

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**EXPRESIÓN GENÉTICA DEL PIK3CA Y PTEN
ASOCIADO A INFILTRADO INFLAMATORIO
INTRARUMORAL (TILs) EN CARCINOMA
ENDOMETRIAL.**

Presentada por

DRA. EIRALI GUADALUPE GARCIA CHAPA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLOGIA Y
CITOPATOLOGIA**

FEBRERO 2019

FEBRERO 2019

"EXPRESIÓN GENÉTICA DEL PIK3CA Y PTEN ASOCIADO A INFILTRADO INFLAMATORIO INTRARUMORAL (TILs) EN CARCINOMA ENDOMETRIAL."

Aprobación de la tesis:



Dr. Med. Gabriela Sofia Gómez Macías
Director de Tesis



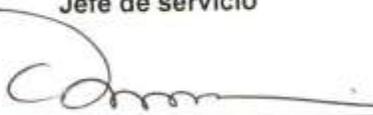
Dr. Med Marco Antonio Ponce Camacho
Co-director de la tesis



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de enseñanza



Dr. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe de servicio



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de estudios de posgrado.

“EXPRESIÓN GENÉTICA DEL PIK3CA Y PTEN ASOCIADO A INFILTRADO INFLAMATORIO INTRARUMORAL (TILs) EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.”

Presentado por:

Dra. Eirali Guadalupe García Chapa

Este trabajo se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” bajo la dirección de la Dra. Gabriela Sofía Gómez Macías y la Co-dirección del Dr. Marco Antonio Ponce Camacho.



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Gabriela Sofía Gómez Macías por haber dirigido esta tesis.

...Al Dr. Ricardo Cerda por su colaboración estadística.

...Gracias al Hospital Universitario que me abrió las puertas para formarme como médico especialista.

...Gracias a los maestros de esta institución por la paciencia y los conocimientos otorgados.

...A mi familia por todo el amor y el tiempo que me han obsequiado.

...A mis compañeros residentes por los momentos compartidos.

DEDICATORIAS

A Dios, el cual me trajo hasta el final de este viaje...

A mi madre, sin la cual nunca hubiera podido realizar mi residencia.

A mi esposo, el cual siempre me ha demostrado su apoyo y ha sido mi sostén.

Alba y Lucía, que son la luz de mi vida y a su corta edad me han acompañado a lo largo de este camino.

A mi padre, que a pesar de ya no estar en el plano físico, cada paso que di sentí su presencia.

A las circunstancias que a pesar de que intentaron detenerme más de una vez, conseguí mantenerme a flote.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I	
RESUMEN.....	10
CAPITULO II	
INTRODUCCIÓN.....	12
MARCO TEORICO.....	12
ANTECEDENTES.....	16
CAPITULO III	
JUSTIFICACIÓN.....	19
CAPITULO IV	
HIPOTESIS.....	20
CAPITULO V	
OBJETIVOS.....	21
CAPITULO VI	
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
CAPITULO VII	
RESULTADOS.....	25
CAPITULO VIII	
DISCUSIÓN.....	31
CAPITULO IX	
CONCLUSIÓN.....	33
CAPITULO X	
BIBLIOGRAFIA.....	34
CAPITULO XI	
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	37

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.- Tipos de carcinoma de Endometrio.....	14
2.- Estadío clínico-patológico del carcinoma de endometrio, tumor primario.....	14
3.- Escala de medición para interpretación de inmunohistoquímica de PTEN.....	24
4.- Comparación de los datos obtenidos mediante PCR e inmunohistoquímica para PTEN.....	26
5.- Datos obtenidos para la asociación de TILS y PCR de PTEN.....	26
6.- Comparación entre los datos obtenidos mediante PCR e Inmunohistoquímica para PIK3CA.....	29
7.- Datos obtenidos para la asociación entre TILS y PCR de PIK3CA.....	29

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Grados histológicos del carcinoma de endometrio.....	15
2.- Ruta de PI3K.....	17
3.- Expresión de Inmunohistoquímica de PTEN.....	27
4.- TILS.....	27
5.- Expresión de la Inmunohistoquímica de PIK3CA.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

FIGO: Federación Internacional de ginecología y obstetricia

MSI: Inestabilidad microsatelite

PCR: Reacción en cadena polimerasa

TILS: Infiltrado Inflamatorio Intratumoral

PI3K: Quinasas Fosfatidilinositol 3

RTK: Receptor tirosina quinasas.

CAPITULO I

1.- RESUMEN

Eiralí Guadalupe García Chapa

Fecha de graduación: Febrero 2019

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

Título final de la tesis: EXPRESIÓN GENETICA DEL PIK3CA Y PTEN ASOCIADO A INFILTRADO INFLAMATORIO INTRARUMORAL (TILs) EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.

Número de páginas: 34

Requisito para obtener el grado de especialista en Anatomía Patológica y Citopatología

Áreas de estudio: Anatomía Patológica

Antecedentes

En el carcinoma endometrial, se conoce que las mutaciones de *PIK3CA* coexisten frecuentemente con mutaciones *PTEN*, *los cuales son genes implicados en la carcinogénesis.*

Actualmente se han evaluado los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs), los cuales expresan CD8 positivo. Kondratiev demostró que la infiltración de células CD8 positivos en la transición con el tumor es un factor pronóstico favorable en el carcinoma endometrial. Actualmente no existe dentro de la literatura la asociación entre la expresión genética de PTEN y PIK3CA, y el conteo de TILs.

Diseño

Se buscaron en una base de datos en el Servicio de patología del Hospital Universitario Dr. José Elueterio González, pacientes con diagnóstico de Cáncer de endometrio de tipo endometroide en un lapso de 5 años. Se buscó la mutación de PTEN en 21 pacientes mediante PCR en tiempo real e inmunohistoquímica y en 22 pacientes para PIK3CA. Además se les realizó el conteo de TILs, en 3 campos de alto poder (400X) en los lugares

donde se identifique mayor cantidad de linfocitos, sacando un promedio de estos y dándole un porcentaje, estableciéndolos como bajo (menos de 50) y alto (mayor de 51).

Resultado

De las 21 pacientes a las que se realizó PCR de tiempo real para PTEN, se encontró que 14 pacientes presentaban mutación para el gen (67%), en cuanto al conteo de TILS se encontraron que 8 pacientes, presentaban un conteo elevado (38%). De las 14 pacientes que presentaron mutación en el gen, 9 (64%) obtuvieron un conteo de TILS bajo, mientras 5 (36%) obtuvieron un conteo de TILS alto. En la pacientes wild-type el 57% (4 pacientes) se clasificaron como TILS bajos, y 3 (43%) como TILS altos, con una p de 0.751.

