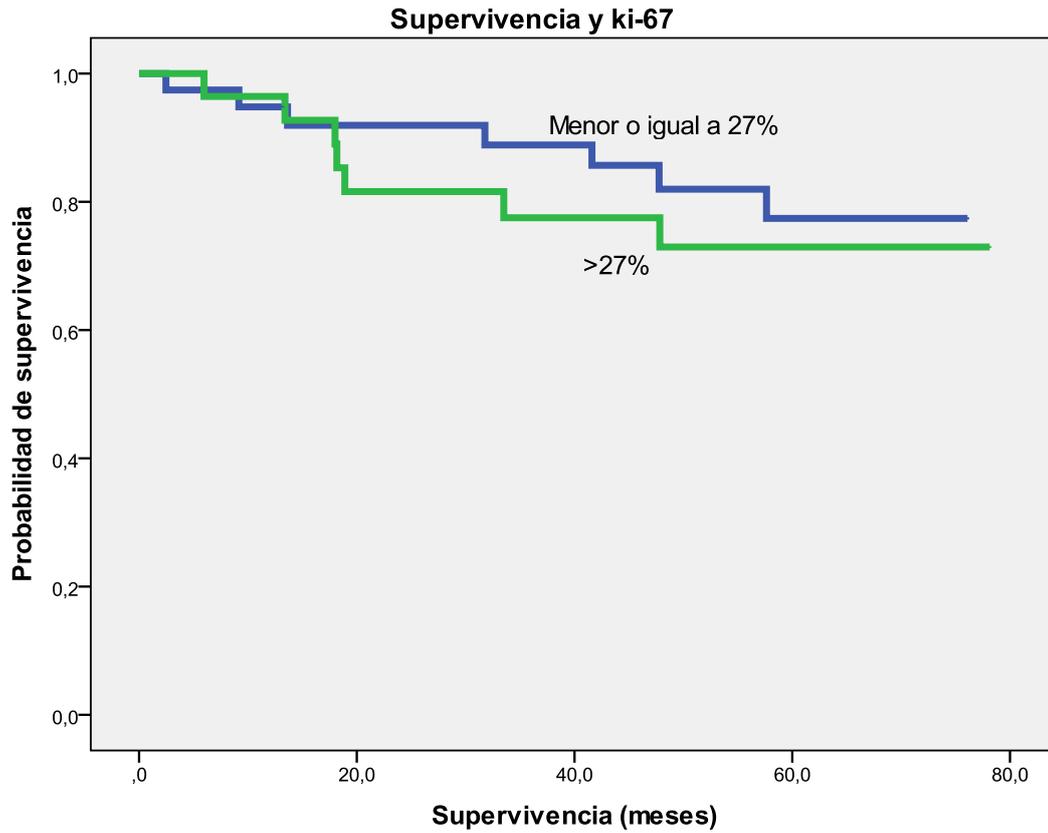


Figura 62. Supervivencia según inmunopresión Ki-67.

Tabla N° 30. Resumen supervivencia según inmunopresión Ki-67.

KI-67	N° CASOS	FALLECIDAS	VIVAS	
			N°	%
≤ 27%	39	7	32	82,1%
> 27%	30	7	23	76,7%
TOTAL	69	14	55	79,7%

## V. DISCUSIÓN

---

---

El cáncer de cérvix es un problema de salud no resuelto a nivel Mundial. Se ha comprobado que, a pesar de existir varios programas de detección precoz, las cifras de incidencia y mortalidad continúan alarmando a la comunidad científica.

El carcinoma de cérvix es la segunda neoplasia más frecuente en la mujer a nivel Mundial, según tasas estandarizadas por edad, tras el cáncer de mama.

La progresión del cáncer de cérvix va a determinar el pronóstico de la paciente, por lo que el objetivo es encontrar aquellos puntos clave de la progresión neoplásica y así poder predecir la evolución de la enfermedad y buscar nuevos tratamientos más efectivos e individualizados a cada paciente.

Muchos estudios han tratado el tema de los factores pronósticos en pacientes con carcinoma de cuello uterino. Uno de los factores pronósticos más importantes es el estadio FIGO en el que se encuentre el tumor: la supervivencia a los 5 años es mayor del 95% en los pacientes en estadio IA, del 80% al 90% en estadio IB, 75% en estadio II y de menos del 50% en estadio III o IV.

En nuestra serie de casos, a los 5-6 años del diagnóstico la supervivencia global es de un 82%. Respecto a la estadificación, como hemos expuesto previamente, es un factor de mal pronóstico conocido, pero en nuestra serie de casos no alcanzó significación estadística. Así la supervivencia en el estadio I es de un 95.5%, en el estadio II de un 81.1%, en estadio III un 64.3% y en estadio IV de un 80%. Los datos de supervivencia en los últimos estadios, no se ajustan a lo publicado en los diferentes registros, lo que puede ser debido a la baja concentración de casos en estos estadios, tamaño muestral bajo en estadio III y IV, ya que en nuestra serie el mayor número de pacientes se encontraban en el estadio IIB (42.3%). Como hemos comentado previamente, también se debe a la pérdida de seguimiento de pacientes en el estadio IV.

Respecto al estado en el que se encontraban las pacientes a los 5-6 años del diagnóstico del cáncer, encontramos que un 17.9% habían fallecido, un 52.6% estaban vivas sin enfermedad residual, un 9% habían presentado recidiva de la enfermedad y en el 20.5% no hubo posibilidad de seguimiento de las pacientes.

En nuestro estudio la supervivencia en función de los parámetros histológicos o inmunohistoquímicos estudiados, no tuvieron influencia significativa en la muestra.

En los procesos displásicos de cérvix acontece una variedad de cambios genéticos que eventualmente conducen al desarrollo de carcinoma escamoso invasor. Estos cambios son debidos a las alteraciones del ciclo celular que producen los VPH llamados de alto riesgo, y en ocasiones a la integración del propio virus en el genoma de la célula infectada. La detección de estas alteraciones (marcadores de tumor) podría ser de gran importancia en la pesquisa, diagnóstico y pronóstico de la neoplasia cervical.

El objetivo principal de nuestro estudio es caracterizar la expresión inmunohistoquímica de una serie de biomarcadores en muestras de cáncer de cuello uterino para establecer su aplicación clínica. Dada la complejidad y diversidad de los mecanismos patogénicos del cáncer de cérvix, nos hemos limitado en nuestro trabajo a la revisión y estudio de tres marcadores moleculares, la ciclina D1, bcl-2 y el Ki-67<sup>122</sup>.

