



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

**“GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL”**

**“GENOTYPING OF HUMAN PAPILOMA VIRUS IN ENDOCERVICAL
ADENOCARCINOMA”**

**PROYECTO DE INVESTIGACION PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA**

AUTOR

MC. JOAN FLAUBERT PEREZ VILLENA

ASESOR

MC. VLADIMIR VILLOSLADA TERRONES

LIMA- PERÚ

2022

RESUMEN

La introducción de la vacuna contra el PVH, ha permitido importantes avances en la prevención y reducción de casos de cáncer de cuello uterino; existen dos tipos histológicos prevalentes el epidermoide y el adenocarcinoma, este último presenta dificultades técnicas para un diagnóstico oportuno y algunos sub tipos no están relacionados al virus de papiloma humano (PVH); actualmente la tasa de frecuencia relativa de adenocarcinoma se ha visto en aumento hasta un 20-25% del cáncer de cérvix; los factores de riesgo son similares en ambos tipos histológicos, siendo el más importante la infección por el PVH; el ácido desoxiribonucleico(DNA) del virus de papiloma de alto riesgo esta presente en cerca del 100% del carcinoma epidermoide, sin embargo, en el adenocarcinoma la prevalencia varía desde 62% al 100%; es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo determinar la frecuencia del virus del papiloma humano en pacientes con adenocarcinoma de cérvix tipo usual, diagnosticadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) entre los años 2008 al 2015. Es un estudio tipo analítico, retrospectivo y transversal. Se identificará a los pacientes con diagnóstico topográfico C53 del CIE10, en base al listado provisto por el Departamento de Estadística y Epidemiología. Luego de determinar el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión y la información será registrada en la base de datos. Se realizará el procesamiento de las muestras de los pacientes seleccionados en el laboratorio de patología y genética. Para el análisis, se utilizará el software estadístico R versión 3.5.1; se reportará estadísticas descriptivas de las variables, con media o mediana para las continuas y frecuencias o porcentajes para las categóricas.

PALABRAS CLAVE: cáncer de cérvix, adenocarcinoma, VPH, genotipificación

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	3
II.	OBJETIVOS.....	13
III.	MATERIAL Y METODOS.....	14
IV.	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	17
V.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	24
VI.	PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA.....	29
VII.	ANEXOS.....	32

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas actualmente son la principal causa de fallecimiento, y se espera que los casos de cáncer incrementen sus indicadores de mortalidad; afectando la sobrevivencia de las personas; según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer de cérvix ocupa los dos primeros lugares de causa de mortalidad en 91 países de 172, convirtiéndose en un problema de salud pública; además ocupa el cuarto lugar de los diferentes tipos de cáncer que han sido diagnosticados y representa la cuarta causa de muerte en mujeres en todo el mundo; sin embargo, en países de bajos recursos ocupa los dos primeros lugares tanto en casos nuevos como en tasa de muerte (1). El año 2018 se informaron 570 000 nuevos casos de cáncer de cuello uterino en todo el mundo, de estos 310 000 pacientes fallecieron; la mayoría de estos casos, es causado por el virus de papiloma humano (PVH) en 99.7% de pacientes con cáncer de cuello uterino; la injuria persistente del PVH de alto riesgo (HR-PVH) estarían asociadas a lesiones cervicales, como la neoplasia intra epitelial cervical (NIC) que es una forma pre invasiva de cáncer de cuello uterino; por tanto, el cáncer de cérvix es el único tumor maligno ginecológico con etiología clara en el mundo. Las características histológicas del cuello uterino, determinan la formación de la zona de transformación que corresponde a la unión de dos epitelios, de las células escamosas del exocervix y las células columnares del endocervix; siendo este el lugar donde se inicia el proceso de transformación maligna, de metaplasia, displasia y cáncer in situ; la zona del exocervix, determinara las lesiones tipo carcinoma epidermoide y las lesiones del endocervix, corresponde a la formación del adenocarcinoma; la dinámica de esta región esta determinada por los cambios dependientes de la edad, de la anatomía y de los ciclos hormonales. La principal prueba de

tamizaje en la mayoría de poblaciones es el papanicolao; no obstante para poder abordar esta región durante el examen, presenta dificultad técnica, que no permite una óptima evaluación en este tipo de prueba; además, las lesiones del tipo de células escamosas se extienden por contigüidad a comparación de las lesiones del adenocarcinoma que lo hacen por “saltos”; el fenotipo de los adenocarcinomas es de alta agresividad, con metástasis hematológica, ganglionar y ovárica, con menores tasas de supervivencia respecto del tipo epidermoide (5). Es importante considerar que la historia natural del adenocarcinoma es generalmente extrapolada del epidermoide, siendo necesario realizar estudios en este tipo de población (4). El carcinoma epidermoide es el tipo más frecuente en comparación con el adenocarcinoma; sin embargo, actualmente la tasa de casos nuevos de adenocarcinoma ha aumentado, llegando hasta un 20-25% del cáncer de cuello uterino (2).