Del gen PIK3CA, 8 (36%) pacientes presentaron mutación del gen. 14 pacientes (64%) presentaron conteo de TILS bajos y 8 (36%) conteo de TILS altos. De las pacientes con conteo de TILS bajos, 4 pacientes (44%) presentaron mutación en el gen, mientras que 10 pacientes presentaron genotipo wild-type. De las 8 pacientes con conteo de TILS altos, 5 pacientes (56%) presentaron mutación del gen, y 3 pacientes (23%) presentaron genotipo wild-type con una p de 0.119.

Conclusión

Se observó que la mayoría de las pacientes presentaban un conteo de TILS bajo, en ambos grupos de pacientes, sin embargo no existe una correlación entre los genes de la carcinogénesis y el porcentaje de TILS, ya que nuestros resultados obtenidos no fueron significativos.

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

MARCO TEORICO

El cáncer de endometrio representa la neoplasia de origen ginecológico más frecuente en el Occidente (1), se estima que en el 2012 se diagnosticaron 320 000 nuevos casos en todo el mundo por lo que es el quinto cáncer más común en las mujeres (2).

Los carcinomas endometriales fueron clasificados por Bokhman según sus características clínicas, endocrinas y epidemiológicas, dividiéndolos en Tipo I y Tipo II (Tabla 1), el desarrollo del tipo I depende de la estimulación de estrógenos, progresando generalmente de lesiones hiperplásicas, mientras que el tipo II (no endometriode) se desarrolla en un endometrio atrófico en mujeres mayores (3).

En cuanto a la clasificación histológica, la Organización Mundial de la Salud las divide de la siguiente forma: Carcinoma endometriode, carcinoma endometriode con diferenciación escamosa, carcinoma endometriode, variante villoglandular, carcinoma endometriode, con diferenciación secretora, carcinoma mucinoso, carcinoma seroso, carcinoma de células claras, carcinoma neuroendocrino de células pequeñas, carcinoma neuroendocrino de células grandes, carcinoma de células mixtas, carcinoma indiferenciado, carcinoma desdiferenciado, carcinosarcoma (tumor mixto Mülleriano maligno).

El sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) para carcinomas del útero esta oficialmente designado para carcinomas endometrioides y se basa en características arquitectónicas, clasificándolos de la siguiente manera:

Grado 1 5% o menos patrón de crecimiento sólido no escamoso

Grado 2 6% a 50% patrón de crecimiento sólido no escamoso

Grado 3 > 50% patrón de crecimiento sólido no escamoso.

La atipia nuclear notable, que excede la que se espera rutinariamente para el grado arquitectónico, aumenta un grado en el tumor. Figura 1. (CAP 2018).

Alrededor del 75 % de los pacientes se diagnostican en sus primeras etapas (FIGO I o II) y la supervivencia global a los 5 años es de 74 a 91 %. En la etapa avanzada III o IV de la enfermedad la supervivencia global a 5 años es de 57-66 % y 20-26 % , respectivamente (Tabla 2).

En la actualidad, las mutaciones genéticas representan una nueva forma de clasificación de este carcinoma. Al tipo I se han relacionado mutaciones de PTEN, PIK3CA, FGFR2, ARID1A, CTNNB1, PIK3R1 y KRAS, además de la inestabilidad microsatélite (MSI) que se encuentra en un tercio de los tumores tipo I. En los tipo II, las mutaciones de TP53, PIK3CA y PPP2R1A son a los que se han encontrado relacionados (4).

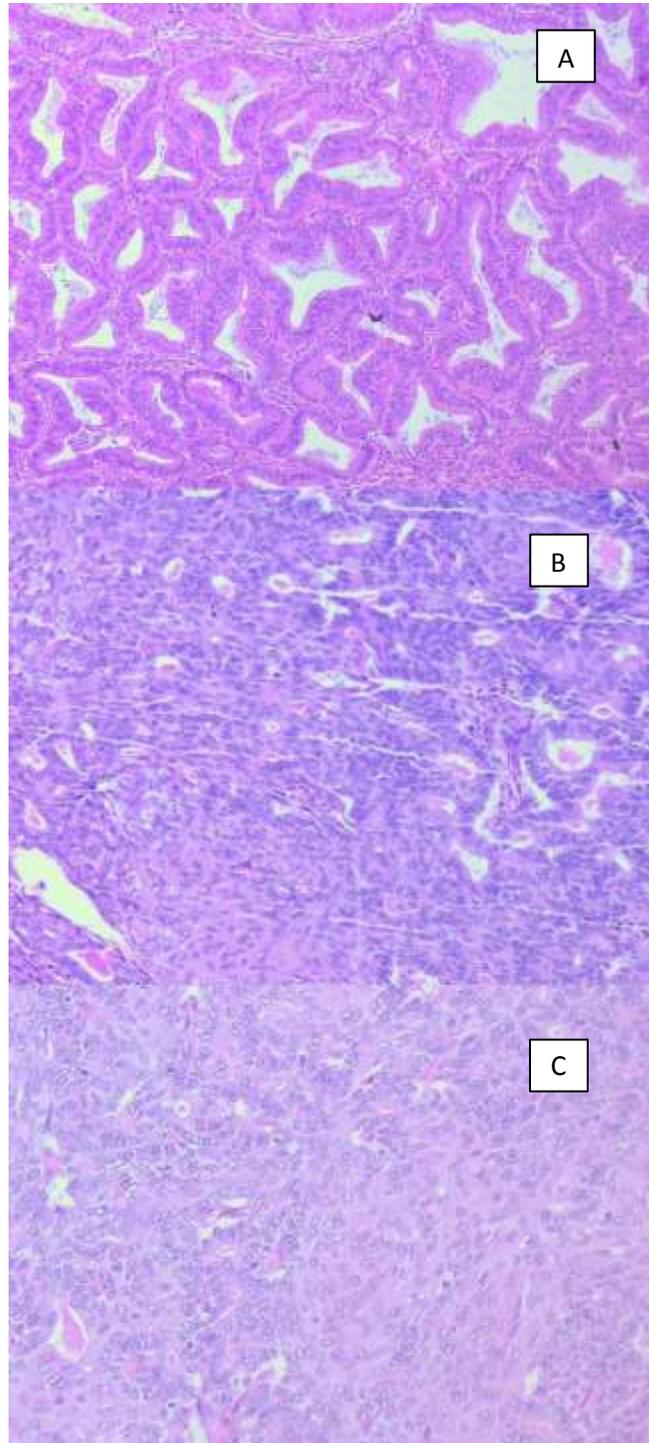
Tabla 1.- Tipos de Carcinoma de endometrio.