Estudiamos 78 casos de cáncer de cérvix diagnosticados en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga desde el año 2004 al 2006, de los cuales se disponía de material histológico archivado en el Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital. Se recogieron los datos clínicos, se analizaron las características histopatológicas, inmunohistoquímicas y genotipificación de los VPH presentes en los tumores y realizamos como se ha

expuesto anteriormente un análisis de los hallazgos obtenidos entre las diferentes variables, así como la existencia de posibles correlaciones entre ellas.

Al hacer el análisis descriptivo de los hallazgos clinicopatológicos observamos que el mayor número de pacientes se encontraban en la franja de edad más joven (35-45 años). Esta neoplasia afecta cada día a más mujeres jóvenes y en edad reproductiva, sobre todo en países pobres y en vías de desarrollo, lo que es un verdadero problema de salud pública debido a la carencia de programas de cribado bien organizados.

Según los datos publicados en los principales estudios epidemiológicos en los que se incluyeron pacientes de distintas regiones geográficas, la mayor incidencia de casos de cáncer cervical se presentan entre los 40 y 50 años. Estas observaciones se notan más en países desarrollados con políticas de detección precoz bien implantadas. Sin embargo, en los países subdesarrollados se aprecia una tendencia de la incidencia de cáncer de cuello uterino que sigue una relación lineal con la edad, como ocurre con la mayoría de los tumores de origen epitelial<sup>29</sup>.

La edad media de diagnóstico en nuestra serie de cáncer de cérvix fue de 52 años. Respecto a los casos de adenocarcinoma cervical, el mayor número de ellos se presentó en pacientes cuya edad se encontraba por debajo de los 45 años.

En cuanto a los antecedentes gineco-obstétricos, destaca el hallazgo de un mayor número de casos en pacientes con dos o más hijos, lo que coincide con lo publicado en diferentes estudios de casos-controles referentes a la multiparidad asociada a carcinoma cervical in situ e invasor, cuyas conclusiones son que las pacientes que han tenido más de 3 hijos podrían tener un mayor riesgo de desarrollar CIS en comparación con las mujeres nulíparas o con menos de 2 hijos<sup>24</sup>.

En el 53.8% de las pacientes el diagnóstico de cáncer de cérvix se realizó mediante exploración bajo anestesia y toma de biopsia, en la cuál el estudio anatomopatológico confirmó el diagnóstico.

El tipo histológico predominante en nuestra serie fue el carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, mientras que el adenocarcinoma cervical alcanzó un porcentaje de prevalencia semejante al hallado en la literatura<sup>29</sup>. Aunque en la actualidad se estima que la prevalencia del adenocarcinoma cervical está aumentando, nuestros resultados coinciden con las cifras publicadas en los estudios epidemiológicos hasta la fecha, un 19%.

En relación a los hallazgos en el estudio realizado en 34 de los casos de cáncer de cérvix, la presencia del VPH fue positiva en un 97.1% de los mismos, por lo que suponemos, según los diferentes estudios publicados, que los hallazgos inmunohistoquímicos tienen relación directa o indirecta con la presencia del ADN viral. Nuestros resultados demuestran, una vez más, que una tasa mayor del 95% de los carcinomas de cuello uterino poseen secuencias de ADN-VPH, confirmando así su estrecha relación etiopatogénica con la carcinogénesis cervical.

En relación a los tipos virales más frecuentes, la evidencia epidemiológica y molecular indica claramente que ciertos tipos de VPH son la principal causa del cáncer invasor de cérvix. En este estudio, de los casos positivos para ADN-VPH, el mayor porcentaje presentó infección por un tipo específico de VPH de alto riesgo, específicamente el genotipo VPH 16. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que, en nuestro medio, el VPH16 también es el tipo viral de alto riesgo más frecuentemente asociado al cáncer de cérvix y se presenta indistintamente tanto en carcinomas epidermoides como en adenocarcinomas. El VPH 16 no sólo se detectó como tipo específico sino también en co-infección con otros tipos virales. La infección por varios

tipos de VPH es un hallazgo común en pacientes con cáncer de cérvix y concretamente el genotipo que más se asociaba en co-infección es el VPH 18.

En la eficacia de los métodos moleculares para la amplificación y detección del ADN-VPH, específicamente la técnica de PCR, tiene gran influencia el tamaño del segmento de ADN viral que se amplifique. Así pues, mientras más pequeño es el fragmento genómico es más factible detectar bajas concentraciones de secuencias virales, en particular, a partir de tejido incluido en parafina, el cual se caracteriza porque frecuentemente el ADN puede sufrir daños que conllevan a la degeneración o fragmentación del mismo, haciendo más difícil la detección de ADN viral integrado. Por ello es por lo que en ciertas ocasiones es difícil llegar a tipificar el virus presente en la muestra de cáncer de cérvix como ha ocurrido en algunos de nuestros casos.

Como ya describimos al comienzo de la revisión, los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. Alteraciones en el proceso de interrupción del ciclo celular permiten que células con genomas inestables evolucionen a células cancerosas. En consecuencia, los puntos de control del ciclo celular representan una buena opción para la aplicación de los agentes quimioterápicos. Los controles moleculares de la progresión del ciclo celular pueden proveer nuevos blancos para agentes citotóxicos. Nuevos productos génicos o productos de genes sobreexpresados en cánceres específicos proveen otros blancos potenciales para la terapia contra el cáncer.

Existen algunas proteínas que se expresan o bien solamente en procesos displásicos y neoplásicos, o bien con mayor intensidad en estos procesos<sup>123</sup>. Estas proteínas son detectadas inmunohistoquímicamente. Entre ellas están Ki-67, bcl-2 y ciclina D1.

Una vez que hemos expuesto el ciclo celular, resulta fácil comprender que las mutaciones que alteran la regulación de la actividad de las cinasas y de las CDK favorecen la proliferación celular. El entendimiento de cómo estas proteínas interactúan en dicha regulación ha proporcionado la información requerida para el descubrimiento de dianas que presentan alteraciones y que son la base del desarrollo del cáncer. De hecho, parece que los percances que afectan a la expresión de la ciclina D o de CDK4 son frecuentes en la transformación neoplásica<sup>124,125</sup>.