El PVH es un virus que pertenece a la familia Papillomaviridae incluye dos subfamilias, Firstpapillomavirinae, con más de 50 géneros y 130 especies, y Secondpapillomavirinae. La clasificación se basa en la secuencia del ADN del gen L1. PVH mide aproximadamente 50 nm de diámetro y tiene una cápside no envuelta con simetría icosaédrica; su ADN consiste en una doble hélice con un genoma que va desde 5748 a 8607 nucleótidos. La cápside consta de 72 pentámeros de la principal proteína L1 y 12 moléculas de la proteína secundaria L2. El genoma viral es generalmente dividida en una región reguladora upstream (URR) o región de control larga (LCR) y dos grupos de marcos de lectura abiertos (ORF) que se designan como temprano (E) o tardío (L). En el núcleo los genes E1, E2, L1 y L2 cumplen funciones esenciales durante el ciclo de vida del virus en el epitelio. E1, E5, E6, y los genes E7 se consideran accesorios y han evolucionado para facilitar la replicación viral en el epitelio escamoso, no estando presente en todos los tipos de PVH. La infección por VPH ocurre

cuando las partículas virales llegan a estar expuestas a las células basales, generalmente por microtrauma en el epitelio, eso muestra tropismo por células madre de diferentes mucosas y epitelios cutáneos, cuyas diferencias se cree que influyen en el patrón de expresión génica del virus. El virus se une a los proteoglicanos de sulfato de heparán de las células basales y la membrana basal expuesta, que sirve como receptor primario, este enlace ocurre con la proteína L1, que induce cambios en la cápside viral que lo unen a otro receptor, aún no identificado; la internalización de la cápside, que ocurre de manera similar a un mecanismo de macropinocitosis, puede tardar de dos a cuatro horas. La entrada del genoma viral al núcleo está mediada por la proteína L2. A partir de entonces, la infección comienza por el genoma viral. El ciclo de replicación viral tiene tres fases: una inicial amplificación de ADN, con la participación de proteínas E1 y E2; una fase de mantenimiento de la replicación viral que ocurre en las células infectadas en proliferación; y una fase de amplificación del genoma y formación de nuevos virus que ocurre cuando las células completan su diferenciación. La fase de mantenimiento puede durar meses o años. Las proteínas de la cápside viral encapsulan el ADN viral para formar partículas virales que se liberan a medida que se desprenden las células epiteliales (24). El VPH, en general, completa su ciclo de vida en las células epiteliales; no produce viremia, lisis celular ni inflamación; y permanece protegido del sistema inmunitario a través de mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria innata, además retrasa la respuesta inmune adaptativa. El mecanismo por el cual HR-HPVs participan en la oncogénesis incluye una desregulación en viral expresión génica, que es causada por la integración de la genoma viral en lesiones premalignas de alto grado y coexpresión de proteínas E6 y E7. Proteínas E6 y E7 modifican el medio celular, permitiendo la amplificación de la genoma viral en células epiteliales diferenciadas. En la mayoría de los VPH, la proteína E7 se une a la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (pRb) y a

las proteínas relacionadas p107 y p130. En HR-HPV, la proteína E6 inactiva la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo su acción antiproliferativa y apoptótica. Los VPH de riesgo alto 16 y 18 son los tipos más prevalentes asociados con la carcinogénesis de cuello uterino (55% y 16%) (7,8). La etiología del carcinoma de células escamosas está firmemente relacionada con VPH HR. El ADN del VPH HR es encontrado en cerca del 100% de los carcinomas epidermoide, el ADN de VPH en el subtipo histológico adenocarcinoma muestran una prevalencia mucho menor, variando desde 62% al 100%, esta prevalencia varía dependiendo del origen geográfico y los subtipos histológicos de adenocarcinoma. También debemos destacar que el ADN del VPH en adenocarcinoma estará presente pero con menor número de copias; por lo que el uso de la reacción en cadena de polimerasa(RCP) es la técnica más sensible, detecta VPH en sub tipos endocervical, endometroide e intestinal de 80% al 100% de los casos; en los en los sub tipos no mucinosos del adenocarcinoma como: el adenocarcinoma de células claras, serosas y mesonéfrica el ADN del VPH solo se detecta muy raramente, también se demostró que el tipo gástrico, que incluye un adenocarcinoma de desviación mínima, no está relacionado con la infección por el virus papiloma humano (6,9, 10). El sistema internacional de criterios y clasificación de adenocarcinoma endocervical (IECC) para adenocarcinomas endocervicales, describe en el año 2018 la base para la clasificación de la OMS 2020 (11), dividiendo a los adenocarcinomas endocervicales según la relación con VPH, en diferentes tipos, correlacionando características clínicas, la expresión de P16 y estado de VPH, los parámetros pronósticos, la supervivencia y la respuesta al tratamiento (2, 13, 14), sugiriendo un sistema biológicamente más significativo y clínicamente valioso (12). El sistema de la IECC 2018, identifica figuras mitóticas y cuerpo apoptóticos, siendo de fácil aplicación, cuando tenemos las características descritas es probable su relación con VPH, el no tener estas características es probable que el tumor sea

independiente de VPH (2, 15).

La clasificación divide al adenocarcinoma en los dependientes del PVH y los no dependientes del PVH: 1) Adenocarcinoma endocervical asociado a PVH, es del tipo habitual, tipo mucinoso (NOS, intestinal, células de anillo de sello, carcinoma mucinoso estratificado invasivo) y el adenocarcinoma SAI, en el tipo 2) Adenocarcinoma no dependiente del PVH, representa el 15% de los adenocarcinomas endocervicales (gástrico, mesonéfrico, endometroide, adenocarcinoma SAI). El de tipo habitual asociado a PVH, es el más común, representa del 75 a 80 % de todos los adenocarcinomas endocervicales.(16), el perfil inmunológico típico es negativo para receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP), la vimentina , MUC 6 , la napsina A , GATA 3, el receptor de andrógenos (AR).(17). En el del tipo mucinoso, (incluye variantes mucinosas NOS, intestinales, en anillo de sello y ISMC), es importante diferenciar de adenocarcinoma endocervical de tipo usual, ya que poseen diferentes comportamientos, con peores resultados en el comportamiento clínico y supervivencia (14,18,19), estas neoplasias suelen ser negativas para ER, PR, vimentina, MUC 6, GATA 3 y CK 20 , el tipo intestinal puede ser positivo para CDX 2 y CK 20 (17. 20); el de tipo IMSC, tiene un peor pronóstico que los otros tipos asociado a VPH (28), muestra amplia variedad arquitectónica, es importante reconocer sus características ya que puede simular otros subtipos de tumores (21), puede ser focalmente positivo con p63 y p40, especialmente en la periferia, puede mostrar tinción p53 de tipo mutado y, con menos frecuencia, marcaje PAX 8 (22). En los tipos no dependientes de PVH (23); el adenocarcinoma endocervical de tipo gástrico, es el segundo adenocarcinoma de cuello uterino más común, representando >20% de todos los adenocarcinomas cervicales, (24) no existen actualmente marcadores fiables para establecer el diagnóstico, la mayoría expresan