Parámetro	Tipo 1	Tipo 2
Frecuencia	70-80%	20%
Estimulo estrogenico	Presente	Ausente
Edad	50-60	60-70
Estatus de menopausia	Pre y perimenopausia	Postmenopausia
Presencia de hiperplasia	Presente	Ausente
Tipo Histológico	Endometroide	Seroso, papilar y células claras
Alteraciones genéticas	MSI, PTEN, PIK3CA, CTNNB1	P53, perdida de PAX2
Pronostico	Favorable	Desfavorable

Tabla 2.- Estadío clínico-patológico del carcinoma de endometrio, tumor primario, según la FIGO

Tumor primario
pTX: Tumor primario no puede ser evaluado
pT0: No evidencia de tumor primario
pT1: Tumor confinado al cuerpo uterino, incluida la afectación glandular endocervical
pT1a: tumor limitado al endometrio o que invade menos de la mitad del miometrio
pT1b: tumor que invade más de la mitad del miometrio
pT2: tumor que invade el tejido conectivo estromal del cuello uterino pero que no se extiende más allá del útero. Esta NO incluye afectación glandular endocervical
pT3: tumor que implica serosa, anexos, vagina o parametrio
pT3a: el tumor involucra serosa y / o anexos (extensión directa o metástasis)
pT3b: afectación vaginal (extensión directa o metástasis) o compromiso parametrial
pT4: tumor que invade la mucosa de la vejiga y / o la mucosa intestinal (el edema bulloso no es suficiente para clasificar un tumor como T4)

Figura 1.- Grados histológicos del carcinoma de endometrio tipo endometroide. A) Grado 1, B) Grado 2, C) Grado 3



ANTECEDENTES

Las quinasas fosfatidilinositol 3 (PI3Ks) son una familia de quinasas lipídicas que regulan el crecimiento celular, proliferación, transformación, adhesión y apoptosis. El gen PIK3CA codifica la subunidad catalítica (p110a) de Clase I A PI3Ks, que participan en la señalización celular de tirosinas quinasas receptoras sobre la unión del factor de crecimiento. Las mutaciones somáticas de ganancia de función en el gen PIK3CA han sido relacionadas con una gran variedad de tumores malignos humanos, entre ellos el cáncer de endometrio (5).

El gen PTEN es un gen supresor, ubicado en el cromosoma 10, codifica una proteína de 403 aminoácidos con la actividad de la fosfatasa de lípidos, está involucrado en una señal de transducción que regula el crecimiento celular, la migración y la apoptosis, la alteración de este por mutación o delección se ha reportado en el melanoma, gliomas, cáncer de próstata y endometrio, en este último específicamente se ha visto presente en la carcinogénesis en las lesiones precursoras (6-7).

La vía de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) se encarga de el metabolismo, crecimiento celular y la supervivencia, tras la estimulación del receptor tirosina quinasas (RTK), estimula a PI3K, la cual fosforila PIP2, creando PIP3, esta última recluta proteínas, proteína quinasa AKT, en la membrana. AKT es fosforilado y activado por complejo MTOR 2, AKT fosforila e inhibe el complejo 2 de la esclerosis tuberosa, dentro del complejo multiproteína, que inhibe indirectamente el complejo 1 de mTOR. PI3K-AKT activa mTORC1, un regulador clave del metabolismo y los procesos biosintéticos; PTEN hidroliza PIP3 de vuelta a PIP2, desactivando la ruta. La vía PI3K (Figura 2) contiene numerosos ciclos de retroalimentación negativa y está interconectada intrincadamente con otras vías de señalización (12).

Actualmente se ha encontrado terapias que activan la respuesta inmunitaria contra el cáncer, por lo que se han evaluado los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs), los modelos que explican este fenómeno, identifican leucocitos mieloides, macrófagos, células dendríticas, las células antitumorales T que migran pueden ser activadas o suprimidas (8). La mayoría de los TILs en carcinoma endometriales expresan CD8 positivo. En un estudio publicado por Kondratiev y cols, correlacionó significativamente el número de linfocitos T CD8 positivos, en la frontera invasiva, aquellos que presentaban

mas de 10 linfocitos intraepiteliales en el campo invasivo, tenía mayor supervivencia (87%) que los que tenían menos de 10 (50%). Esto formó un parteaguas, ya que demostró por primera vez que la infiltración de células CD8 positivos en la transición con el tumor es un factor pronóstico favorable en el carcinoma endometrial (9). En otros estudios han observado que la acumulación estromal de CD8 no se encontró beneficio pronóstico con estos pacientes, sin embargo la acumulación y retención de células T dentro del epitelio es componente clave en la respuesta inmune, debido a que se ha realizado con una mayor supervivencia (10).

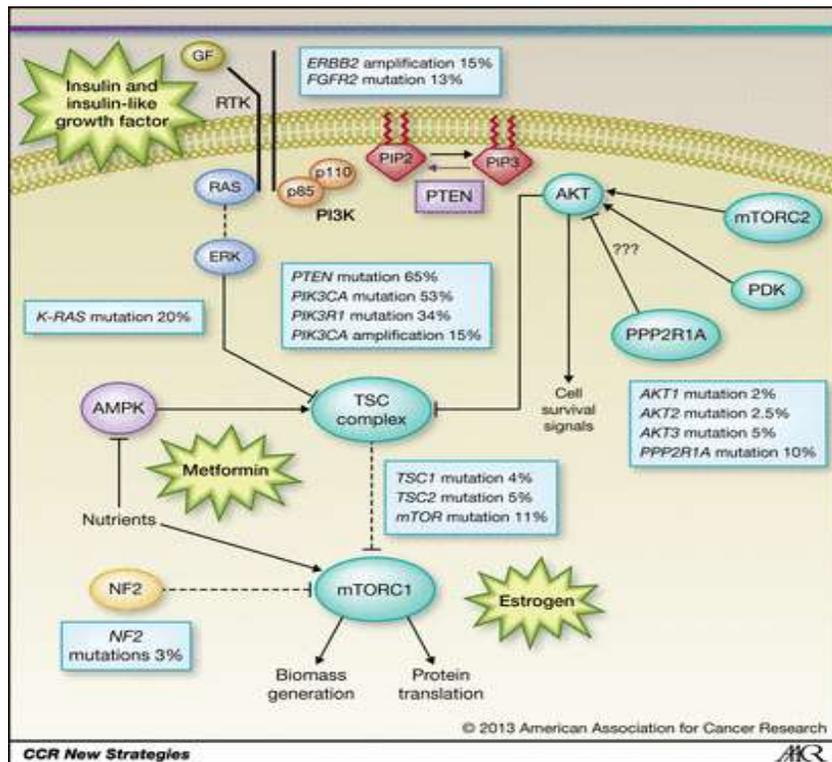


Figura 2: Esquema de la ruta de PIK3.