La sobreexpresión de los principales representantes de los inhibidores de CDK dependientes de ciclina (p16, p21 y p27) es una de las alteraciones que se mantienen constantes en el cáncer de cérvix que expresa las oncoproteínas de los papilomavirus humanos de alto riesgo<sup>126</sup>.

La ciclina D1 se sobreexpresa en muchas de las neoplasias humanas como resultado de la amplificación o translocación de su gen, localizado en el locus D1, en el cromosoma humano 11q13. La amplificación del cromosoma 11q13 es frecuente en un amplio espectro de cánceres en el adulto que incluyen al carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (43% de los casos), carcinoma de esófago (34%), cáncer de vejiga (15%), carcinoma primario de mama (13%), tumores pulmonares de células pequeñas y carcinomas hepatocelulares (10%). Por lo que nos ha parecido interesante estudiar la inmunoexpresión de la ciclina D1 concretamente en el cáncer invasor de cérvix y su valor pronóstico.

En diferentes estudios la expresión de ciclina D1 ha sido asociada con la infección por VPH y se ha observado una buena correlación entre ciclina D1 y la expresión de la oncoproteína E7.

Revisando la literatura observamos que existe una variabilidad de resultados desde la ausencia de expresión de ciclina D1 en el epitelio cervical normal a una

gradación de expresión en el carcinoma invasor de cérvix<sup>127,128</sup>. La inmunexpresión nuclear de ciclina D1 se observa en células parabasales y basales en cérvix normales. Dicha inmunexpresión disminuye al aumentar el grado de displasia llegando a la ausencia de expresión, tanto en displasias severas como en carcinomas escamosos infiltrantes. Sin embargo, si evaluamos la inmunexpresión citoplasmática de ciclina D1, observamos incremento progresivo desde la displasia hasta el carcinoma escamoso<sup>129</sup>. Se ha demostrado que la ciclina D1 se traslada del núcleo al citoplasma cuando la célula está en fase G1 y entra en fase de síntesis. Por, tanto respecto a la inmunexpresión de ciclina D1 cuanto mayor proliferación, más número de células en fase de síntesis y en consecuencia mayor expresión de ciclina D1 citoplasmática<sup>130,131</sup>.

En este estudio, hemos evaluado la inmunexpresión de la ciclina D1 en el cáncer invasor de cuello de útero, revelando niveles de expresión correspondientes a un 60.2% de los casos. De los 75 cáncer de cérvix en los que se pudo evaluar 47 fueron considerados positivos a este marcador. En aquellos que presentaron positividad a la ciclina D1 se evaluó el patrón de expresión y se observó que en la mayoría de estos casos (26) la expresión era tanto nuclear como citoplasmática, con mayor expresión citoplasmática pero no llegaba a ser significativa la diferencia como lo publicado en algunos estudios mencionados previamente.

La supervivencia de aquellos casos con expresión positiva a la ciclina D1 respecto a los que no la expresaban, como hemos comentado previamente, no presentó diferencias significativas (80% versus 85.2% respectivamente).

Respecto al estudio de la expresión de la ciclina D1 dependiendo al tipo histológico del tumor y al grado de diferenciación no aportó información relevante.

Donde se observaron diferencias estadísticamente significativas fue en el patrón de expresión de la ciclina D1 en los diferentes estadios. Así observamos como a medida

que el estadio del tumor iba avanzando, el porcentaje de casos que expresaban la ciclina D1 era mayor en detrimento de aquellos que no tenían expresión de este marcador. En nuestra serie, en el estadio III el porcentaje de casos con inmunoposición positiva era de un 84.6% y en el estadio IV el 100% de los casos. Este hallazgo puede ser de utilidad para futuros estudios. Sería interesante comparar con un mayor tamaño muestral en estadios III y IV la expresión de ciclina D1 con respecto a estadios I y II.

El patrón de expresión de estas células positivas a la ciclina D1 era tanto nuclear como citoplasmático.

En cuanto a bcl-2, la importancia de su estudio radica en que al ser su función antiapoptótica su sobreexpresión puede prevenir la apoptosis en células que están dañadas. Esto puede llevar a una división continua de las líneas de células mutadas y eventualmente al cáncer. También la sobreexpresión de bcl-2 puede contribuir a las metástasis en ciertos cánceres.

En la revisión bibliográfica realizada hemos encontrado como la sobreexpresión de bcl-2 y su importancia pronóstica han sido estudiadas en varios tipos de cáncer; aparte de en el linfoma folicular de células B, se ha estudiado en el melanoma, los carcinomas de mama, pulmón y próstata. Sin embargo, los datos sobre el carcinoma de células escamosas de cérvix son limitados y los resultados contradictorios.

Así tenemos estudios que publican que la inmunoposición de bcl-2 es escasa en cérvix normal y se incrementa en displasias y cáncer. Algunos autores incluso sugieren que la inmunoposición de bcl-2 y p53 en carcinomas invasores de cérvix se asocian a infección por VPH de forma que pueden constituir un marcador independiente para cáncer cervical<sup>89</sup>.

En estudios in vitro también se ha demostrado que la sobreexpresión de bcl-2 conlleva una prolongación de la supervivencia celular en estudios de cultivo celular. Por

lo tanto un estudio in vivo sobre esta proteína reguladora de la apoptosis nos puede ayudar a parte de la comprensión de la patogénesis molecular subyacente en el desarrollo del cáncer cervical<sup>83,132</sup>.

En nuestro estudio evaluamos la expresión de bcl-2 en una serie de tejidos obtenidos de carcinoma invasor de cérvix, en un intento de elucidar la expresión de esta oncoproteína en el cáncer de cuello de útero. Los resultados que hemos obtenido en los 77 casos estudiados, es que en 55 de ellos, que corresponden a un 70.5% de los casos, no hay expresión de bcl-2.

Hasta ahora, los resultados que se han obtenido como hemos comentado previamente han sido contradictorios. Se ha demostrado en algunos estudios bcl-2 como predictor de mal pronóstico independiente en el cáncer de cérvix<sup>133</sup>. Por otra parte, otros estudios no han revelado ninguna correlación estadísticamente significativa con resultados adversos<sup>134</sup>. En nuestro estudio, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de bcl-2 y el carcinoma invasor de cérvix. Tampoco hubo diferencias significativas cuando se estudió dependiendo del tipo histológico, grado de diferenciación y estadio del tumor.