PAX 8 en el 60 al 80% , y son negativos RE, RP, vimentina, P63, p 40 , RA. PAX 2 es típicamente negativo y SATB2 suele ser negativo. MUC 6 son positivos en el 60-80 % de los casos (17); el adenocarcinoma endocervical de células claras, representa el 4% de todos los adenocarcinomas de cuello uterino, se asocia a mujeres jóvenes expuestas a dietilestilbestrol en el utero (cuando afecta el exocérvix) y esporádicamente en mujeres postmenopausicas jóvenes o mayores (cuando afecta predominantemente el endocervix). (27), CK7 Y PAX 8 son positivos en la mayoría de los casos, mientras CDX2, RE, RP, vimentina MUC 6 , GATA 3 Y RA suelen ser negativos (17), NAPSIN es positiva en un 70 % (25). El adenocarcinoma endocervical, tipo mesonéfrico, es muy raro, representa menos del 1% de todos los adenocarcinoma cervicales y se origina a partir de los restos mesonéfricos profundos en la pared lateral cervical (2), son RE Y RP, negativos. GATA 3 Y PAX 8 son frecuentemente positivos, mientras Calretinina , CD10, TTF1, son a menudo pero no siempre, positivos (26). El adenocarcinoma endocervical de tipo endometroide, es un tumor muy infrecuente del cuello uterino <1%, se menciona el origen en el contexto de endometriosis, el diagnóstico se debe hacer con precaución. Suele ser positivo para RE, RP, vimentina, CK7 y PAX8 suelen ser positivos. P53, MUC 6 y SATB2, ocurre en un tercio de los casos, P63, P40, RA, GATA 3, napsin A, CK 20 y TTF1 son negativos(17).

Pulkinen et al (28) realiza un estudio en mujeres con diagnóstico de adenocarcinomas endocervicales (EAC) asociados con la infección por VPH de alto riesgo (VPHar), y los genotipos de VPH 16, 18 y 45. Se reclutaron 87 mujeres de 35 a 60 años diagnosticadas con Células endocervicales atípicas, NOS o Células endocervicales atípicas, 63 (72,4 %) fueron hrHPV positivas y 24 (27,6 %) fueron hrHPV negativas. Entre los pacientes positivos para hrHPV, se encontraron tres EAC, dos adenocarcinomas in situ (AIS), un AIS + lesión

intraepitelial de alto grado (HSIL) y 13 HSIL. De las lesiones verificadas histológicamente, el 68,4% (13/19) eran de origen puramente escamoso. Todos los EAC y AIS fueron HPV16 o HPV 18 positivos. No se encontraron lesiones histológicas de alto grado entre los pacientes negativos para hrHPV con atipia glandular citológica. Una búsqueda posterior en la base de datos reveló un CAE mucinoso de tipo gástrico negativo para VPH que no se detectó en la prueba de detección primaria de VPH. El estudio concluye que las lesiones atípicas que desarrollan cáncer, se relacionan a PVH de alto riesgo.

Liu et al (29), evalúa el rendimiento de legrado endocervical de rutina (ECC) para el diagnóstico de neoplasia intra epitelial cervical (CIN) de alto grado 2, pre cánceres adicionales no detectados por biopsias ectocervicales. Se realiza un estudio observacional retrospectivo. De las 204 mujeres de 30 años o más, 181 (88,7%) se sometieron a CEC. En general, la ECC detectó un 14,4 % de NIC 2 o más (IC del 95 %: 10,0-20,2 %). El legrado endocervical tuvo más probabilidades de encontrar enfermedad en el endocérvix entre las mujeres con citología de alto grado, infección por VPH-16 positiva o impresiones colposcópicas de alto grado (valores de p respectivos <0,05). Entre las mujeres con citología ASC-US o LSIL, aquellas con un examen insatisfactorio tuvieron un rendimiento de 13,0% CIN 2 o peor en ECC (95% CI 6,1-25,7); cuando el examen colposcópico fue normal o satisfactorio con lesiones anormales visibles, la ECC detectó menos del 5% de NIC 2 o más en el endocérvix. Una citología ASC-H o HSIL o más se asoció con un rendimiento de NIC 2 o más del 25,8% por ECC (IC del 95%: 16,6-37,9%); sin embargo, la ECC encontró solo un 3,9 % (IC del 95 %: 1,9-7,8 %) NIC 2 adicional o peor más allá de la enfermedad acumulada detectada por hasta cuatro biopsias de lesiones ectocervicales aceto blancas visibles. El rendimiento adicional de CIN 2 o mas por ECC aumentó cuando se tomaron

menos biopsias dirigidas a la lesión ($p < 0,05$). El estudio concluye que el rendimiento adicional de CIN 2 o más por ECC en una coloscopia con hasta cuatro biopsias ectocervicales fue bajo. En base a nuestros hallazgos, recomendamos realizar una CEC de rutina en mujeres de 45 años o más con infección por VPH-16 y en cualquier mujer de 30 años o más con HSIL o más o citología ASC-H, impresión colposcópica de alto grado o Citología ASC-US o LSIL y un examen insatisfactorio.