Diversos estudios encontrados, muestran la asociación de PIK3CA y PTEN en otros carcinomas dentro de la economía, tal es el caso del carcinoma de pulmón, ya que se ha observado que cuando estos tenían una alta expresión (de los genes), daban un impacto significativo en la supervivencia después de dar un tratamiento dirigido (12).

En los carcinomas endometriales, se ha descubierto que las mutaciones PIK3CA coexisten frecuentemente con mutaciones PTEN, de hecho se maneja la hipótesis de que las alteraciones en los genes supresores de tumores pueden

causar haploinsuficiencia. Se ha sugerido que en ciertas circunstancias, 1 golpe puede ser suficiente para la inactivación de los genes supresores de tumores, como PTEN, de hecho se sugiere que PIK3CA y la inactivación monoalélica de PTEN pueden tener un efecto aditivo en los carcinomas endometriales (13).

La expresión genética es una medición de la actividad en un gen, por el número de veces que se transcribe en ARNm y por la proteína que codifica, para llegar a esto se pueden utilizar diversos métodos los cuales consisten en: Inmunohistoquímica (IHQ), Hibridación in Situ Fluorescente (FISH), reacción de cadena polimerasa (PCR) y microarreglos de ADN (14). En diversos estudios encontrados en cáncer de endometrio, el método más utilizado para estos se basan en PCR y su comprobación por Inmunohistoquímica (13,15).

En cuando a la realización de TILs no existe un método como tal identificado en el endometrio en la cuantificación de estos, sin embargo en otros órganos (mama) este se encuentra establecido, el cual consiste en determinar el tejido estromal, dentro de la transición del tumor (periferia), no realizarse en lugares con artefactos necrosis, se cuantifican todas las células mononucleares, excluyendo los polimorfonucleares (8,11).

En carcinoma de endometrio, los estudios que se han realizado, se evalúan los TILs al 400X, seleccionando seis áreas diferentes (tres del epitelio dentro del tumor y tres en el área del estroma), se cuentan de forma manual, sin embargo posteriormente fueron corroborados mediante tinciones de inmunohistoquímica (16).

CAPITULO III

JUSTIFICACIÓN

Se realizó una búsqueda intencionada dentro de la literatura internacional, sin embargo no se encontró ningún estudio que hable sobre la asociación entre la expresión de genes relacionados a carcinogénesis (PTEN y PIK3CA) con el conteo de TILs en carcinoma de endometrio tipo I.

CAPITULO IV

HIPOTESIS

Hipótesis:

La expresión de genes relacionados a la carcinogenesis, PTEN y PIK3CA está relacionada con cierto conteo de TILs en el carcinoma de endometrio tipo I.

Hipótesis nula :

La expresión de genes relacionados a la carcinogenesis, PTEN y PIK3CA *no* está relacionada con cierto conteo de TILs en el carcinoma de endometrio tipo I.

CAPITULO V

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe relación entre la expresión genética de PTEN y PIK3CA con la expresión en porcentajes de TILs en el carcinoma de endometrio tipo I.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar el infiltrado inflamatorio en carcinoma de endometrio tipo I.
- 2) Determinar la expresión genética de PTEN y PIK3CA en el cáncer de endometrio tipo I y correlacionar dicha expresión por inmunohistoquímica.
- 3) Se correlacionará el conteo de TILS con el estadio patológico.

CAPITULO VI

MATERIAL Y METODOS

Diseño metodológico del estudio:

Se trata de un estudio observacional, transversal, retrospectivo y de cohorte transversal.

Características de la población:

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de Carcinoma de Endometrio de tipo endometrioide tipo I.
- Contar con bloques y laminillas para la realización del conteo de TILs y realización de inmunohistoquímica.
- Corroborar que se realizó previamente la expresión de PTEN y PIK3CA mediante PCR en tiempo real.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que tengan diagnóstico de Carcinoma de endometrio de tipo II

Criterios de eliminación:

- No contar con material disponible (Bloques y laminillas)

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ESTUDIO:

1.- Se buscaron en una base de datos previamente hecha en un periodo de 5 años (en la cual no se revelará la identidad de los pacientes, ya que solo se manejarán por el número de bloque que se registró en el Departamento de Anatomía Patológica a su ingreso, por lo cual al momento de una publicación su identidad será protegida) pacientes con diagnóstico de Cáncer de endometrio, a las que se haya realizado la expresión génica de PTEN y PIK3CA, los cuales se establecieron en el protocolo "PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNÉTICA EN CÁNCER ENDOMETRIAL TIPO I CORRELACIONADO CON EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR, Y EXPRESIÓN EN RECEPTORES HORMONALES".

2.- Se buscó si se cuenta con bloques y laminillas para la realización del trabajo de investigación, se recolectaron un total de 21 pacientes para la expresión de PTEN y 22 para la expresión de PIK3CA.

3.- Se verifico que se haya realizado la expresión génica de PTEN y PIK3CA

4.- Se seleccionaron áreas específicas del tumor donde se realizaron arrays (6) para la posterior realización de Inmunohistoquímica con base en: PTEN y PIK3CA

5- Se estableció concordancia con el diagnóstico previo, estadio patológico y se contó el infiltrado inflamatorio estromal, en 3 campos de alto poder (400X) en los lugares donde se identificó mayor cantidad de linfocitos, sacando un promedio de estos y dándole un porcentaje, estableciéndolos como bajo (menor de 50) y alto (mayor de 51).

INTERPRETACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUIMICA

PTEN:

Para la realización de los estudios de inmunohistoquímica, se seleccionaron áreas específicas del tumor (con mayor porcentaje de linfocitos) donde se realizaron arrays (un total de 6), se realizaron cortes de 3 micras, se utilizó la clona 6H2-1, basándose en las recomendaciones del fabricante del anticuerpo. Se incluyeron controles positivos para el marcador en cada laminilla. Se utilizó una escala de medición publicada por Akiyama (17) la cual se resume en la tabla 3

Al obtener ambas mediciones, se realizó una multiplicación entre los dos resultados, siendo considerado como PTEN mutado en aquellas pacientes que el resultado final sea 0, mientras que una puntuación mayor de 2 se considera como wild-type.

PIK3CA

Para la realización de los estudios de inmunohistoquímica, se seleccionaron áreas específicas del tumor (con mayor porcentaje de linfocitos) donde se realizaron arrays (un total de 6), se realizaron cortes de 3 micras, se utilizó la clona OTI6D9, basándose en las recomendaciones del fabricante del anticuerpo. Se incluyeron controles positivos para el marcador en cada laminilla.

Se utilizó una escala de medición, publicada por Akiyama y cols (17) la cual se resume en la tabla 3.

Al obtener ambas mediciones, se realizó una multiplicación entre los dos resultados, siendo considerado como PIK3CA mutado en aquellas pacientes que el resultado final sea mayor de 6, y como wild-type en aquellas que fuera menor de 5.

PCR

Se realizó en un estudio previo denominado “Perfil de expresión genética en cáncer endometrial tipo I, predictivo de comportamiento tumoral”, la detección mediante PCR en tiempo real, la expresión de los genes PTEN y PIK3CA en tejidos endometriales, en la cual se utilizaron la mezcla principal de cDNA SuperScrip® VILO™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) en el Verity Thermal Cycler con 2 nanogramos de ARN total.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó el programa IBM SPSS versión 24, se realizó la prueba de Chi cuadrada, para buscar la asociación entre las diferentes variables. Un valor de $p < 0.05$ será considerado estadísticamente significativo.

Se estableció la sensibilidad y la estabilidad de la prueba de inmunohistoquímica mediante chi cuadrada y si se estableció la concordancia entre la expresión de PCR y las pruebas de inmunohistoquímica, utilizando el coeficiente kappa de Cohen.

Tabla 3.- Escala de medición para la interpretación de la inmunohistoquímica de PTEN y PIK3CA según Akimaya

Porcentaje de tinción de células tumorales	Intensidad de tinción
0 Negativo	0 Negativo
1 Menor del 10%	1 Leve
2 10-50%	2 Normal
3 Mas del 50%	3 Intensidad aumentada

CAPITULO VII

RESULTADOS

PTEN

Se obtuvieron 21 casos de pacientes, que cumplieron con los criterios de inclusión para el proceso de PTEN mediante inmunohistoquímica y PCR.

Obteniendo los siguiente resultados: De los 21 casos, 13 pacientes presentan genotipo mutado, mientras que 8 casos presentaron genotipo wild-type, mediante inmunohistoquímica (Figura 3) en los cuales 14 casos tuvieron una puntuación de 0 y 7 casos presentaron una puntuación mayor de 2 (Tabla 4). De los 21 casos analizados, 19 presentaron concordancia de acuerdo a los resultados de inmunohistoquímica y PCR, por lo que lo que la prueba presenta una sensibilidad del 93% y especificidad del 86%, obtenido mediante chi cuadrada, con una concordancia del 0.786 obtenido mediante Kappa de Cohen.

A los 21 casos se contabilizaron los TILS, 8 casos obtuvieron TILS altos (38%) y 13 TILS bajos (62%) (Figura 4). De los casos que expresaron mutación de PTEN (14 casos), 9 (64%) presentaron TILS bajos, mientras 5 casos (36%) TILS altos; de los casos que no presentaron mutación de PTEN (Tabla 4) obteniendo una p de 0.751 y 0.557 respectivamente.

En cuanto a la etapa clínica, de las 21 pacientes, 13 (62%) presentaron etapa clínica tipo PT1A, 6 (28%) Etapa clínica PT1B, 1 (5%) PT2 y 1 (5%) PT3A. De los 13 pacientes con etapa clínica PT1A, 8 pacientes (62%) obtuvieron TILS bajos, mientras 5 pacientes (38%) TILS altos. De los 6 pacientes en etapa clínica PT1B, 4 pacientes (67%) obtuvieron TILS bajos, mientras que 2 pacientes (33%) TILS altos. El caso en etapa clínica pT2 obtuvo TILS bajos, El caso que se encontraba en etapa clínica PT3A obtuvo TILS altos.

Tabla 4: Comparación de los datos obtenidos por PCR e inmunohistoquímica para PTEN

Genotipo	PCR	Inmunohistoquímica
Mutado	14 (67%)	13 (62%)
Wild-type	7 (33%)	8 (38%)
TOTAL	21 (100%)	21 (100%)

Tabla 5.- Datos obtenidos para la asociación entre TILS y PCR de PTEN.

		PCR		Total
		Mutado	No Mutado	
TILS	Bajos	9 64.3%	4 57.1%	13 61.9%
	Altos	5 35.7%	3 42.9%	8 38.1%
Total		14 100.0%	7 100.0%	21 100.0%

Figura 3: Expresión de inmunohisquímica de PTEN. A) Control de PTEN en endometrio proliferativo, B) Positivo, C) Negativo.