Cheung et al.<sup>135</sup>, en el análisis que realizó en 44 pacientes con adenocarcinoma cervical, encontró que aquellos casos que tenían un aumento en la expresión de bcl-2 se correlacionaban con un peor pronóstico. Sin embargo otros autores como Jain et al.<sup>136</sup>, no encuentran correlación entre el pronóstico clínico y bcl-2. En un estudio realizado por Aletra<sup>137</sup> en carcinomas epidermoides de diferentes grados de diferenciación resultó que la proteína bcl-2 se expresó más frecuentemente en los carcinomas bien diferenciados que en los pobremente diferenciados.

Los resultados conflictivos pueden ser debido a diferencias en el manejo y tratamiento del marcador y las muestras en los diferentes estudios, así como a las

diversas interpretaciones subjetivas de la intensidad de la tinción y las diferencias en la distribución de los puntos de corte para la tinción positiva que puede afectar la correlación con los resultados clínico-patológicos.

El estudio inmunohistoquímico de la proteína Ki-67 es un método fiable de la evaluación de la proliferación celular tumoral. La expresión de Ki-67 muestra correlación con un mal pronóstico en ciertos tipos de cáncer, sin embargo, el valor clínico del índice de proliferación para el pronóstico del cáncer cervical sigue siendo incierto. A pesar de varios estudios los resultados son en gran parte contradictorios, debido a un número limitado de sujetos o diferencias en el tratamiento<sup>138</sup>.

Los estudios en otros tipos de tumores en los que el índice de proliferación celular si está en relación con el valor pronóstico, hacen que se mantenga la hipótesis de que a una mayor actividad proliferativa de las células tumorales se correlaciona con un perfil más agresivo de la enfermedad y en una alta frecuencia de recurrencia o de metástasis<sup>139,140</sup>.

La expresión de Ki-67 ha sido estudiada en lesiones displásicas y carcinoma, observándose un incremento de la expresión de Ki-67 acorde con el incremento de la displasia hasta el carcinoma in situ, pero no se ha observado relación con la presencia de metástasis, ni valor pronóstico.

Aunque la actividad proliferativa ha sido estudiada por algunos autores como un factor pronóstico, en células escamosas de cáncer cervical los resultados han sido contradictorios<sup>141,142</sup>. Algunos autores sugieren que una alta expresión de Ki-67 se correlaciona con una pobre supervivencia, sin embargo, otros no encuentran correlación entre la expresión de Ki-67 y el pronóstico<sup>143,144</sup>.

En nuestro grupo de pacientes que presentan un carcinoma cervical invasivo, la expresión de Ki-67 no es un factor pronóstico estadísticamente significativo en cuanto a

la supervivencia global. La media del índice proliferación es de un 27% (tasa moderada), y al hacer nuestra curva de supervivencia en función de si presenta mayor índice proliferación de la media o menor, la supervivencia global es de un 79.7% versus un 82.1% respectivamente.

La evaluación de la actividad proliferativa también ha sido medida considerando el grado de diferenciación tumoral. Pahuja y colaboradores<sup>99</sup> publicaron que el índice de crecimiento medido con Ki-67 y AgNOR fue mayor en un número significativo de carcinomas pobremente diferenciados en comparación con los carcinomas con buena o moderada diferenciación, siendo este hallazgo correlativo con la agresividad tumoral. Sin embargo, se ha publicado que la actividad proliferativa también se eleva en carcinomas con diferenciación tumoral<sup>145,146</sup>. En estas discrepancias, es posible que influya la acción de las oncoproteínas virales y el grupo tumoral estudiado.

En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proliferación de Ki-67 en función del grado de diferenciación. Respecto al tipo histológico, el único dato destacable fue que en el caso de tumor adenoide quístico, el índice de proliferación celular fue bastante alto con respecto a la media, de un 98%.

Donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas fue al evaluar el índice de proliferación celular en función del estadio del tumor. Observamos como a medida que el estadio del tumor evolucionaba las tasas de proliferación celular eran mayores.

Los resultados variables pueden ser debidos a la falta de consenso en cuanto metodología, especialmente en la definición de los valores de corte de las tasas de proliferación en baja, moderada o alta en las células tumorales.

También parece ser, según diversos estudios publicados, que lo que se ha demostrado es que la expresión inmunohistoquímica de Ki-67 está incrementada en las lesiones intraepiteliales de alto grado pero que va disminuyendo a medida que crece el tumor y por eso en el cáncer invasor de cérvix aún existen resultados contradictorios en cuanto a su estudio.

Revisando la literatura también se observan resultados diversos respecto a la relación de los marcadores entre ellos. Hay autores que han estudiado la relación entre Ki-67 y la expresión de ciclina D1, cuyos resultados son que el porcentaje de Ki-67 es más alto cuando la expresión de ciclina D1 es detectada en el citoplasma y el porcentaje de células positivas a ciclina D1 aumenta con la severidad de la lesión<sup>130</sup>.

En nuestra serie, respecto al análisis de correlación realizado entre los marcadores con evaluación inmunohistoquímica, no hubo significación estadística.

**Limitaciones del estudio:** nuestro estudio sin duda presenta varias limitaciones como son el análisis retrospectivo de los casos, en los cuales en algunos de ellos nos faltaba información, así como de las muestras. El tamaño del estudio se vio reducido en un número de casos ya que no disponíamos de muestras de tejido, bien porque eran diagnósticos extraclínicos, o fueron casos que se trataron con radioterapia y por tanto en las muestras obtenidas no disponíamos de tejido tumoral para evaluar. También existió limitación en algunos casos debida a la dificultad del análisis de estos biomarcadores en muestras tumorales de escaso tamaño o con escasas células tumorales. Para el correcto análisis del ADN del VPH y de la inmunohistoquímica se precisa de muestras tumorales procesadas correctamente y con suficiente material disponible para el análisis.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

El desarrollo de nuevas estrategias preventivas y quimioterapéuticas para el tratamiento del cáncer requerirá de un mejor entendimiento de los constituyentes moleculares de los puntos de control del ciclo celular y de la maquinaria de reparación del ADN<sup>147</sup>. Sin embargo, se pueden hacer algunas predicciones. Las estrategias para favorecer la muerte celular por apoptosis son más efectivas que aquellas que intentan interrumpir la progresión de la proliferación celular; además, las células cancerosas frecuentemente pierden los puntos de control del ciclo celular y las funciones de reparación, o ambas. La supervivencia de las células cancerosas a la quimioterapia o radioterapia dependerá de los puntos de control específicos y/o mecanismos de reparación que han sido alterados, permitiendo ya sea susceptibilidad a estos agentes cuando la reparación del daño es más importante para sobrevivir, o bien, resistencia cuando la respuesta apoptótica es prioritaria. Además, será posible caracterizar los tumores individuales por sus puntos de control y estados de reparación y, por lo tanto, predecir su respuesta a terapias particulares.