De martel et al (30) realiza una revision sistemática acerca de la distribución de los sub tipos de PVH El 4,5 % de todos los cánceres en todo el mundo (630 000 nuevos casos de cáncer por año) son atribuibles al VPH: 8,6 % en mujeres y 0,8 % en hombres. La FA (fracción atribuible) en mujeres oscila entre <3 % en Australia/Nueva Zelanda y EE. UU. y >20 % en India y África subsahariana. El cuello uterino representa el 83 % de los cánceres atribuibles al VPH, dos tercios de los cuales ocurren en países menos desarrollados. Las contribuciones relativas de HPV16/18 y HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58 son 73% y 90%, respectivamente. El acceso universal a la vacunación es la clave para evitar la mayoría de los casos de cáncer atribuible al VPH. La carga preponderante de HPV16/18 y la posibilidad de protección cruzada enfatizan la importancia de la introducción de vacunas más asequibles en los países menos desarrollados.

Tripathi et al (31) realiza un estudio acerca de la via Notch y el VPH en la clinicopatogénesis del cáncer cervical (CC), donde evalúa el papel de JAG1 en los diferentes subtipos histológicos asociados a HPV-16/18 de CC, especialmente ADC (adenocarcinoma). Se estudiaron 40 tejidos cervicales no neoplásicos, 30 muestras precancerosas y 118 tumorales (un total de 188 biopsias de tejido) para determinar la expresión de la proteína JAG1 mediante inmunohistoquímica, inmunotransferencia e infección por VPH. Se identificó un aumento de

dos veces en la expresión de JAG1 citoplasmático (media \pm SE, $3,67 \pm 0,33$; $p = 0,0001$) y nuclear ($3,70 \pm 0,38$, $p = 0,0001$) en normal (N) frente a precanceroso y tres veces citoplasmático ($4,44 \pm 0,17$, $p = 0,0001$) y nuclear ($4,64 \pm 0,17$; $p = 0,0001$) en N vs ISCC (carcinoma de células escamoso invasivo). Se encontró que el 85 % de los pacientes con ADC estaban infectados con el VPH, de los cuales el 100 % estaban infectados con el VPH-16. Estos hallazgos sugieren la interacción sinérgica compleja entre JAG1 y HPV en la regulación de la progresión clinicopatológica de CC a través de su desregulación.

Mpunga et al (32) realiza un estudio donde describe la carga de cáncer atribuible al virus del papiloma humano (VPH) en Ruanda. El cáncer de cuello uterino representó la mayoría de los casos (598 de 738), de los cuales el 96,0 % fueron HR-HPV positivos. HPV16 fue el tipo HR-HPV predominante en el cáncer de cuello uterino (55,0 %), seguido de HPV18 (16,6 %) y HPV45 (13,4 %). HPV16 también predominó en otros sitios de cáncer (60-80% de la fracción atribuible a HR-HPV). Para el cáncer de cuello uterino, la prevalencia específica del tipo varió significativamente según la histología (prevalencia de tipo alfa-9 más alta en 509 carcinomas de células escamosas frente a prevalencia de tipo alfa-7 más alta en 80 adenocarcinomas), pero no entre 501 casos con VIH negativo y 97 con VIH positive; con respecto a los tipos dirigidos y/o protegidos de forma cruzada por las vacunas contra el VPH, el VPH 16/18 representó el 73 %, el VPH 31/33/45/52/58 un 22 % adicional y otros tipos de VPH-AR el 5 % de Carga de cáncer atribuible al VPH, sin diferencias significativas por estado serológico ni por edad. El impacto del VIH en la distribución de los tipos causales de VPH fue relativamente menor, lo que confirma la relevancia específica del tipo de las vacunas contra el VPH, independientemente del estado serológico.

Tan et al (33) realiza un estudio acerca de los resultados de escisión de adenocarcinoma cervical in situ, el estudio recluta mujeres con manejo conservador de adenocarcinoma. El estudio encuentra que a pesar de la presencia de márgenes libres es posible desarrollar la enfermedad invasiva, su abordaje requiere márgenes endocervical y estromal; a pesar de ello la incidencia de cáncer durante el seguimiento fue de 2.3% para las mujeres con márgenes de escisión positivos en comparación con el margen de escisión positivos. El estudio concluye que el adenocarcinoma con márgenes comprometidos debe tener ampliación de márgenes o histerectomía, mientras que a pesar de márgenes negativos se requiere vigilancia continua.

La importancia clínica de la genética del adenocarcinoma endocervical, está basado en que el pronóstico y sobrevida determina por su asociación con los genotipos asociado a VPH y los no asociados. Los no asociados a VPH , se desarrollan en pacientes mayores, se presentan en estadios clínicos avanzados, tienen peor pronóstico , patrones de diseminación diferentes e inusuales y responden de diferente manera al tratamiento; además el hecho de que algunos adenocarcinomas endocervicales sean independientes del VPH es importantes para las estrategias de tratamiento y seguimiento, en el primero la vacunación permitirá una adecuada prevención primaria, mientras en el segundo grupo probablemente deba realizarse esfuerzos a nivel de prevención secundaria (16)

II. OBJETIVOS.

a- Objetivo general:

- a. Determinar los genotipos más frecuentes del virus papiloma humano en las pacientes con adenocarcinoma endocervical atendidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas del 2008-2015

b- Objetivos específicos :

- Describir las características sociodemográficas de las pacientes con adenocarcinoma endocervical atendidas en el instituto nacional de enfermedades neoplásicas periodo 2008-2015
- Determinar la frecuencia de subtipos de virus papiloma humanos en pacientes con adenocarcinoma según tipo histológico.
- Establecer la distribución de oncogenes de virus papiloma humanos en pacientes con adenocarcinoma
- Describir la inmunohistoquímica según la distribución de sub tipos de virus papiloma humanos en pacientes con adenocarcinoma

III. MATERIAL Y MÉTODO

a) Diseño del estudio:

Estudio descriptivo, retrospectivo y corte transversal

b) Población:

Pacientes con diagnóstico patológico de adenocarcinoma endocervical atendidas en el departamento de cirugía oncológica del INEN durante el periodo 2008-2015, según la oficina de estadística e informática, durante el periodo de estudio se atendieron 3000 casos con el diagnóstico en estudio.

c) Criterios de selección:

- **Criterios de inclusión**

- Pacientes del sexo femenino mayores de 18 años
- Historia clínica con datos requeridos del estudio
- Histología informada como adenocarcinoma de cervix en el INEN.
- Muestras de la biopsia de cervix en parafina que se encuentren en el departamento de patología del INEN

- **Criterios de exclusión**

- Antecedente de cáncer ginecológico de tipo uterino, ovarico, vaginal o vulvar
- Antecedente de radiación del área ginecológica pelvica
- Antecedente de conización o histerectomía.

d) Muestreo

i. Unidades de muestreo

Historias clínicas de las pacientes que cuenten con una histología cervical informadas como adenocarcinoma, que cuenten muestras de parafina en el departamento de patología además que cumplan los criterios de inclusión.

ii. Tipo de muestreo

Muestreo no probabilístico

El tamaño de muestra será calculado para proporciones teniendo en cuenta que la presencia de VPH en adenocarcinoma es de 80%, además consideraremos población finita (3000 casos aproximadamente, según datos de estadística), no se consideran las pérdidas ya que se trabajará con muestras de patología.

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2(p)(q)}{d^2}$$

donde:

n = Tamaño de muestra.

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ (ya que la seguridad es del 95%)

p = proporción esperada (en este caso 80% = 0.8)

q = 1 – p (en este caso 1 – 0.8 = 0.2)

d = precisión (en este caso deseamos un 5%)

Reemplazando:

$$(1.96)^2 (0.8) (0.2)$$

$$n = \text{-----}$$

$$(0.05)^2$$

$$n = 246$$

Método de muestreo: El muestreo será de tipo aleatorio simple. Se asignará una codificación interna a toda la población seleccionada, se ordenaran los casos en columnas de cuatro, asignadas como 0,1,2,3; se seleccionara el caso 3 de cada columna ordenada en forma sistemática hasta completar el tamaño de muestra requerido.

IV. Operacionalización de variables

TABLA DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES							
variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Valores Posibles	Criterios de medición	Tipo de Variable	Fuente	Pregunta del Cuestionario
Edad	Qué edad tiene al momento de ingreso al INEN	cuántos años tiene al momento de ingresar al INEN		Edad en años	Cuantitativa continua	Historia clínica o DNI	¿Cuántos años cumplidos tiene?
Lugar Procedencia	Donde vive actualmente	Donde radica al momento de ingresar al INEN	1 2	Lima (1) Provincia (2)	Categorica dicotómica	Historia clínica o DNI	¿Dónde vive actualmente?
Método Anticonceptivo	Protección necesaria contra los embarazos no deseados	Si está usando algún método anticonceptivo o a usado durante los últimos seis meses	1 2	No Hormonal Hormonal	Categorica dicotómica	Historia clínica	¿Qué método anticonceptivo usa?
IMC	Índice que valora la composición corporal	Se calcula con el peso corporal de la paciente y la talla	1 2 3 4 5	Normal Pre-obesidad Obesidad I Obesidad II Obesidad III	Categorica politómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.
Estado Menopáusico	Fecha de ultima regla mayor a un año	Reporte de la paciente sobre la fecha de ultima menstruación.	1 2	Premenopausia Postmenopausia	Categorica dicotómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.
HTA	Diagnóstico de HTA	Reporte de la Historia clínica sobre diagnóstico de HTA	1 2	No HTA HTA	Categorica dicotómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.
DM	Diagnóstico previo de DM	Reporte de la Historia clínica sobre diagnóstico de DM	1 2	No DM DM	Categorica dicotómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.
Tamizaje previo	Si se ha realizado alguna prueba de despistaje	Reporte de la paciente si ha tenido alguna evaluación de despistaje de cáncer ginecológico.	1 2	Nunca Al menos una vez	Categorica dicotómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.

Presencia de Ginecorragia	Sí presenta sangrado transvaginal anormal.	Reporte de la paciente si ha tenido sangrado ginecológico anormal	1 2	No sangrado Sangrado	Categoría dicotómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.
Paridad	Si la paciente ha tenido hijos	Reporte de la paciente si ha tenido hijos	1 2	Nulípara Múltipara	Categoría dicotómica	Historia clínica	Reporte de la historia clínica.
AP biopsia cervix	Resultado de anatomía patológica de la biopsia guiada por colposcopia	Reporte del patólogo	1 2 3 4 5 6 7	-usual. villoglandular. 3. mucinoso. 4. gástrico. 5. endometrioide. 6. células claras. 7. mesonefrico.	Categoría politómica	Resultado de la biopsia cervical	Reporte del patólogo
p16	Prueba positiva para p16	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
p53	Prueba positiva para p53	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
RP	Prueba positiva para receptor progesterona	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
Vimentina	Prueba positiva para vimentina	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
CDX2	Prueba positiva para CDX2	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
GATA3	Prueba positiva	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo

	para GATA3				dicotómica		
Napsin-A	Prueba positiva para Napsin-A	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
MUC6	Prueba positiva para MUC6	Reporte del patólogo	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de IHQ	Reporte del patólogo
VPH 16	Prueba positiva para VPH 16	Reporte de Genética	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de PCR	Reporte de Genética
VPH 18	Prueba positiva para VPH 18	Reporte de Genética	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de PCR	Reporte de Genética
VPH 31	Prueba positiva para VPH 31	Reporte de Genética	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de PCR	Reporte de Genética
VPH 33	Prueba positiva para VPH 33	Reporte de Genética	1 2	Negativo Positivo	Categoría dicotómica	Resultado de PCR	Reporte de Genética

e) Procedimientos del estudio

i. Recolección de datos

Se solicitará al departamento de estadística del INEN, los pacientes atendidos con diagnóstico patológico de adenocarcinoma endocervical de cervix , en el periodo 2008- 2015 , ya identificados los pacientes por historia clínica , se realizará el calculo muestral, se realizará la solicitud del historias clínicas al departamento de archivo del INEN, para posterior recolección de datos, por parte del médico a cargo del proyecto, de acuerdo con las variables requeridas, las cuales

deben cumplir con los criterios de inclusión especificados, estas variables se codificarán con números así mismo a las categorías de cada variable se le codificara con números, se registrarán en una hoja Excel, para posteriormente exportarlo y realizar el análisis respectivo en el software R, el instrumento de recolección será detallado en el anexo.

ii. Muestras biológicas.

Para el presente estudio se trabajará con las muestras de cada una de las pacientes que cuenten con una histología cervical informadas como adenocarcinoma, que cuenten muestras de parafina en el departamento de patología, previa autorización del departamento de patología, estas muestras son parte del banco de patología de la institución, por lo cual no requieren el uso de consentimiento informado

iii. Procesamiento de muestras biológicas.

• **Procesamiento de muestras en Genética:**

Se obtendrán tumores fijados en parafina de los cuales se realizará la extracción del ADN se realiza según el Kit comercial Thermo Scientific GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit adoptado por laboratorio, una vez obtenido el ADN se procederá a detectar el PVH. Para la PCR de detección del ADN viral (PVH), la amplificación se realizará con los cebadores consenso MY09/MY011 que amplifican la región del gen L1 del VPH (6582 –

7033), si se detecta la presencia de material genético viral se procede a la genotipificación mediante enzimas de restricción, pudiendo determinarse los siguientes genotipos.m

GENOTIPO	PVH	PVH	PVH	PVH
	16	18	31	33
El genotipo se determina por las bandas observadas, y estas pueden corresponder a los siguientes pares de bases:	310pb, 72pb	135pb 125pb 85pb 72pb 38pb	381pb	236pb 102pb 72pb 39pb

- **Procesamiento de muestras en Patología:**

Se identificaron las laminas y tacos de las Historias clínicas seleccionadas, y se realizaron los siguientes marcadores. p16, RP, vimentina, CDX2 y MUC6, los resultados fueron interpretados por dos patólogos ginecólogos expertos y los resultados fueron interpretados según las siguientes definiciones: el p16 fue considerado “positivo”, con una tinción difusa nuclear y citoplasmático mayor o igual al 80% de las células tumorales, en “parches” si era irregular menor a 80% de las células tumorales o solo citoplásmicas, si no se observó tinción se consideró como "negativo"; el RP fue considerado positivo con tinción nuclear y se expresó según el porcentaje de

tinción de 0% a 100%; p53 se calificó como "positivo" si era mayor a 80% de los núcleos tumorales fueron positivos, "negativo" cuando no se observó tinción en células tumorales en presencia de un control interno intacto; Las puntuaciones de PR (nuclear), vimentina (citoplasmática o membranosa), Napsin-A (citoplásmica), CDX2 (nuclear), GATA3 (nuclear) y MUC6 se basaron en el porcentaje de células tumorales positivas (0% a 100%) considerando el promedio intensidad (débil, moderada o fuerte).

e. Supervisión y monitoreo de actividades.

Un especialista en patología oncológica y un especialista en genética coordinará con el equipo de su departamento para ver el procesamiento de las muestras, los resultados y el recojo de la información.

Posteriormente dicha información recopilada por cada uno de los grupos mencionados se evaluará con todo el equipo de investigación, una vez por mes, se discutirá los avances del proyecto hasta completar el tamaño de muestra.

g. Procesamiento y análisis estadístico

Para el análisis, se utilizará el software estadístico R versión 3.5.1; se reportará estadísticas descriptivas de las variables, con media o mediana para las continuas y frecuencias o porcentajes para las categóricas, se realizará análisis de validez diagnóstica para detectar virus papiloma humano con los resultados de IHQ.

Aspectos éticos

Los datos se recogerán de las Historias Clínicas del INEN, se reemplazará el número de Historia Clínica por un ID diferente para cada paciente (número correlativo hasta terminar de revisar las historias de los últimos 5 años) la información es estrictamente confidencial y solamente el investigador principal con un coautor (analista de datos) tendrán acceso. Motivo por el cual no amerita consentimiento informado. El proyecto será evaluado por el Comité de Ética de la UPCH y del INEN.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018;68(6):394–424. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, Patel P, Terinte C, et al. International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC) A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix. *Am J Surg Pathol*. 2018 February; 42(2): 214–226. doi:10.1097/PAS.0000000000000986.
3. Gadducci A, Guerrieri ME, Cosio S. Adenocarcinoma of the uterine cervix: pathologic features, treatment options, clinical outcome and prognostic variables *Critical Reviews in Oncology / Hematology* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.01.006>.
4. Glaze S, Duan Q2 Sar A3 Lee S4 Köbel M4 Park E5 Duggan MA. FIGO Stage Is the Strongest Prognostic Factor in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix *J Obstet Gynaecol Can* 2019;000(000):1–7.
5. Williams NL, Werner TL, Jarboe EA, Gaffney DK. Adenocarcinoma of the Cervix: Should We Treat It Differently? *Curr Oncol Rep* (2015) 17:17.
6. Pirog EC. Cervical Adenocarcinoma Diagnosis of Human Papillomavirus–Positive and Human Papillomavirus–Negative Tumors *Arch Pathol Lab Med*. 2017; 141:1653–1667; doi:10.5858/arpa.2016-0356-RA.
7. Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *J Biomed Sci*. 2019 Apr 23;26(1):28. doi: 10.1186/s12929-019-0520-2.
8. Jalal Kiani S, Shatizadeh Malekshahi S, Yousefi Ghalejoogh Z, Ghavvami N, Shafiei Jandaghi NZ, Shahsiah R, Jahanzad I, Yavarian J. Detection and Typing of Human Papilloma Viruses by Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in Cervical Cancer *Journal Microbiol*. 2015 December; 8(12): e26441. doi: 10.5812/jjm.26441.
9. Park JS, Kim YT, Lee A, Lee Y, Kim KT, Cho CH, Choi HS, Jenkins D, Pirog EC, Molijn AC, Ramakrishnan G, Chen J. Prevalence and type distribution of human

- papillomavirus in cervical adenocarcinoma in Korean women *Gynecologic Oncology* 130 (2013) 115–120.
10. Katsiaryna Holl, Andrzej M, Nowakowski, Ned Powell, W. Glenn McCluggage, Edyta C. Pirog, Sabrina Collas De Souza, Wiebren A. Tjalma, Mats Rosenlund, Alison Fiander, et Al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study *Int J Cancer*. 2015 Dec 15; 137(12): 2858–2868.
 11. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *WHO Classification of Female Genital Tumours (Vol 4)*, 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020. [Google Scholar]
 12. Hodgson A, Park KJ, Djordjevic B, et al. . International endocervical adenocarcinoma criteria and classification: validation and interobserver reproducibility. *Am J Surg Pathol* 2019;43:75–83. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 13. Kojima A, Shimada M, Mikami Y, et al. . Chemoresistance of gastric-type mucinous carcinoma of the uterine cervix: a study of the Sankai Gynecology Study Group. *Int J Gynecol Cancer* 2018;28:99–106. [PubMed] [Google Scholar]
 14. Stolnicu S, Hoang L, Chiu D, et al. . Clinical outcomes of HPV-associated and unassociated endocervical adenocarcinomas categorized by the international endocervical adenocarcinoma criteria and classification (IECC). *Am J Surg Pathol* 2019;43:466–74. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 15. Stolnicu S, Hoang L, Soslow RA. Avances recientes en adenocarcinomas invasivos del cuello uterino . *Arco de Virchows* 2019; 457 :537–49. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
 16. Stolnicu S, Park KJ, Kiyokawa T, Oliva E, McCluggage WG, Soslow RA. Tipificación tumoral del adenocarcinoma endocervical: revisión contemporánea y recomendaciones de la Sociedad Internacional de Patólogos Ginecológicos. *Int J Gynecol Pathol* . 2021;40(Suplemento 1):S75-S91. doi:10.1097/PGP.0000000000000751
 17. Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, et al. . Propuesta algorítmica diagnóstica basada en la evaluación inmunohistoquímica integral de 297 adenocarcinomas endocervicales

- invasivos . *Am J Surg Pathol* 2018; 42 :989–1000. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
18. Horn LC, Handzel R, Borte G, et al. . Carcinoma productor de mucina estratificado invasivo (i-SMILE) del cuello uterino: informe de una serie de casos y revisión de la literatura que indica el subtipo de mal pronóstico del adenocarcinoma cervical . *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145 :2573–82. [PubMed] [Google Académico]
 19. Stolnicu S, Boros M, Segura S, et al. . El carcinoma mucinoso estratificado invasivo (iSMC) del cuello uterino a menudo se presenta con características de alto riesgo que son determinantes de un mal resultado: un estudio multicéntrico internacional . *Am J Surg Pathol* 2020; 44 :1374–80. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
 20. McCluggage WG, Shah R, Connolly LE, et al. . El adenocarcinoma cervical in situ de tipo intestinal y el adenocarcinoma exhiben un inmunofenotipo entérico parcial con expresión constante de CDX2 . *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27 :92–100. [PubMed] [Google Académico]
 21. Stolnicu S, Segura S, Parra-Herran C, et al. . Carcinoma productor de mucina estratificado invasivo (iSMC) del cuello uterino: un estudio sobre la diversidad morfológica . *Am J Surg Pathol* 2020; 44 :873–80. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
 22. Nucci MR, Clemente PB, Young RH. Hiperplasia glandular endocervical lobular, no especificada de otro modo: un análisis clinicopatológico de trece casos de una lesión pseudoneoplásica distintiva y comparación con catorce casos de adenoma maligno . *Am J Surg Pathol* 1999; 23 :886–91. [PubMed] [Google Académico]
 23. Stolnicu S, Talia KL, McCluggage WG. El espectro evolutivo de las lesiones precursoras de los adenocarcinomas cervicales . *Adv Anat Pathol* 2020; 27 :278–93. [PubMed] [Google Académico]
 24. Kojima A, Mikami Y, Sudo T, et al. . La morfología gástrica y el inmunofenotipo predicen un mal resultado en el adenocarcinoma mucinoso del cuello uterino . *Am J Surg Pathol* 2007; 31 :664–72. [PubMed] [Google Académico]
 25. Talia KL, Wong RW, McCluggage WG. Expresión de marcadores de carcinoma mulleriano de células claras en adenocarcinomas primarios de tipo gástrico cervical

- y vaginal . *Int J Gynecol Pathol* 2019; 38 :276–82. [PubMed] [Google Académico]
26. Goyal A, Yang B. Patrones diferenciales de inmunotinciones PAX8, p16 y ER en lesiones mesonéfricas y adenocarcinomas del cuello uterino . *Int J Gynecol Pathol* 2014; 33 :613–9. [PubMed] [Google Académico]
27. Hasegawa K, Nagao S, Yasuda M, et al. . Revisión de consenso del Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) para el carcinoma de células claras del cuerpo uterino y el cuello uterino . *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24 :S90–5. [PubMed] [Google Académico]
28. Pulkkinen J, Kares S, Huhtala H, Kholová I. Detection and Outcome of Endocervical Atypia in Cytology in Primary HPV Screening Programme. *Diagnostics (Basel)* 2021 Dec 20;11(12):2402.
29. Liu AH, Walker J, Gage JC, Gold MA, Zuna R, Dunn ST, Schiffman M, Wentzensen N. Diagnosis of Cervical Precancers by Endocervical Curettage at Colposcopy of Women With Abnormal Cervical Cytology. *Obstet Gynecol* 2017 Dec;130(6):1218-1225.
30. Catherine de Martel, Martyn Plummer, Jerome Vignat, Silvia Franceschi. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer* 2017 Aug 15;141(4):664-670
31. Richa Tripathi, Gayatri Rath, Showket Hussain, Poonam Jawanjal, Kapil Bandil, Vishwas Sharma, Mausumi Bharadwaj, Ravi Mehrotra. Jagged-1 induced molecular alterations in HPV associated invasive squamous cell and adenocarcinoma of the human uterine cervix. *Sci Rep* 2018 Jun 19;8(1):9359.
32. Tharcisse Mpunga, Marie Chantal Umulisa, Vanessa Tenet, Belson Rugwizangoga, Danny A Milner Jr, Cyprien Munyanshongore et al. Human

papillomavirus genotypes in cervical and other HPV-related anogenital cancer in Rwanda, according to HIV status. *Int J Cancer* 2020 Mar 15;146(6):1514-1522.

33. Tan JHJ, Malloy MJ, Thangamani R, Gertig D, Drennan KT, Wrede CD, Saville M, Quinn M. Aust N. Management and long-term outcomes of women with adenocarcinoma in situ of the cervix: A retrospective study. *Z J Obstet Gynaecol.* 2020 Feb;60(1):123-129.

VI. PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

El presente estudio es autofinanciado.

Rubros	Parcial	Total
Recursos Humanos		
Consultor	s/. 2000	s/. 2000
Bienes		
Materiales de escritorio.	s/.500	s/.500
Servicios		
Movilidad, viáticos, impresión.	s/. 1000	s/. 1000
Total	s/.3500	s/. 3500

Las pacientes que tienen seguro que les cubra los exámenes IHQ y geno-tipificación son seleccionadas para dicho estudio, el presente estudio será autofinanciado.

- **Cronograma de trabajo**

Actividad	AÑO 2022										
	ENE	FEB	MAR	MAR	ABR	MAY	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP
Revisión Bibliográfica	X	X	X								
Elaboración del Protocolo			X	X	X						
Aprobación del Protocolo						X	X	X			
Recolección de datos							X	X	X		
Análisis de datos									X	X	
Discusión de resultados										X	X

- **Roles del personal**

Actividad	Responsable	Apoyo
Elaboración de protocolo	Investigador Principal	Coautores
Revisión Bibliográfica	Investigador Principal	Coautores
Presentación y aprobación del protocolo	Investigador Principal	Coautores
Análisis de Datos	Investigador Principal	Coautor
Elaboración de informe final	Investigador Principal	Coautores

- **LIMITACIONES**

Por ser el presente trabajo un estudio observacional no permite establecer relaciones de causalidad, debido a su carácter retrospectivo se presenta el sesgo del recuerdo; de otro lado los casos a seleccionar dependen de los criterios de inclusión y exclusión; lo que podría limitar el número de casos a reclutar.

VII. **ANEXOS**

Anexo 1: Instrumento(s) de recolección de los datos

Edad Numérico

Lugar de procedencia

1. Lima____ 2. Provincias____

Método anticonceptivo:

1. Hormonal. ____ No hormonal_____

IMC:

1. Normal. (18.5-24.9)
2. Pre-obesidad. (25-29.9)
3. Obesidad Grado I (30-34.9)
4. Obesidad Grado II (35-39.9)
5. Obesidad Grado III (>40)

Estatus menopáusico:

1. Premenopausia____ 2. Postmenopausia_____

HTA: SI____ NO____

DM: SI____ NO____

Tamizaje previo:

1. Nunca____. Al menos una vez.

Presencia de síntomas:

1. Asintomático_____ 2. Sangrado_____ 3. Dolor pélvico_____

Paridad.

1. Nulípara _____ 2. Multípara_____

Ap biopsia de cérvix.

1. Adenocarcinoma de cérvix tipo usual.
2. Adenocarcinoma de cérvix tipo villoglandular.
3. Adenocarcinoma de cérvix tipo mucinoso.
4. Adenocarcinoma de cérvix tipo gástrico.
5. Adenocarcinoma de cérvix tipo endometroide.
6. Adenocarcinoma de cérvix tipo células claras.
7. Adenocarcinoma de cérvix tipo mesonéfrico.

p16_____ **p53** _____ **RP**_____

Vimentina_____ **CDX2**_____ **GATA3**_____ **Napsin-A**_____ **MUC6**_____

VPH 16_____ **VPH 18**_____ **VPH 31**_____ **VPH 33**_____