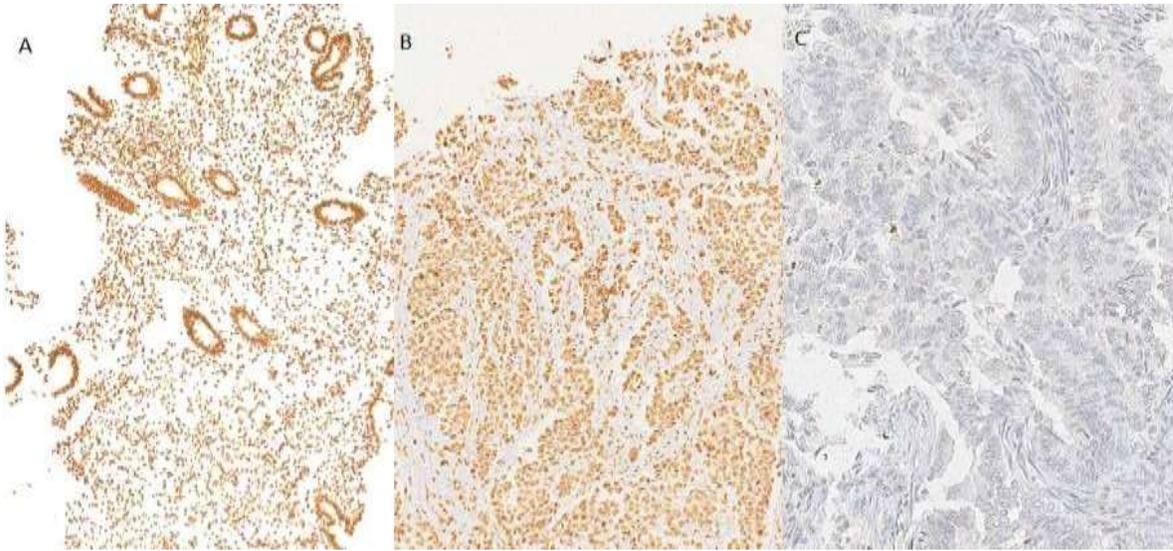
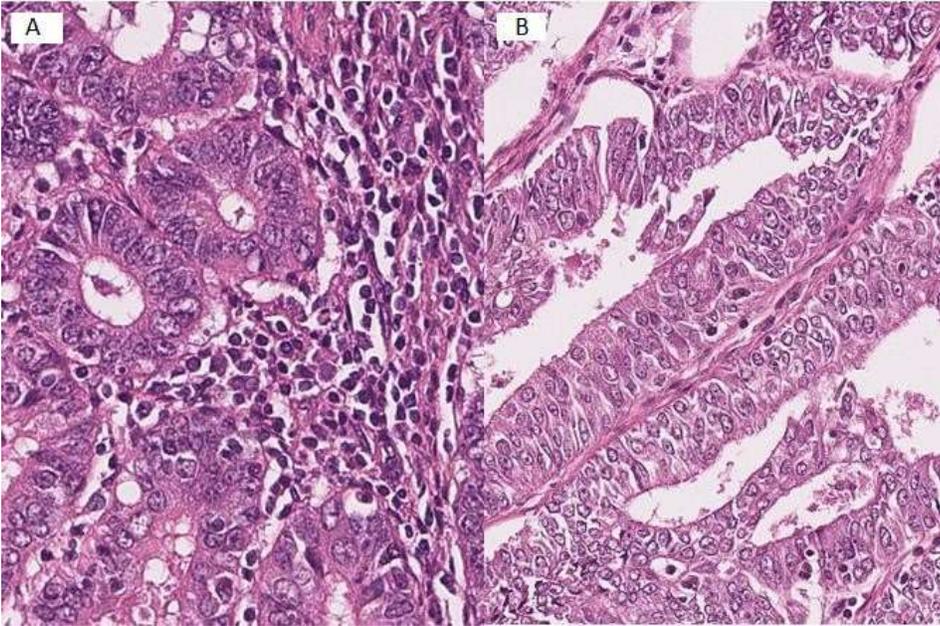


Figura 4: A) TILS altos, B) TILS bajos.



PIK3CA

Se obtuvieron 22 pacientes, que cumplieron con los criterios de inclusión para el proceso de PTEN mediante inmunohistoquímica y PCR.

Obteniendo los siguiente resultados: De los 22 casos, 9 pacientes (41%) presentan genotipo mutado, mientras que 13 casos (59%) presentaron genotipo wild-type mediante PCR. 7 casos (39%) presentaron mutación mediante inmunohistoquímica (Figura 5) con una puntuación mayor de 6, mientras que 15 casos (61%) obtuvieron una puntuación menor de 6, corroborando el genotipo wild type (Tabla 6). De los 22 casos analizados, 20 presentaron concordancia de acuerdo a los resultados de inmunohistoquímica y PCR, por lo que lo que la prueba presenta una sensibilidad del 78% y especificidad del 100%, obtenido mediante chi cuadrada, con una concordancia del 0.805 obtenido mediante Kappa de Cohen.

A los 22 casos se les contabilizó los TILS, obteniendo: 14 casos con TILS bajos (64%) y 8 casos (36%) con TILS altos. De los 9 casos que presentaron mutación de PIK3CA mediante PCR, 4 casos (45%) presentaron TILS bajos, mientras que 5 casos (56%) obtuvieron TILS altos. De los 13 casos que presentaron el genotipo Wild Type, 10 casos (77%), obtuvieron TILS bajos, mientras que solo 3 casos (23%) obtuvieron TILS altos

En cuanto a la etapa clínica de las 22 pacientes, 11 casos (50%) se encontraban en la etapa clínica PT1A, 7 casos (32%) PT1B, 1 caso (4%) PT2A, 2 casos (10%) PT3A y 1 caso (4%) PT3B.

De los 11 casos con PT1A, 7 pacientes (64%) se cuantificaron TILS bajos y 4 pacientes (37%) TILS altos. De los casos en estadio PT1B, 3 pacientes (43%) obtuvieron TILS bajos, mientras que 4 pacientes (57%) TILS altos. El caso PT2A obtuvo TILS bajos. De los 2 pacientes en etapa clínica PT3A, ambos obtuvieron TILS bajos. El caso en etapa clínica PT3B obtuvo TILS bajos.