Los controles moleculares y las distinciones bioquímicas entre las células cancerosas y normales en los mecanismos de control proveen nuevos blancos potenciales para las terapias antineoplásicas, así como métodos para la identificación de agentes que afectan estos nuevos blancos<sup>148</sup>.

Si el desarrollo de inestabilidad genómica contribuye a la transformación celular y a la progresión del cáncer, entonces las estrategias que reducen la inestabilidad podrían disminuir la incidencia o el porcentaje de desarrollo de cáncer.

La terapia génica representa una alternativa como tratamiento contra el cáncer, pero ésta tiene sus limitaciones. Se aplicaría terapia génica, si se tratase de enfermedades con fondo genético que sean terminales, y si la aplicación de tratamientos

actuales no tuviese ningún efecto. Así, el cáncer con base genética, en estadios avanzados, terminal e incurable, representa un buen candidato para aplicar estas manipulaciones genéticas.

Las vacunas terapéuticas frente a VPH están constituidas por péptidos homólogos a las proteínas virales E6 y E7, y estarían indicadas en el tratamiento de displasias y cánceres invasivos de cérvix, o como terapia adyuvante en recidivas o metástasis. Como el desarrollo de las vacunas terapéuticas se encuentra aún en estudio, el impacto de esta otra estrategia tardará en producirse. En cualquier caso, ya en estos últimos años hemos presenciado uno de los grandes descubrimientos de la medicina actual como es la vacuna para la prevención del cáncer de cérvix. Y en las próximas décadas estaremos, sin lugar a dudas ante uno de los descubrimientos más importantes: el tratamiento de un cáncer mediante vacunación.

## **VI. CONCLUSIONES**

---

---

1. Los hallazgos, en nuestra serie, corroboran los publicados en estudios previos sobre carcinoma de cérvix: edad media en torno a los 50 años, pacientes mayoritariamente multíparas, tipo histológico más prevalente el carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, y frecuencia de adenocarcinoma alrededor del 20%.

2. En nuestro medio, la mayoría de las pacientes se siguen diagnosticando cuando ya tienen síntomas, principalmente metrorragia, y en estadio avanzado (IIB), a pesar de las campañas de cribado que se están realizando.

3. La frecuencia del ADN-VPV, específicamente el genotipo viral 16, en la serie de tumores estudiados ratifica las observaciones de otras investigaciones, según las cuales es el VPV el agente causal necesario e inductor del desarrollo de la neoplasia cervical, tanto de origen epidermoide como glandular. Nuestros resultados demuestran, una vez más, que una tasa mayor al 95% de los carcinomas de cuello uterino posee secuencias de ADN-VPV, confirmando así su estrecha relación etiopatogénica con la carcinogénesis cervical.

4. El genotipo VPV 16 es también en nuestro medio el tipo viral de alto riesgo más frecuentemente asociado al cáncer de cuello uterino y que, además, se presenta indistintamente tanto en carcinomas epidermoides como adenocarcinoma cervical, constituyendo también en este último un factor de riesgo clave para su desarrollo.

5. Las células cervicales malignas inmortalizadas por la expresión de los oncogenes del VPH de alto riesgo muestran una serie de alteraciones en los principales mecanismos reguladores del ciclo celular, que se ven reflejadas en la inmunexpresión aberrante de las ciclinas de la fase G1 (principalmente de la ciclina D1) y en el incremento de marcaje con Ki-67.

6. La expresión inmunohistoquímica de bcl-2 no presenta, en nuestra serie, valor pronóstico, como se refleja en su falta de correlación con la supervivencia y otros factores pronósticos clásicos.

7. La inmunexpresión de ciclina D1 y Ki-67 aumenta a medida que el estadio del tumor progresa, por lo que deben considerarse como marcadores biológicos complementarios en la progresión del cáncer de cérvix.

## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

1. 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.
2. Ferlay J, Bray F, Pisawi P, Parkin DM. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. [Internet]. 2.0 ed. Lyon: IARC; 2004. Disponible en: [www.dep.iarc.fr/globocan/database.htm](http://www.dep.iarc.fr/globocan/database.htm).
3. Tavassoli FA, Devilee P, editors. Tumours of the breast and female genital organs. 3<sup>rd</sup> ed. Lyon: IARC Press; 2003.
4. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *Ca Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
5. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures. 2<sup>nd</sup> ed. Atlanta: American Cancer Society; 2011.
6. North AB, South CD. Cancer Incidence in Antartica (1998-2002). In: Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, editors. *Cáncer Incidence in Five Continents*. Vol. IX. IARC Scientific Publications No. 160. Lyon: IARC; 2007.
7. World Health Organisation. World health statistics 2010. [Internet]. Geneva: WHO; 2010. Disponible en: <http://www.who.int/whosis/whostat/2010>.
8. Área de epidemiología ambiental y cáncer Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. La situación del cáncer en España. [Internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro de publicaciones; 2005. Disponible en: <http://cne.isciii.es/mortal/>.
9. Miñarro R, Black RJ, Martínez C, Navarro C, Garau I, Izarzugaza I, et al. Cancer incidence and mortality in Spain. *Patterns and Trends*. IARC Technical Report n° 36. Lyon: IARC; 2000.
10. Torrejón R, Fernández C, Rita M, editors. *Cáncer de cérvix: Proceso asistencial integrado*. 2<sup>a</sup>ed. Sevilla: Junta de Andalucía. Consejería de Salud; 2010.
11. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-265.
12. De Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048-1056.
13. De Sanjosé S. La investigación sobre la infección por virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino en España. En: De Sanjosé S, García AM. 4<sup>a</sup> Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer: epidemiología y prevención*. Madrid: EMISA; 2006. p. 141-146.
14. Arnheim Dahlstrom L, Andersson K, Luostarinen T. Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus and other risk factors in cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:2541-2550.
15. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-19.
16. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(6):506-511.
17. Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloiqu A, Anttila T, Hallmans G et al. Herpes simplex virus and risk for cervical cancer: a longitudinal nested case-control study in the Nordic countries. *Am J Epidemiol*. 2002;156(8):687-692.
18. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloiqu A, Dillner J, Jellum E, et al. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk of development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001;285(1):47-51.
19. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Nqelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for Chlamydia Trachomatis as a human papillomavirus cofactor in etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis*. 2002;185(3):324-331.
20. Knowlton A, Fowler L, Patel R, Wallet S, Grieshaber S. Chlamydia induces anchorage independence in 3T3 cells and detrimental cytological defects in an infection model. *Plos One*. 2013;8(1):e54022.
21. Mhatre M, McAndrew T, Carpenter C, Burk RD, Einstein MH, Herold BC. Changes in genital tract soluble mucosal immune environment in cervical intraepithelial neoplasia: insights into the biological synergy between HPV and HIV. *Sex Transm Dis*. 2012;39:591-97.
22. Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A, et al. Prevalence, incidence and type-specific persistence of HPV in HIV-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis*. 2001;184(6):682-690.
23. Del Almo J, González C, Losana J. La infección por virus del papiloma humano en poblaciones de alto riesgo de cáncer de cuello uterino en España. En: De Sanjosé S, García AM. 4<sup>a</sup> Monografía de la

- Sociedad Española de Epidemiología. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: epidemiología y prevención. Madrid: EMISA; 2006. p. 71-88.
24. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1093-1101.
  25. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Lowndes CM. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1085-92.
  26. Castellsagué X, Muñoz N. Co-factors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monographs*. 2003;(31):20-28.
  27. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent HPV infection, external genital warts or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 2002;29(11):725-735.
  28. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med*. 2002;346(15):1105-1112.
  29. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-527.
  30. De Williers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HV, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 ;324(1):17-27.
  31. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401: 70-79.
  32. Stanley MA. HPV vaccines: prospects for eradicating cervical cancer. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2004;30(4):213-215.
  33. Ortiz M, Torres M, García A. Determinación del virus del papiloma humano (VPH): aspectos técnicos. En: De Sanjosé S, García AM. 4ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: epidemiología y prevención. Madrid: EMISA; 2006. p. 89-106.
  34. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009;384(2):335-344.
  35. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010;40:1-13.
  36. Bosch FX, Diaz M, De Sanjosé S. Epidemiología de las infecciones por el virus del papiloma humano (HPV): riesgo de carcinoma cérvico-uterino y otros tumores anogenitales. Nuevas opciones preventivas. En: De Sanjosé S, García AM. 4ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: epidemiología y prevención. Madrid: EMISA; 2006. p. 31-50.
  37. Diestro MD, Serrano M, Gómez-Pastrana F. Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología*. 2007;30(2):42-59.
  38. Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res*. 2009;2(10):868-878.
  39. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology Ann*. 1973;8:301-328.
  40. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*. 1968;10:748-784.
  41. National Cancer Institute Workshop. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: revised after second National Cancer Institute Workshop (April 29-30,1991). *Acta Cytol*. 1993;37(2):115-124.
  42. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-2119.
  43. Stoler MH. New Bethesda terminology and evidence-based management guidelines for cervical cytology findings. *JAMA*. 2002;287(16):2140-2141.
  44. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*. 2001;285(11):1500-1505.
  45. Lacruz C. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol*. 2003;36(1):5-10.
  46. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007(9590);370:890-907.

47. Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2101-2104.
48. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener H. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013; Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7).
49. Maucort-Boulch D, Plummer M, Castle PE. Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer.* 2010;126:684-691.
50. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, et al. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ.* 2009;339:2569.
51. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102:315-24.
52. "Oncoguía SEGO: Cáncer de Cuello Uterino 2008. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO; Octubre 2008"
53. Lanzón R, Ruiz MA, Lanzón A. Cáncer invasor del cuello uterino. En: Cabero L. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. Madrid: Médica Panamericana; 2003. p.1559-1577.
54. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. Patología estructural y funcional. 6ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p.296-316.
55. Hardisson D. Carcinoma de cérvix. Tipos histológicos y factores pronósticos. En: X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2009.
56. Acién P. Tratado de obstetricia y ginecología. Ginecología. Alicante: Ediciones Molloy; 2004. p.983-1096.
57. Lerma E. Factores que intervienen en la diseminación del cáncer de cuello uterino. *Rev Esp Patol.* 2005;38(4):201-206.
58. SEGO: Sociedad Española Ginecología y Obstetricia [Internet]. Madrid: SEGO;2005. Bases para la estadificación clínico-quirúrgica en ginecología oncológica. Disponible en: [www.sego.es](http://www.sego.es)
59. Benedit JL, Bender H, Jones H, Nqan HY, Pecorelli S. FIGO staging classification and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000;70(2): 209-262.
60. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):103-104.
61. Cervix. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, editors. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 7<sup>th</sup> ed. New York, NY: Springer; 2010. p. 463-476.
62. SEGO: Sociedad Española Ginecología y Obstetricia [Internet]. Madrid: SEGO;2005. Cáncer de cérvix: diagnóstico y tratamiento. Disponible en: [www.sego.es](http://www.sego.es).
63. Rendón GJ, Ramirez PT, Frumovitz M, Schmeler KM, Pareja R. Laparoscopic radical trachelectomy. *JSLs.* 2012;16(3):503-507.
64. Alexander-Sefre F, Chee N, Spencer C, Menon U, Shepherd JH. Surgical morbidity associated with radical trachelectomy and radical hysterectomy. *Gynecol Oncol.* 2006;101(3):450-454.
65. Peppercorn PD, Jeyarajah AR, Woolas R, Shepherd JH, Oram DH, Jacobs LI, et al. Role of MR imaging in the selection of patients with early cervical carcinoma for fertility-preserving surgery: initial experience. *Radiology.* 1999;212(2):395-399.
66. Delgado G, Bundy BN, Fowler WC Jr, Stehman FB, Sevin B, Creasman WT, et al. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol.* 1989;35 (3):314-320.
67. Zaino RJ, Ward S, Delgado G, Bundy B, Gore H, Fetter G, et al. Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer.* 1992;69(7):1750-1758.
68. Stewart LA, Tierney JF. Neoadjuvant chemotherapy and surgery versus standard radiotherapy for locally advanced cervix cancer: a metaanalysis using individual patient data from randomized controlled trials. *Int J Gynecol Cancer.* 2002;15:579.
69. Markman M. Chemoradiation in the management of cervix cancer: current status and future directions. *Oncology.* 2013;84(4):246-250.
70. Green J, Kirwan J, Tierney J, Vale C, Symonds P, Fresco L, et al. Quimioterapia y radioterapia concomitante para el cáncer de cuello uterino (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007 Número4. Oxford: Update Software Ltd.
71. Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced cervical cancer Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 21 randomised trials. *Euro J Cancer.* 2003;39(17):2470-2486.

72. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta- analysis Collaboration (CCCMAC). Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: individual patient data meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(1):CD008285.
73. Metcalf KS, Johnson N, Calvert S, Peel KR. Site specific lymph node metastasis in carcinoma of the cervix: Is there a sentinel node?. *Int J Gynecol Cancer.* 2000;10(5):411-416.
74. Levenback C, Coleman R, Burke T, Lin W, Erdman W, Deavers M, et al. Lymphatic mapping and sentinel node identification in patients with cervix cancer undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J Clin Oncol.* 2002;20(3):688-693.
75. Beltran Menjon S. Ganglio centinela en ginecología oncológica. En: X Curso de Actualización en Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada; 2006.
76. Plante M, Renaud MC, Tetu B, Harel F, Roy M. Laparoscopic sentinel node mapping in early-stage cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2003;91(3):494-503.
77. Barranger E, Grahek D, Cortez A, Talbot JN, Uzan S, Darai E. Laparoscopic sentinel lymph node procedure using a combination of patent blue and radioisotope in women with cervical carcinoma. *Cancer.* 2003;97(12):3003-3009.
78. Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EEUU [Internet]. Disponible en: <http://www.cancer.gov>
79. Monk BJ, Tian C, Rose PG, Lenciano R. Which clinical/pathologic factors matter in the era of chemoradiation as treatment for locally advanced cervical carcinoma? Analysis of two Gynecologic Oncology Group (GOG) trials. *Gynecol Oncol.* 2007;105(2):427-33.
80. Takeda N, Sakugari N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, et al. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002;81(12):1144-1151.
81. Singh P, Tripcony L, Nicklin J. Analysis of prognostic variables, development of predictive models, and stratification of risk groups in surgically treated FIGO early-stage (IA-IIA) carcinoma cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2012;22(1):115-122.
82. Liu WX, Chen Y, Yang GM. Analysis of prognosis-related factors in patients with invasive cervical adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2011;32(5):500-504.
83. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts GC, et al. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;97(2):223-230.
84. Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J.* 2005; 46(5):597-613.
85. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993;7(5):812-821.
86. Graflund M, Sorbe B, Karlsson M. Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, and p21 (WAF1/CIP1) in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome. *Int J Gynecol Cancer.* 2002;12(3):290-298.
87. Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2001;82(2):238-246.
88. Li T, Zhao L, Liu Z, Han Y, Fan D. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J Gastroenterol.* 2005;11(7):931-937.
89. Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2003; 91(1):51-58.
90. Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, Alderisio M, Vecchione A. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2000;6(9):3600-3606.
91. Singh M, Srivastava S, Singh U, Mathur N, Shukla Y. Co-expression of p53 and Bcl2 proteins in human papillomavirus-induced premalignant lesions of the uterine cervix: correlation with progression to malignancy. *Tumour Biol.* 2009;30(5-6): 276-85.
92. Bitiren M, Cakmak EA, Gocmen A, Inaloz SS, Sari I, Karakok M, et al. The relationship between expression of p53/bcl-2 and clinicopathological criteria in cervix squamous cell carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24(5):411-412.
93. Brychtova S, Brychta T, Kotrsova L, Pilka R, Tichy M, Tticha V, et al. Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma.* 2000;47(3):143-147.
94. Ozalp SS, Yalcin OT, Tanir HM, Dundar E, Yildirim S. Bcl-2 expression in preinvasive and invasive cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002;23(5):419-422.

95. Nair P, Nair KM, Jayaprakash PG, Pillai MR. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res.* 1999;5(2):95-103.
96. Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. Implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(8):935-939.
97. Ali-Fehmi R, Qureshi F, Lawrence WD, Jacques SM. Apoptosis, proliferation and expression of p53 and bcl-2 in endocervical glandular intraepithelial lesions and invasive endocervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23(1):1-6.
98. Kruse AJ, Baak JP, De Bruin PC, Snijders W, Boodt PJ, Fons G, et al. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol.* 2001;193(1):48-54.
99. Pahuja S, Choudhury M, Gupta U. Proliferative in squamous cell carcinoma of cervix: a comparative assessment by two markers. *Indian J Pathol Microbiol.* 2003;46(4):585-588.
100. Mimica M, Tomic S, Kardum G, Hofman ID, Kaliteran V, PejkoVIC L. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20(1):116-119.
101. Klimek M, Kruczak A, Rys J, Mularz K, Halasza K, Moskal J, et al. Clinico-morphological parameters affecting survival of patients with advanced cervical cancer. *Pol J Pathol.* 2011;62(4):250-256.
102. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat N, Koustky L. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003;16(7):665-673.
103. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1167-1173.
104. Schiller JT, Lowy DR. Immunogenicity testing in human papillomavirus virus-like-particle vaccine trials. *J Infect Dis.* 2009;200(2):166-71.
105. Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Moral S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory Bcellular immunity using VPH 16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine.* 2006;24(33-34):5937-5949.
106. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364 (9447):1757-1765.
107. Berzosky JA, Jeffrey DA, Janik J. Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *J Clin Invest.* 2004;114(4):450-462.
108. Schwarz TF SM, Schneider A, Wysocki J, Galaj A, Perona P, Poncelet S, et al. Immunogenicity and tolerability of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. *Vaccine.* 2009;27 (4):581-7.
109. Descamps D, Hardt K, Spiessens B, Izurieta P, Verstraeten T, Breuer T, et al. Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: a pooled analysis of 11 clinical trials. *Hum Vaccin.* 2009;5(5):332-340.
110. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1915-27.
111. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix® and Gardasil® human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin.* 2009;5(10):705-19.
112. David MP, Van Herck K, Hardt K, Tibaldi F, Dubin G, Descamps D, et al. Long-term persistence of anti-HPV-16 and -18 antibodies induced by vaccination with the AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: modeling of sustained antibody responses. *Gynecol Oncol.* 2009;115 (3): 1-6.
113. De Carvalho N, Teixeira J, Roteli-Martins CM. Sustained efficacy and immunogenicity of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3 years in young adult women. *Vaccine* 2010; 28: 6247-55.
114. Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine.* 2007;25 (26):4931-4939.
115. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. The Impact of Quadrivalent Human papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like Particle Vaccine on Infection and Disease Due to Oncogenic Nonvaccine HPV Types in Generally HPV-Naïve Women Aged 16-26 Years. *J Infect Dis.* 2009;199(7):926-35.
116. Bayas JM, Torné A, García-Sicilia J, Alba A. Infección natural y vacunas frente al virus del papiloma humano: papel de los anticuerpos en la protección a largo plazo. *Prog Obstet Ginecol.* 2009; 52(5):281-93.
117. Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer

- caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 2009;374(9686):301-314.
118. Wheeler CM, Castellsague X, Garland SM. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*. 2012;13: 100–110.
  119. Kroger AT, Atkinson WL, Marcuse EK, Pickering LK; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). General Recommendations on Immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2006;55(RR-15):1-56.
  120. WHO[Internet]. Human papillomavirus vaccines. WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record* 2009;89:117-132.  
Disponible en: [http://www.who.int/immunization/documents/WER\\_report\\_HPV\\_Spanish.pdf](http://www.who.int/immunization/documents/WER_report_HPV_Spanish.pdf).
  121. Alameda F, Baro T, Mariñoso ML, Manresa JM, Costa C, Espinet B, et al. Carcinoma escamoso invasor de cérvix uterino. Estudio de la expresión de p53, Bcl-2, Ki-67, c-myc y ciclina D1. *Rev Mex Patol Clin*. 2007;54(4):150-158.
  122. García-Tamayo J, Molina J, Blasco-Olaetxea E. Importance of immunohistochemical studies in the diagnosis and the prognostic evaluation of cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Review. Invest Clin*. 2009;50(2):241-250.
  123. Looi ML, Dali AZ, Ali SA, Nqah WZ, Yusof YA. Expression of p53, bcl-2 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anal Quant Cytol Histol*. 2008;30(2):63-70.
  124. Catarino R, Matos A, Pinto D, Pereira D, Craveiro R, Vasconcelos A, et al. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 160(1):49-54.
  125. Little L, Stewart CJR. Cyclin D1 immunoreactivity in normal endocervix and diagnostic value in reactive and neoplastic endocervical lesions. *Modern Pathology*. 2010;23(4):611-618.
  126. El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Innes J, Prime W, Herrington CS. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and apoptosis-related proteins in endocervical lesions. *Eur J Cancer*. 2007;43(13):2011-2018.
  127. Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, et al. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol*. 2001; 81(3):341-347.
  128. Nichols GE, Williams ME, Gaffey MJ, Stoler MH. Cyclin D1 gene expression in human cervical neoplasia. *Mod Pathol*. 1996;9(4):418-425.
  129. Zhao M, Kim YT, Yoon BS, Kim SW, Kang MH, Kim SH, et al. Expression profiling of cyclin B1 and D1 in cervical carcinoma. *Exp Oncol*. 2006;28(1):44-48.
  130. Carreras R, Alameda F, Mancebo G, García-Moreno P, Costa C, Fusté P et al. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol*. 2007;22(6):587 -592.
  131. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*. 1997;16(4):339-347.
  132. Protrka Z, Djuric J, Protrka O, Arsenijevic S. The possible role of bcl-2 expression of tumors of the uterine cervix. *J BUON*. 2010;15(2):323-9.
  133. Chung TK, Cheung TH, Lo WK, Yu My, Krajewski S, Reed JC, et al. Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Lett*. 2002;180(1):63-68.
  134. Cheah PL, Looi LM. Significance of Bcl-2 and Bax proteins in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study in squamous cell carcinoma and squamous intraepithelial lesions. *Malays J Pathol*. 2006;28(1):1-5.
  135. Cheung TH, Chung TK, Lo KW, Yu My, Krajewski S, Reed JC et al. Apoptosis-related proteins in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2002;86(1):14-8.
  136. Jain D, Srinivasan R, Patel FD, Kumari Gupta S. Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*. 2003;88(1):22-28.
  137. Aletra C, Ravazoula P, Scopa C, Kounelis S, Sotiropoulou G, Kourounis G, et al. Expression of Bcl-2 and Bax in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2000;21(5):494-498.

138. Hanprasertpong J, Tungsinmunkong K, Chichareon S, Wootipoom V, Geater A, Buhachat R, et al. Correlation of p53 and Ki-67 (MIB-1) expressions with clinicopathological features and prognosis of early stage cervical squamous cell carcinomas. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010;36(3):572-580.
139. Kritpracha K, Hanprasertpong J, Chandeying V, Dechsukhum C, Geater A. Survival analysis in advanced epithelial ovarian carcinoma in relation to proliferative index of MIB-1 immunostaining. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005;31(3):268-276.
140. Kuo KT, Chang HC, Hsiao CH, Lin MC. Increased Ki-67 proliferative index and absence of P16INK4 in CIN-HPV related pathogenic pathways different from cervical squamous intraepithelial lesion. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(7):894-899.
141. Shiohara S, Shiozawa T, Miyamoto T et al. Expression of cyclins, p53, and Ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: Overexpression of cyclinA is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease. *Virchows Arch.* 2005;446(6):626-633.
142. Van De Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004;92(1):40-46.
143. Kimura M, Matsumoto T, Morizane T, Sonoue H, Oqishima D, Kinoshita K. Histopathological study of the spreading neoplastic cells in cervical glands and surface epithelia in cervical intraepithelial neoplasia and microinvasive squamous cell carcinoma: Ki-67 immunostaining is a useful marker for pathological diagnosis from the gland involvement site. *Pathol Int.* 2006;56(8):428-433.
144. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, de Nictolis M, Muzzioli M, et al. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer cell activity. *Gynecol Oncol.* 1995;58(1):28-33.
145. Troncone G, Vetrani A, de Rosa G, Gerbasio D, Palombini L. Cyclin dependent kinase inhibitor p27KIP1 expression in normal and neoplastic cervical epithelium. *J Clin Pathol.* 1999;52(12):880-887.
146. Shiozawa T, Shiohara S, Kanai M, Konishi I, Fujii S, Nikaido T. Expression of the cell cycle regulator p27 (KIP1) in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Immunohistochemistry and functional aspects of p27 (KIP1).* *Cancer.* 2001;92(12):3005-3011.
147. Kaelin WG Jr. Synthetic lethality: a framework for the development of wiser cancer therapeutics. *Genome Med.* 2009;1(10):99.
148. Del Campo JM, Prat A, Gil-Moreno A, Pérez J, Parera M. Update on novel therapeutic agents for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(3):72-76.