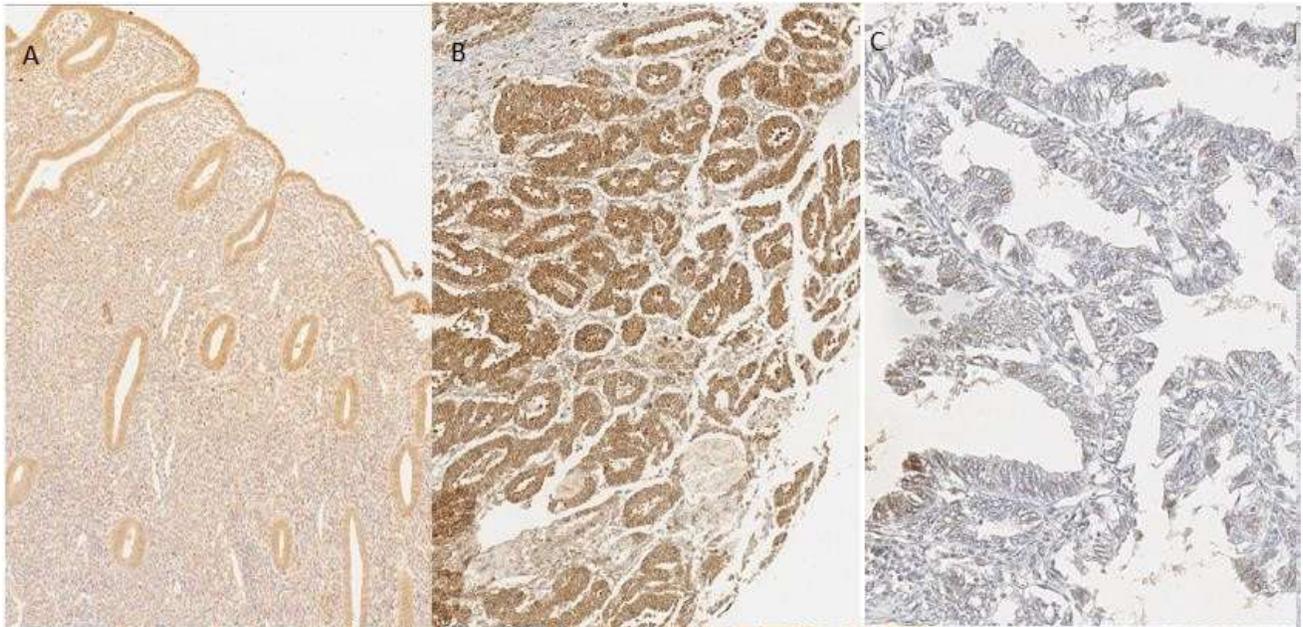
Tabla 6: Comparación de los datos obtenidos por PCR e inmunohistoquímica para PIK3CA

Genotipo	PCR	Inmunohistoquímica
Mutado	9 (41%)	7 (39%)
Wild-type	13 (59%)	15 (61%)
TOTAL	21 (100%)	21 (100%)

Tabla 7: Datos obtenidos para la asociación entre TILS y PCR de PIK3CA

TILS	PCR		Total
	Mutado	Wild type	
Bajos	4 44.4%	10 76.9%	14 63.6%
Altos	5 55.6%	3 23.1%	8 36.4%
Total	9 100.0%	13 100.0%	22 100.0%

Figura 5: Expresión de la inmunohisquímica de PTEN. A) Control de PTEN en endometrio proliferativo, B) Positivo, C) Negativo



CAPITULO VIII

DISCUSIÓN.

El cáncer de endometrio representa uno de los carcinomas ginecológicos con mayor prevalencia en el mundo desarrollado.

Este es el primer estudio que busca la asociación entre los genes de la carcinogénesis (PTEN y PIK3CA) y el infiltrado inflamatorio intratumoral, por lo que no contamos con estudios previos para realizar una comparación con el nuestro, nuestros resultados mostraron que aquellas pacientes que presentan mutación en PTEN los TILS prevalentes eran los bajos, mientras que en PIK3CA los TILS bajos fueron frecuentes en aquellas pacientes que presentaron un genotipo wild-type, pero no obtuvimos resultados significativos, ya que no muestran una asociación entre ambos grupos, por lo que la hipótesis nula fue corroborada.

Se ha investigado con anterioridad la importancia del microambiente inmunitario en pacientes con mutaciones en el gen de la polimerasa ϵ (*POLE*) o inestabilidad microsatélite (MSI).

Se ha observado que aquellos que presentan inestabilidad microsatélite con mayor número de mutaciones somáticas, se asocian a la presencia de células T CD8 positivos intratumorales, demostrando la importancia clínica del microambiente inmunitario (17).

El conteo de TILS lo realizamos según lo encontrado en protocolos previos tanto en carcinoma de de endometrio como en otros órganos (20), nuestros casos presentan de forma común TILS bajos, sin embargo otros estudios en endometrio han reportado la estirpe de los linfocitos y los han correlacionado con factores pronósticos (9,21) siendo una limitante de este estudio, ya que solo se hizo el conteo mediante Hematoxilina y Eosina, sin utilizar marcadores de inmunohistoquímica específicos.

Al correlacionar la etapa clínica con el infiltrado inflamatorio intratumoral pudimos observar que la mayoría de las pacientes con etapas clínicas tempranas y los TILS bajos eran prevalentes, no obtuvimos resultados estadísticamente significativos. Otros estudios han buscado la asociación entre ambas variables, encontrando una relación entre CD8 y CD3 y etapas clínicas avanzadas (9,16)

Se conoce que la infiltración de células T intratumorales se asocia con un pronóstico favorable en los pacientes con cáncer de endometrio (16), al igual que los tumores que presentan mutación en PTEN, por lo que se pensó que podrían guardar una correlación entre estos.

PTEN puede presentar mutación o delección y esta se encuentra relacionada al carcinoma de endometrio del tipo I.

Estudios anteriores sugieren la evaluación por inmunohistoquímica, la cual ha demostrado ser un método eficaz para conocer si existe o no expresión de PTEN y PIK3CA.

En estudios previo, se encontró el algoritmo utilizado en este estudio, es efectivo y reproducible (18,19).

Estadísticamente encontramos un alto nivel de correlación entre lo efectuado mediante e PCR y la inmunohistoquímica (p:0.001).

CAPITULO IX

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio observamos que la mayoría de las pacientes presentaban un conteo de TILS bajo, en ambos grupos, sin embargo no existe una correlación entre los genes de la carcinogénesis y el porcentaje de TILS con los datos obtenidos.

Al realizar el conteo de TILS observamos mayor prevalencia de TILS bajos, sin obtener resultados significativos.

Además, podemos concluir que la inmunohistoquímica es una forma eficiente para saber si existe o no una mutación en los genes de PTEN y PIK3CA con el algoritmo antes mostrado en este estudio y que observamos resultados semejantes en la literatura revisada con anterioridad.

CAPITULO X BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Piera Gargiulo, Chiara Della Pepa, Simona Berardi, Daniela Califano , Stefania Scala ,Luigi Buonaguro , Gennaro Ciliberto , Peter Brauchli , Sandro Pignata. Tumor genotype and immune microenvironment in POLE-ultramutated and MSI-hypermuted Endometrial Cancers: New candidates forcheckpoint blockade immunotherapy? *Cancer Treatment Reviews* 48 (2016) 61–68.
- 2.- Philippe Morice Dr Prof, Alexandra Leary MD, Carien Creutzberg Prof, Nadeem Abu-Rustum Prof, Emile Darai Prof. Endometrial cáncer. *Lancet, The*, 2016-03-12, Volume 387, Issue 10023, Pages 1094-1108.
- 3.- Rajmohan Murali, Robert A Soslow, Britta Weigelt. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol*. 2014 Jun;15(7):e268-78.
- 4.- Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al, for the Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013; 497: 67–73.
- 5.- Radka Kaneva, Roumen Dimitrov, Alexey Savov, tephán Ivanov, Tzvetanka Dyankova, Ivo Kremensky, and Vanio Mitev. Rare Mutations in the PIK3CA Gene Contribute to Aggressive Endometrial Cancer. *DNA and Cell Biology*. January 2010, 29(2): 65-70.
- 6.- K. Daniilidou¹ , M.Frangou-Plemenou¹ , J. Grammatikakis² , O. Grigoriou³ , N. Vitoratos³ , A.Kondi-Pafiti Prognostic significance and diagnostic value of PTEN and p53 expression in endometrial carcinoma. A retrospective clinicopathological and immunohistochemical study, *J BUON* 2013; 18(1): 195-201
- 7.- Hongbo Sun, MD, Takayuki Enomoto, MD, PhD, Masami Fujita, MD, PhD, Hiroko Wada, MD, PhD, Kiyoshi Yoshino, MD, PhD, Keiichiro Ozaki, MD, Takafumi Nakamura, MD, PhD, and Yuji Murata, MD, PhD. American Society of Clinical Pathologists Mutational Analysis of the PTEN Gene in Endometrial Carcinoma and Hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 2001;115:32-38
- 8.- R. Salgado, C. Denkert, S. Demaria, N. Sirtaine, F. Klauschen, G. Pruneri, S. Wienert, G. Van den Eynden, F. L. Baehner, F. Penault-Llorca, E. A. Perez, E. A. Thompson, W. F.

Symmans, A. L. Richardson, J. Brock, C. Criscitiello, H. Bailey, M. Ignatiadis, G. Floris, J. Sparano, Z. Kos, T. Nielsen, D. L. Rimm, K. H. Allison, J. S. Reis-Filho, S. Loibl, C. Sotiropoulos, G. Viale, S. Badve, S. Adams, K. Willard-Gallo, S. Loi; The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015; 26 (2): 259-27.

9.- Aljo¹a Mandi^Ê Endometrial cancer: Importance of tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factor. *Arch Oncol* 2004;12(4):215-6.

10. Hagma H. Workel, Fenne L. Komdeur, Maartje C.A. Wouters, Annechien Plat , Harry G. Klip , Florine A. Eggink et al. CD103 defines intraepithelial CD8 β PD1 β tumourinfiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. *J Immunol.* 2015 Apr 1;194(7):3475-86.

11.- Kurt A Schalper^{*} PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes Revisiting the antitumor immune response potential in breast cancer *Oncoimmunology.* 2014; 3.

12.- Endoh H¹, Yatabe Y, Kosaka T, Kuwano H, Mitsudomi T. PTEN and PIK3CA Expression Is Associated with Prolonged Survival after Gefitinib Treatment in EGFR-Mutated Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology* Volume 1, Issue 7, September 2006, Pages 629-634.

13.- Ana Velasco, Elena Bussaglia, Judit Pallares MD , Xavier Dolcet PhD, David Llobeta , Mario Encinas , Nuria Llecha , Jose Palacios , Jaime Prat, Xavier Matias-Guiu. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. Correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Human Pathology* (2006) 37, 1465 – 1472.

14.- Shi W, Balazs B, Gyirffy B et al. Combined analysis of gene expression, DNA copy number, and mutation profiling data to display biological process abnormalities in individual breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Apr; 144 (3):561-8

15.- Katsutoshi Oda, David Stokoe, Yuji Taketani and Frank McCormick. High Frequency of Coexistent Mutations of *PIK3CA* and *PTEN* Genes in Endometrial Carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: (23). December 1, 2005.

16.- Čermáková P, Melichar B, Tomšová M, Zoul Z, Kalábová H, Spaček J, Doležel M
Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 2014 Oct;34(10):5555-61.

17.- Yuji Ikeda, Kazuma Kiyotani, Poh Yin Yew, Sho Sato, Yuichi Imai, Rui Yamaguchi, Satoru Miyano, Keiichi Fujiwara, Kosei Hasegawa, Yusuke Nakamura. Clinical significance of T cell clonality and expression levels of immune-related genes in endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2017 May; 37(5): 2603–2610. Published online 2017 Mar 29

18.- Judith Pallares Elena Bussaglia, Jose Luis Martínez-Guitarte, Xavier Dolcet, David Llobet, Montserrat Rue, Lidia Sanchez-Verde, Jose Palacios, Jaime Prat, Xavier Matias-Guiu. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Modern Pathology* volume18, pages719–727 (2005)

19.- Garg K, Broaddus RR, Soslow RA, et al. Pathologic Scoring of PTEN Immunohistochemistry in Endometrial Carcinoma is Highly Reproducible. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 In Press

20 Shona Hendry; Roberto Salgado; Thomas Gevaert. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non–Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol* Volume 24, Number 6, November 2017

21. PETRA ČERMÁKOVÁ¹, BOHUSLAV MELICHAR^{2,4}, MARKÉTA TOMŠOVÁ¹, ZDENĚK ZOUL², HANA KALÁBOVÁ⁴, JIŘÍ ŠPAČEK³ and MARTIN DOLEŽEL⁴
Prognostic Significance of CD3+ Tumor-infiltrating Lymphocytes in Patients with Endometrial Carcinoma. *ANTICANCER RESEARCH* 34: 5555-5562 (2014)

CAPITULO XI RESUMEN

AUTOBIOGRAFICO EIRALI

GUADALUPE GARCIA CHAPA

Nacida en San Luis Potosí el 17 de mayo de 1988. Radicada en la zona fronteriza por 25 años.

Realicé mis estudios de pregrado en la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE TAMAULIPAS, en la FACULTAD DE MEDICINA E INGENIERIA DE SISTEMAS COMPUTACIONALES en la ciudad de Matamoros Tamaulipas del año 2006 al año 2012.

El servicio social, lo realicé en el área de la investigación en el DEPARTAMENTO DE GENETICA HUMANA de la FACULTAD DE MEDICINA E INGENIERIA DE SISTEMAS COMPUTACIONALES.

Actualmente residente del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario perteneciente a la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN.