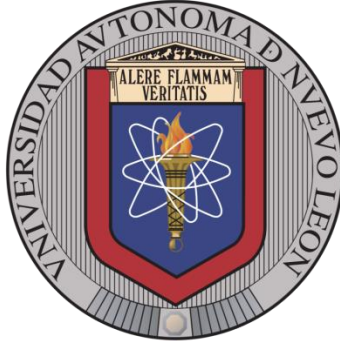


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES PIK3CA Y EGFR EN CARCINOMA DE CÉRVIX ENTRE MUJERES MENORES Y MAYORES DE 40 AÑOS

TESIS

DR. MAURICIO DELGADO MORQUECHO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

ENERO 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO

“DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”

SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES PIK3CA Y EGFR EN CARCINOMA DE CÉRVIX ENTRE MUJERES MENORES Y MAYORES DE 40 AÑOS

PRESENTA

DR. MAURICIO DELGADO MORQUECHO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA
PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

DIRECTOR: DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA

CO DIRECTOR: DR. ÁLVARO BARBOSA QUINTANA

MONTERREY, N.L., MEXICO

ENERO 2020

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO
"DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ"
SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA

**COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES PIK3CA Y EGFR EN
CARCINOMA DE CÉRVIX ENTRE MUJERES MENORES Y MAYORES DE 40
AÑOS**

Aprobación de Tesis



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Director de Tesis



Dr. Álvaro Barboza Quintana
Codirector de tesis



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de enseñanza



Dr. Med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Coordinador de Investigación



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe del Servicio



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES PIK3CA Y EGFR EN
CARCINOMA DE CÉRVIX ENTRE MUJERES MENORES Y MAYORES DE 40
AÑOS**

PRESENTADO POR:

DR. MAURICIO DELGADO MORQUECHO

Este trabajo se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" bajo la dirección del Dra. Med. Oralia Barboza Quintana y la codirección del Dr. Álvaro Barbosa Quintana.



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana

Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

Enero 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi amada esposa Ludmila Arantes por su apoyo incondicional, paciencia y comprensión durante todo el tiempo que hemos estado juntos.

A la Dra. Oralia Barboza por su dirección en la realización de esta tesis, sus consejos, esfuerzo y trabajo, así como su apoyo constante durante la residencia, también a la Dra. Raquel Garza por sus enseñanzas y su motivación diaria, y por ser mi primer contacto con la residencia.

A mis compañeros residentes Adriana, Lucía, Hersy, Bárbara, Lalo, Eiralí, Elizabeth, Ari Itzel, Daynna, Gaby, Max, Edwards, Valeria y Adriana con los cuales compartí esta etapa, gracias por su amistad, compañía y confianza; También al Dr. Rodolfo Franco, compañero residente y maestro, quien fue un apoyo constante.

A Daniel y Melissa que se convirtieron en amistades y que fueron un apoyo constante cuando las cosas se ponían difíciles.

A todos mis profesores de la residencia, quienes me guiaron y me brindaron las bases para el aprendizaje de esta hermosa especialidad, al Dr. Marco Ponce, Dr. Juan Pablo Flores, Dr. Álvaro Barbosa, Dr. Luis Ángel Ceceñas, Dra. Gabriela Sofía, Dra. Natalia Vilches.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....5

RESUMEN7

INTRODUCCIÓN.....8

 Epidemiología 8

 Virus del Papiloma Humano 9

 Factores de riesgo 13

 Cáncer de cérvix en pacientes jóvenes 13

 Mutaciones en el cáncer de cérvix 14

 Cáncer de cérvix en nuestro hospital 17

JUSTIFICACIÓN 19

HIPÓTESIS..... 19

OBJETIVOS 20

MATERIAL Y MÉTODOS 20

 Resultados PIK3CA..... 30

 Resultados EGFR 32

 Resultados VPH..... 34

DISCUSIÓN 37

CONCLUSIONES..... 39

REFERENCIAS 40

RESUMEN

Mauricio Delgado Morquecho

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultado de Medicina.

Título del estudio: Comparación De Mutaciones En Los Genes Pik3ca Y Egfr En Carcinoma De Cérvix Entre Mujeres Menores Y Mayores De 40 Años.

Número de páginas: 43.

Requisito para obtener el grado de especialista en anatomía patológica.

Área de estudio: Anatomía Patológica.

Propósito y método del estudio: El cáncer de cérvix representa 569,847 casos nuevos y 311,365 muertes en todo el mundo cada año, más que cualquier otro tumor ginecológico, ocupando el cuarto lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial. En México el cáncer de cérvix ocupa el tercer lugar en incidencia con 7 869 casos en 2018, sólo después del cáncer de mama y de tiroides; y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres con 4 121 muertes en el mismo año. Se han realizado diversos estudios sobre mutaciones en el carcinoma de cérvix en un intento de encontrar factores pronósticos, blancos terapéuticos y una mejor comprensión del desarrollo de esta enfermedad; se han reportado mutaciones oncogénicas en los genes PIK3CA y EGFR sugiriendo estrategias de terapia blanco. En nuestro estudio analizamos 48 casos de carcinoma de cérvix invasor en pacientes menores de 40 años y 49 casos de carcinoma de cérvix invasor en pacientes mayores de 40 años, estudiando la presencia de mutaciones en PIK3CA y EGFR, así como los diferentes tipos de virus de papiloma humano.

Contribuciones y conclusiones: En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las mutaciones de los genes PIK3CA y EGFR en carcinoma de cérvix entre mujeres menores y mayores de 40 años. Sin embargo, se encontró una alta frecuencia de amplificación de EGFR en carcinomas escamosos comparado con adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos es un hallazgo que sugiere que los carcinomas de cérvix se originan de diferentes vías dependiendo del tipo histológico.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología

El cáncer de cérvix representa 569,847 casos nuevos y 311,365 muertes en todo el mundo cada año, más que cualquier otro tumor ginecológico, ocupando el cuarto lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial.¹ La incidencia de cáncer de cérvix ha disminuido importantemente, principalmente en dos períodos, el primero a inicios del siglo veinte con los cambios en políticas de salud pública y cambios en el estilo de vida, y el segundo en la última mitad del siglo con la implementación del tamizaje por citología cervical

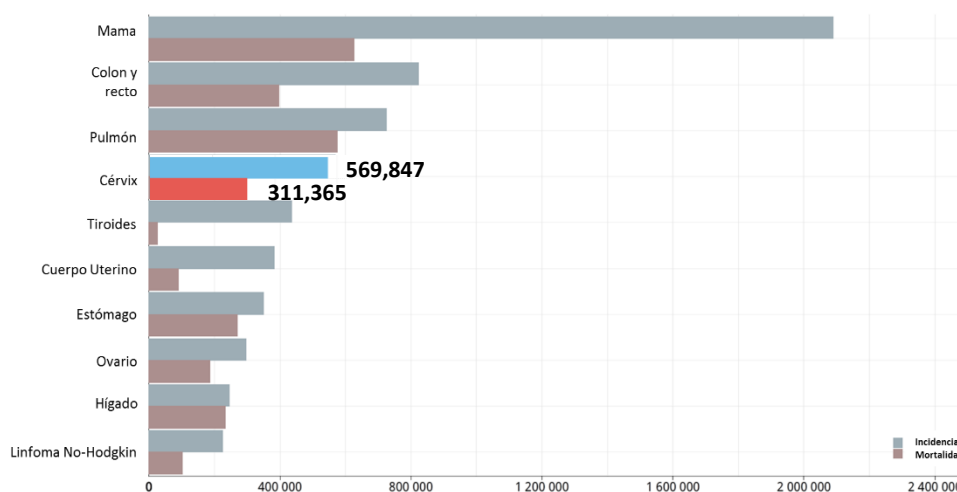


Figura 1. Número estimado de casos y muertes por cáncer en mujeres de todas las edades. (Globocan 2019 [1])

con papanicolaou.² Sin embargo, aproximadamente 76% de los casos de cáncer de cérvix se presentan en países en vías de desarrollo, principalmente en países de África sub-Sahariana; en países de Asia del este y sur, Europa del este y Latinoamérica el número de casos nuevos se ha mantenido constante. Este contraste es mayor si se compara por grupos de edad, ya que el 34% de los casos ocurren en pacientes de 15 a 49 años en los países en vías de

desarrollo, mientras que en los países desarrollados sólo 10% de los casos se presentan en este grupo de edad.³

En México el cáncer de cérvix ocupa el tercer lugar en incidencia con 7 869 casos en 2018, sólo después del cáncer de mama y de tiroides; y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres con 4 121 muertes en el mismo año.^{1,4,5} Se incrementa la prevalencia a partir de los 35 años alrededor de un 30%, hasta alcanzar un pico máximo en el grupo de edad de 50 a 59 años, con una edad promedio de 49.2 años.⁶

Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma son un grupo de pequeños virus tumorales de ADN sin envoltura con un tamaño de virión de ~ 55 nm de diámetro. Este grupo de virus infecta a diversas especies, desde pájaros hasta mamíferos, incluidos los humanos. Los virus del papiloma generalmente causan tumores benignos, pero a veces también causan carcinomas.⁷

Hasta la fecha, se han secuenciado completamente más de cien genotipos (tipos) de virus del papiloma humano y animal. El virus del papiloma se replica y ensambla exclusivamente en el núcleo; infecta los queratinocitos en las capas basales del epitelio escamoso estratificado. Sin embargo, la expresión y replicación de genes virales se realiza de forma estrictamente controlada y regulada por la diferenciación de queratinocitos. Aunque el mecanismo sobre cómo la diferenciación de los queratinocitos regula la expresión génica del VPH no se comprende completamente, existe un acuerdo general de que la expresión génica viral conduce a la expresión de seis proteínas reguladoras virales no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) desde la región temprana del genoma viral en queratinocitos indiferenciados o diferenciados intermediamente y dos proteínas estructurales de la cápside viral (L1 y L2) de la región tardía del genoma en queratinocitos que experimentan diferenciación terminal. La

proteína E4 continúa expresándose en los queratinocitos diferenciados terminalmente. E1 y E2 están involucrados en la replicación del ADN viral y la regulación de la transcripción temprana. E4 expresado en una infección productiva se asocia con el colapso del filamento de citoqueratina. E5, E6 y E7 son oncogenes virales y su expresión induce la immortalización y transformación celular. En particular, E6 y E7 son dos oncoproteínas virales que inactivan, respectivamente, p53 y pRb, dos proteínas supresoras de tumores celulares.^{7,8,9,10}

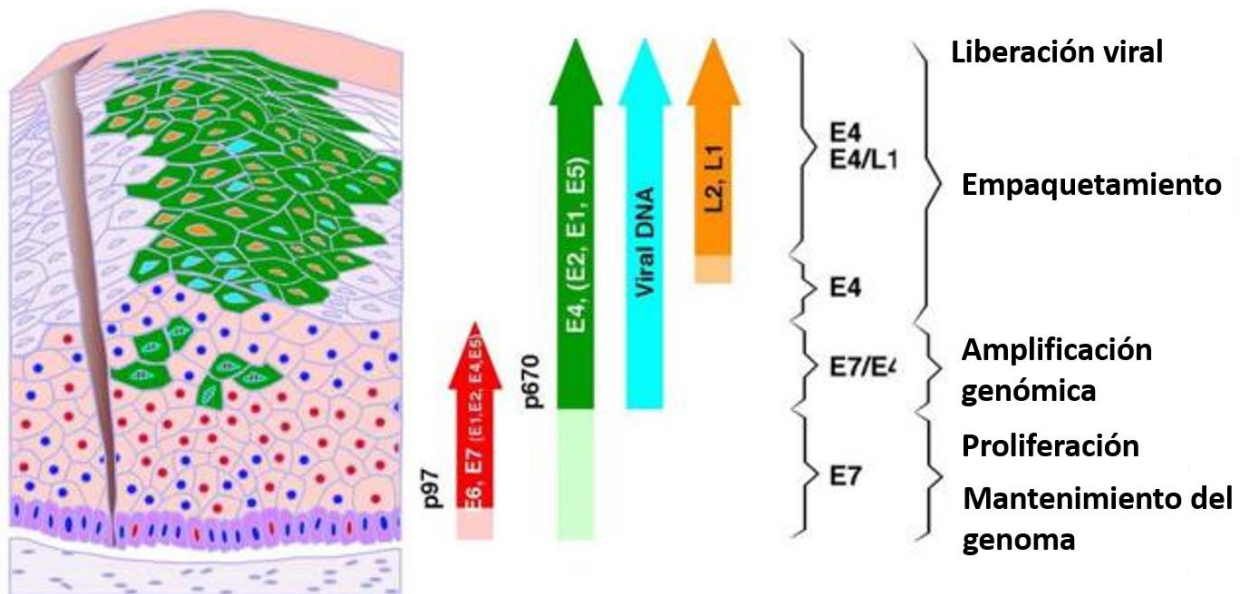


Figura 2. Expresión génica viral en la infección por VPH, las proteínas E6 y E7 (núcleos rojos) se expresan del promotor temprano p97 en VPH-16, en las capas inferiores del epitelio. Los núcleos azules representan células no infectadas. La expresión de E4, y presumiblemente la de otras proteínas (verde) cuyos genes se encuentran después del promotor tardío dependiente de la diferenciación (P670 en HPV-16) (flecha verde), se activa antes de que cese la expresión de E6 y E7. Se predice que las células E4-expresoras (verde) que también expresan E7 contienen todos los productos de transcripción temprana para facilitar la amplificación del genoma. La expresión de las proteínas de la cápside del virus (L1 y L2) (flecha naranja) sigue a la finalización de la amplificación del genoma y ocurre en un subconjunto de células que expresan E4. (traducido de [7])

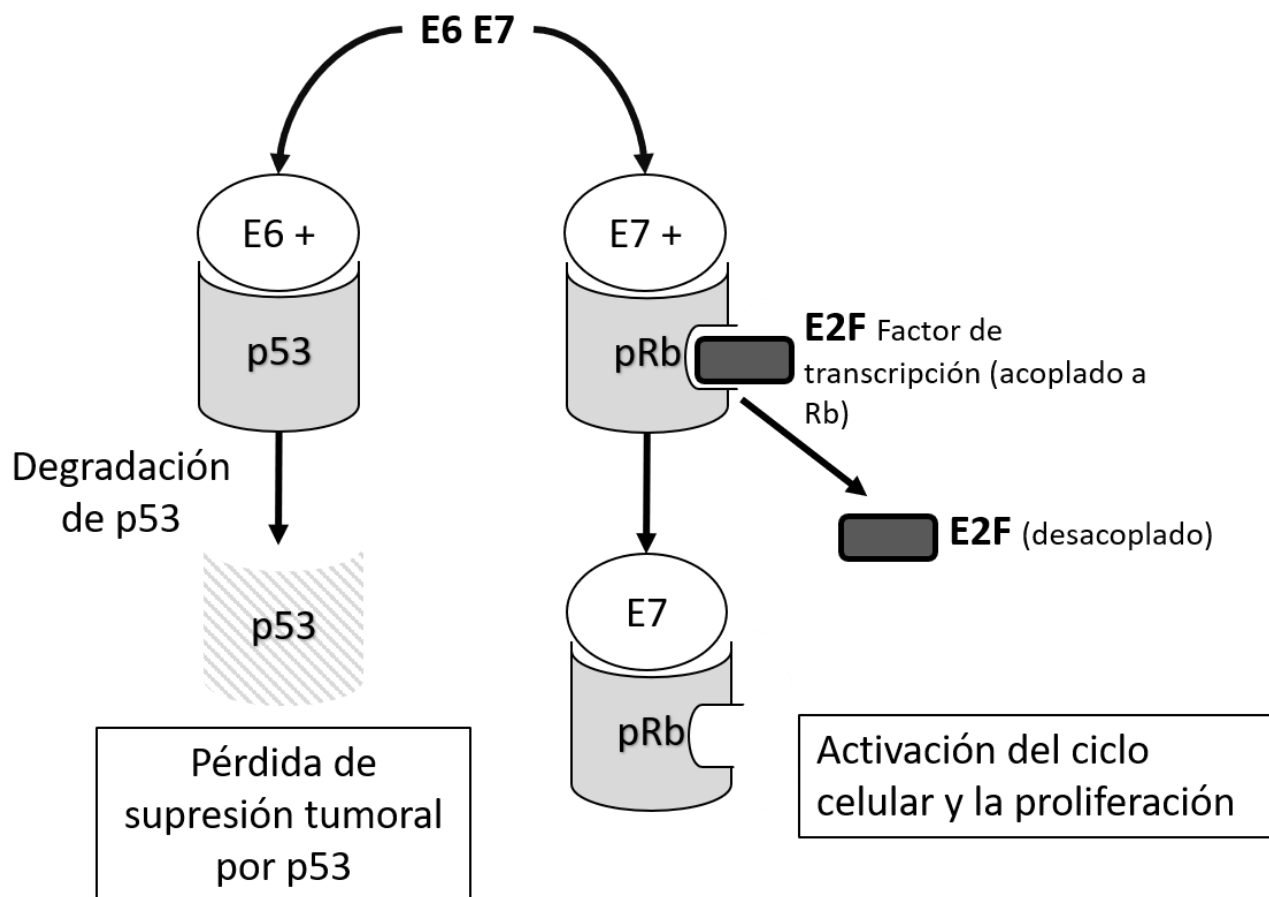


Figura 3. Representación esquemática de la actividad de las proteínas E6 y E7 en las células cervicales. p53 es un factor de transcripción que regula la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia, la reparación del ADN y el metabolismo celular; E6 Induce la degradación rápida de p53. pRB es una proteína supresora de tumores e interactúa con el factor de transcripción E2F para reprimir la transcripción de genes necesarios para la fase S del ciclo celular; E7 se une a pRb, desacoplando el factor de transcripción E2F favoreciendo la activación del ciclo celular y la proliferación. (adaptado de [10]).

Se estima que casi todos los carcinomas de cérvix se asocian a infección persistente por Virus del Papiloma Humano (VPH).⁸ Los tipos Alfa de alto riesgo de VPH han sido claramente vinculados al desarrollo de carcinoma escamoso y adenocarcinoma de cérvix, destacando el tipo 16, relacionado principalmente al carcinoma escamoso en la zona de transformación (54.38%) y el tipo 18 relacionado a adenocarcinoma de endocérnix (37.3%), pero ambos pueden causar cáncer en cualquiera de los dos sitios.⁹ La Organización Mundial de la Salud (OMS) define doce tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) como tipos de cáncer de alto riesgo (categoría 1), con tipos adicionales (68, 73) reconocidos como

'posiblemente' causantes de cáncer (categoría 2). Varios otros tipos de VPH también pertenecen al grupo de alto riesgo basado en la similitud evolutiva con los tipos causantes de cáncer conocidos, aunque hasta ahora, los datos epidemiológicos que confirman esto no se han obtenido.⁹

El cáncer de cuello uterino surge a través de una serie de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia viral, progresión de un clon de células persistentemente infectadas a lesión de alto grado e invasión, que se pueden distinguir de forma reproducible y que proporcionan un punto de partida racional para cualquier discusión sobre los esfuerzos de prevención óptimos. También se producen pasos hacia atrás, a saber, la eliminación de la infección por VPH y la regresión menos frecuente lesión de alto grado a la normalidad. La virología molecular que subyace a la persistencia, progresión e invasión del VPH no se conoce bien, pero este modelo causal está respaldado por datos epidemiológicos y de laboratorio.¹¹



Figura 4. Progresión natural de la lesión por VPH.

La mayor parte de las mujeres presentará infección justo después de su primera relación sexual, observándose una mayor prevalencia en mujeres menores de 25 años, siendo en este momento una infección transitoria; un segundo pico de prevalencia es observado en mujeres mayores de 40 años, coincidiendo con el pico de incidencia máxima de carcinoma cervical.¹² En estudios realizados en México se ha encontrado una incidencia similar donde el VPH16 muestra un aumento en incidencia en pacientes menores de 35 años, disminuyendo hasta los

55 a 60 años, y presentando un segundo pico entre los 61 a 65 años.^{13,14} Concordando con la literatura mundial, se ha reportado que en México el VPH16 muestra la mayor incidencia en mujeres con citología normal, con lesiones de bajo o alto grado y en carcinoma invasor, seguido del tipo 18 y el tipo 33.¹⁵ Sin embargo, en otras publicaciones se ha reportado una incidencia mayor de los tipos 51, 52, 16 y 33, con coinfecciones entre tipos 51-52, 16-52, 16-51 y 16-33, sugiriendo que los tipos 51 y 52 juegan un papel en la carcinogénesis cervical en la población Mexicana.¹⁶ En un estudio de seguimiento de 3 años en el estado de Nuevo León en México, publicado en 2016, también se encontró que los tipos 59, 52, 16 y 56 fueron los más prevalentes.¹⁷

Factores de riesgo

El riesgo de cáncer de cérvix es principalmente una función de la infección por VPH y la falta de tamizaje efectivo. Los factores asociados con un mayor riesgo de persistencia del VPH incluyen el tipo de VPH (especialmente VPH-16), inmunodeficiencia, tabaquismo, multiparidad, uso de anticonceptivos orales a largo plazo, posiblemente inflamación crónica y / o enfermedades de transmisión sexual concurrentes, como clamidia. En particular, las comorbilidades como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el trasplante y los medicamentos pueden reducir la inmunidad mediada por células, lo que aumenta el riesgo de persistencia del VPH. Otros factores que destacan como factores importantes son el inicio de vida sexual activa a temprana edad y el incremento en parejas sexuales a lo largo de la vida y un estado socioeconómico bajo.^{11,18,19,20}

Cáncer de cérvix en pacientes jóvenes

Si bien la mayor frecuencia de cáncer de cérvix se presenta en pacientes alrededor de los 50 años, correspondiendo a la historia natural del desarrollo de esta enfermedad, existe una

cantidad considerable de pacientes que presentan cáncer de cérvix antes de los 40 años, presentando casos incluso a los 18 o 19 años, sugiriendo que a pesar de los factores de riesgo previamente comentados existen otros factores aún no estudiados que favorecen al desarrollo de cáncer de cérvix. Se ha mostrado que pacientes con cáncer de cérvix menores de 30 años presentan supervivencias menores, mayor involucro de extensión a parametrios, mayor cantidad de casos con metástasis a distancia y una menor sobrevida libre de enfermedad en comparación con pacientes de mayor edad; también se ha mostrado una mayor incidencia de carcinomas no escamosos en pacientes jóvenes, Los factores relacionados a este cambio aún no están claros y no pueden ser explicados solo por la infección por VPH.²¹

Mutaciones en el cáncer de cérvix

Se han realizado diversos estudios sobre mutaciones en el carcinoma de cérvix en un intento de encontrar factores pronósticos, blancos terapéuticos y una mejor comprensión del desarrollo de esta enfermedad; se han reportado mutaciones oncogénicas en los genes PIK3CA y EGFR sugiriendo estrategias de terapia blanco, igualmente se han asociado altos niveles de mutaciones en PIK3CA con una disminución en la sobrevida de las pacientes.^{22, 23}

No está claro cómo las células del cáncer de cérvix adquieren la capacidad de invadir el tejido circundante, pero la transición epitelial-mesenquimal (EMT) probablemente juega un papel importante. Hay poca información disponible sobre la regulación de EMT en células de cáncer cervical y sobre la asociación del programa EMT con el resultado clínico de pacientes con cáncer cervical. Diversos factores de crecimiento secretados por las células cancerosas y las células huésped en sus microambientes locales pueden desencadenar los eventos moleculares asociados con el programa EMT.²⁴ Se ha informado que el factor de crecimiento

epidérmico (EGF) es un potente estimulador de la capacidad invasiva celular del cáncer de cuello uterino. La expresión del receptor de EGF (EGFR) está regulada al alza en las metástasis a ganglios linfáticos y el cáncer de cérvix recurrente. Se ha demostrado que la estimulación de EGFR provoca una regulación a la baja de cadherina-E y causa una regulación al alza de vimentina en las células cancerígenas, induciendo elongación celular, desprendimiento y mejorando la capacidad invasiva, la señalización constante de EGFR o su sobreexpresión inactiva glucógeno sintasa quinasa-3 β , resultando en acumulación nuclear de la proteína Snail lo cual lleva a la activación del programa EMT.²⁵

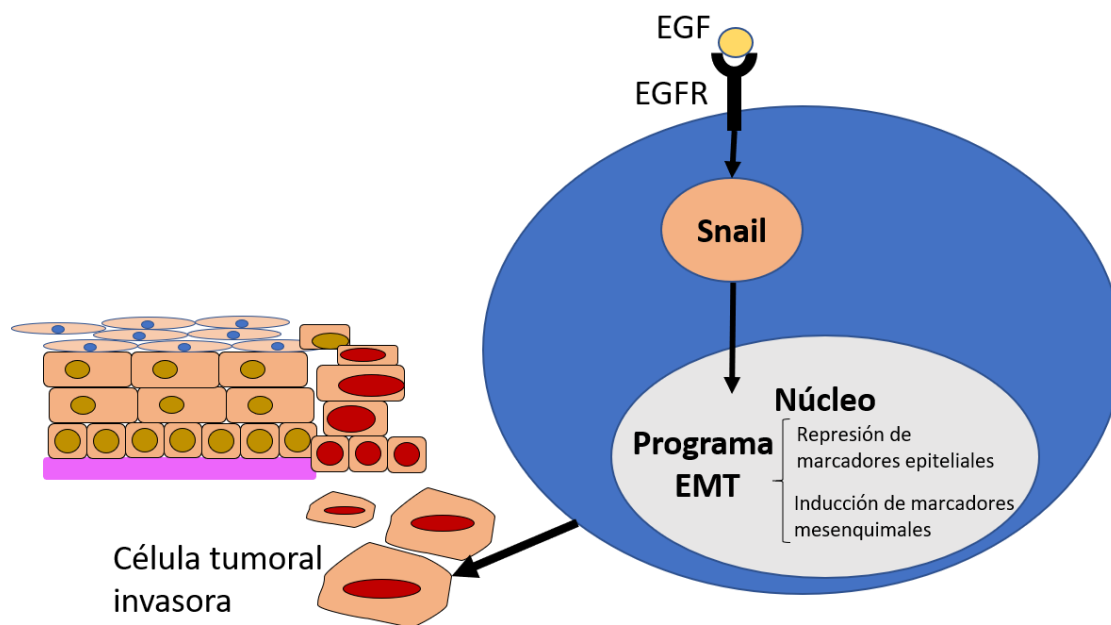


Figura 5. Diagrama ilustrando como EGF promueve la transformación epitelial-mesenquimal, importante en la capacidad invasiva de las células de cáncer de cérvix.

Otro estudio realizado mostró una amplificación de EGFR en las células de carcinoma escamoso de cérvix en 6 de 59 casos (10.2%), mientras que ningún adenocarcinoma mostró esta amplificación, la amplificación de EGFR se correlacionó significativamente con una

menor supervivencia en carcinomas escamosos, también se mostró que la amplificación de EGFR era un factor pronóstico para supervivencia general (figura 6).²⁶

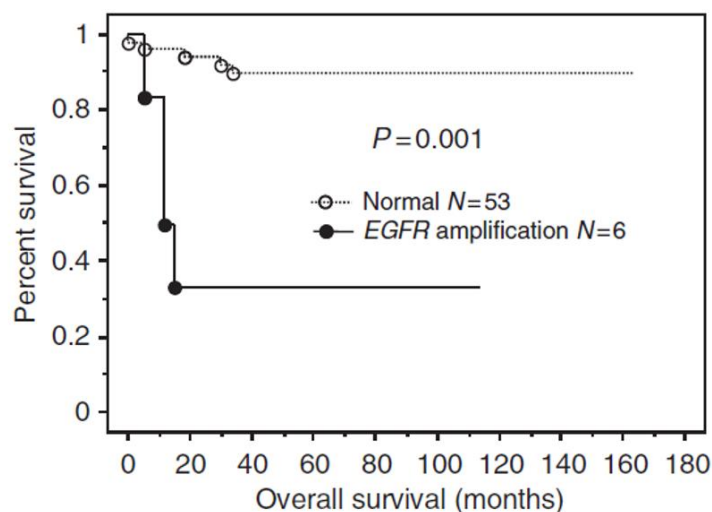


Figura 6. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en 78 pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix con respecto a la amplificación del gen EGFR. La amplificación del gen EGFR se correlacionó significativamente con una supervivencia general más corta (K Lida et al [26])

Una serie de estudios han reportado que el gen fosfoinositida-3-quinasa-catalítica-alfa (PIK3CA) se encuentra frecuentemente mutado en el dominio helicoidal del exón 9 (codones E542K y E545K) y en el dominio de quinasa dentro del exón 20 (codón 1047) en varios tipos de cáncer en el ser humano. En cáncer de cérvix estas mutaciones activadoras de cáncer han sido encontradas casi exclusivamente en el exón 9, similar a los hallazgos en cáncer de vejiga y carcinomas escamosos de cabeza y cuello y difiriendo de los carcinomas de glándula mamaria entre otros.^{23,27} El patrón de mutación en E542K y E545K se asocia a mutagénesis

por una subclase de citidina-desaminasas APOBEC; el conocer el estado mutacional de PIK3CA se vuelve particularmente relevante al considerar que se están desarrollando nuevas terapias blanco dirigidas a las vías PI3K/Akt así como a genes APOBEC.^{23,28,29}

Cáncer de cérvix en nuestro hospital

En un estudio realizado utilizando la base de datos de casos de carcinoma de cérvix invasor valorados en nuestro hospital de enero 2004 a diciembre 2018, se valoraron un total de 1586 pacientes, con una edad media de 47.9 años, de los cuales 1288 correspondieron a carcinomas escamosos, 213 fueron adenocarcinomas, 42 fueron carcinomas adenoescamosos y 43 correspondieron a otros carcinomas (tabla 1).

	No. De Pacientes (%)				
	Total, N = 1586	Escamoso N = 1288 (81.2)	Adenocarcinoma N = 213 (13.43)	Adenoescamoso N = 42 (2.64)	Otros N = 43 (2.71)
Edad: Media	47.9	47.9	48.8	48.2	43.47
Grado Tumoral					
Bien Diferenciado	24 (1.51)	14 (1.08)	9 (4.22)	0	1 (2.3)
Moderadamente Diferenciado	1063 (67.02)	886 (68.78)	151 (70.89)	22 (52.38)	4 (9.3)
Poco Diferenciado	329 (20.74)	266 (20.65)	29 (13.61)	17 (40.47)	20 (46.51)
No referido	170 (10.71)	122 (9.47)	24 (11.26)	3 (7.14)	18 (41.86)

Tabla 1. Incidencia por tipo histológico y grado de diferenciación de carcinomas invasores de cérvix valorados en el servicio de anatomía patológica y citopatología del Hospital Universitario Dr. José E. González, de enero 2004 a diciembre 2018.

El mayor pico de prevalencia se observó en el grupo de edad de 40 a 49 años con 437 casos, sin embargo, se observó una alta prevalencia en pacientes menores de 40 años (figura 7).

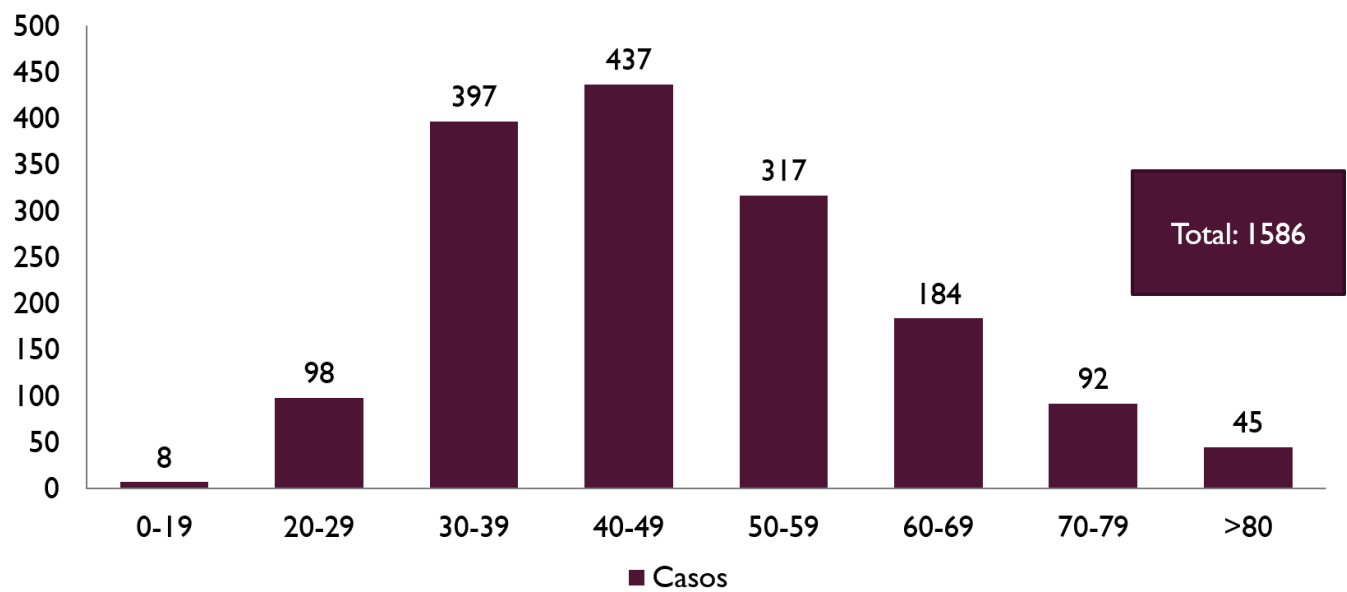


Figura 7. Prevalencia de casos por grupo de edad en el servicio de anatomía patológica y citopatología del hospital universitario de 2004 a 2018.

JUSTIFICACIÓN

Aunque existen estudios que comparan factores de riesgo externos, hasta el momento no se han realizado estudios que lleven a cabo una comparación de las mutaciones en PIK3CA y EGFR entre diferentes grupos de edad para determinar si esta diferencia también contribuye a una mayor agresividad del carcinoma de cérvix en pacientes jóvenes.

La distribución del cáncer de cérvix en nuestra población difiere de la distribución reportada en la literatura, por lo que un estudio de sus diferencias ayudará a tener una mejor visión del panorama general y las diferencias existentes entre los grupos de edad.

La búsqueda intencionada de diferencias en mutaciones en el cáncer de cérvix por grupos de edad puede contribuir a un mejor entendimiento de la fisiopatología de esta enfermedad, ayudando a orientar nuevo blancos terapéuticos y factores pronósticos, por lo que esta investigación puede aportar datos útiles en el entendimiento de esta patología, así como determinar en un futuro nuevas medidas terapéuticas para los casos de carcinoma cervicouterino agresivos y en etapas avanzadas.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula

No existen diferencias en las mutaciones de los genes PIK3CA y EGFR en carcinoma de cérvix entre mujeres menores y mayores de 40 años.

Hipótesis Alternativa

Existen diferencias en las mutaciones de los genes PIK3CA y EGFR en carcinoma de cérvix entre mujeres menores y mayores de 40 años.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar las mutaciones en los genes PIK3CA y EGFR en carcinoma de cérvix entre mujeres menores de 40 años y mayores de 40 años.

Objetivos secundarios

Identificar los principales tipos de VPH presentes en el carcinoma escamoso de cérvix de las pacientes estudiadas.

Determinar si existen diferencias en los tipos de VPH presentes en las pacientes estudiadas al compararlas por grupo de edad.

Identificar si existen diferencias en patrones de co-infección por los diferentes tipos de VPH.

Identificar si existe un subtipo histológico de carcinoma escamoso predominante por grupo de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterios de inclusión

- Casos de mujeres con carcinoma de cérvix invasor que hayan sido diagnosticados en nuestra institución en el período de 2015 a 2018 y que cuenten con laminillas y bloques de parafina.

Criterios de exclusión

- Ausencia de bloques de parafina.
- Inadecuada fijación del tejido.

- Laminillas sin bloques de parafina.
- Material insuficiente o inadecuado para realizar microarrays

Diseño metodológico

Se realizó un estudio observacional, transversal, comparativo y descriptivo.

Cálculo del tamaño de muestra

Se utilizó una fórmula de diferencia de dos proporciones. Esperando una tasa de mutación de un 18.8% en pacientes menores de 40 años comparada con un 3.8% en pacientes mayores de 40 años para el gen PIK3CA y EGFR en pacientes con cáncer cervicouterino. Con una confianza del 95%, una significancia bilateral de 0.05 y un poder del 80% se estableció una K de 6.2. Por lo cual se requieren al menos 51 sujetos de estudio por grupo. Los parámetros fueron establecidos por un estadista, y la literatura.

Búsqueda de pacientes y selección del material

La búsqueda de pacientes se llevó a cabo mediante el sistema Tesi electrónica (Pathox®), utilizando como criterios de búsqueda casos diagnosticados como carcinoma de cérvix invasor (carcinoma escamoso, adenocarcinoma y otras variantes especiales) durante el período de 2015 a 2018. Posteriormente se creó una base de datos en Excel® catalogando a las pacientes por número patológico, edad, grupo de edad (grupo 1 menores de 40 años, grupo 2 mayores de 40 años), tipo de espécimen (Biopsia, cono, histerectomía simple o radical), diagnóstico histológico basado en la clasificación de tumores de órganos reproductores femeninos de la OMS 4ª edición, se realizó una segunda clasificación por grupo histológico (carcinomas escamosos, adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos) y finalmente se documentó el grado de diferenciación.

Se obtuvieron un total de 431 pacientes, de los cuales 339 correspondieron a biopsias y 92 a hysterectomías; se realizó una revisión inicial de los casos y se seleccionaron 62 casos de pacientes menores de 40 años y 59 casos de pacientes mayores de 40 años; de estos casos se excluyeron 14 casos de pacientes menores de 40 años y 10 casos de pacientes mayores de 40 años por presentar escaso material, mala calidad del tejido o no contar con los bloques de parafina. Finalmente se reevaluaron todos los casos por 1 patólogo experto, en los cuales se confirmó el diagnóstico histopatológico previo, así como variedad histológica y se seleccionaron las mejores áreas para la realización de microarrays.

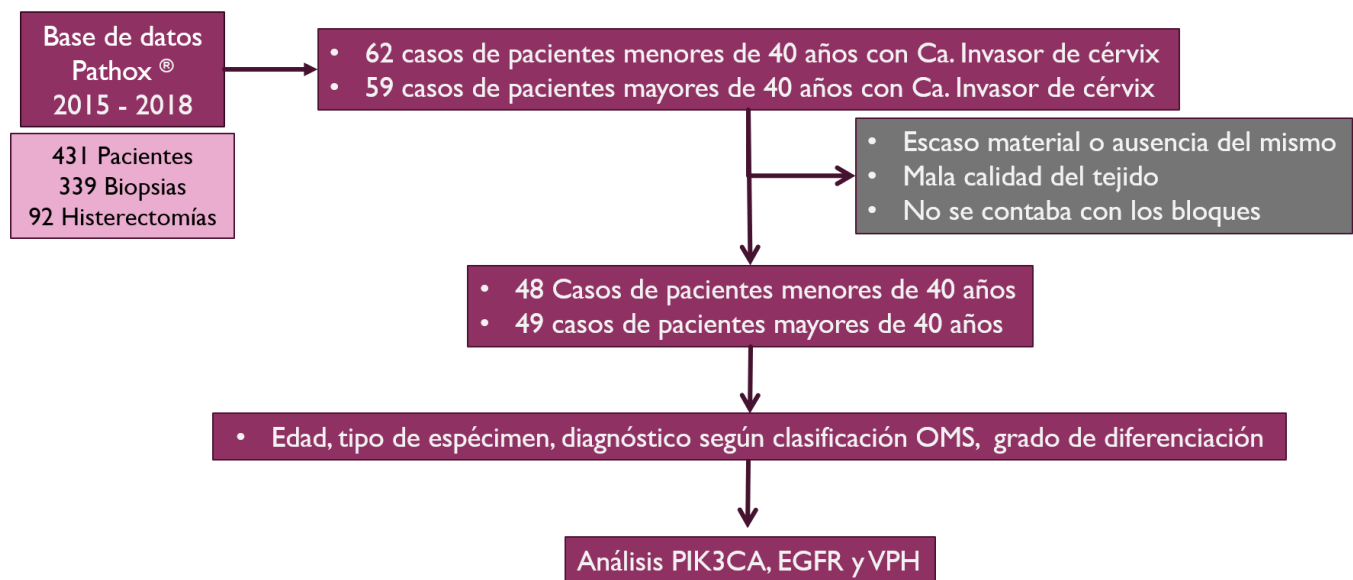


Figura 8. Diagrama de trabajo para la búsqueda de pacientes y selección del material.

Proceso de extracción de ADN

Posterior a la selección de los bloques de parafina, se realizó extracción de ADN utilizando el kit comercial QIAamp® DNA FFPE Tissue Cat. 56404, utilizando el sistema de extracción automatizado QIAcube mediante el siguiente procedimiento:

- Usando un bisturí, se eliminó el exceso de parafina del cada bloque de muestra.

- Se realizaron 3 secciones de 5 a 10 μm de grosor del tejido tumoral incluido en parafina.
- Se colocaron los cortes en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregó 1ml de xilol a la muestra. Cerrando la tapa y agitando en vortex vigorosamente por 10 segundos.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el sobrenadante por pipeteo.
- Se adicionó 1ml de etanol al 96% y se mezcló por vortex para eliminar el xilol residual de la muestra.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el sobrenadante por pipeteo.
- Usando una punta fina de pipeta, se eliminó cualquier residuo de etanol.
- Se abrió el tubo e incubó a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 minutos hasta que el etanol residual se evaporó totalmente.
- Usando 180 μl de buffer ATL. Se adicionó 20 μl de proteinasa k, mezclando por vortex.
- Se incubó a 56°C por 1 hora, hasta que la muestra fue lisada completamente.
- Finalmente se colocó la muestra lisada en el sistema automatizado QIAcube a 90°C por 1 hora.

Una vez obtenido la extracción de ADN, para la valoración de las mutaciones de PIK3CA, se realizó PCR de los exones 9 y 20 con posterior digestión de los amplicones con 5 endonucleasas de restricción y finalmente se valoró la electroforesis en agarosa.

Versión PIK3CA	Bcl I	Hyp I 88 I	TspR I	BsaB I	Bmg BI
E9wt 261pb	No corta	142,119	154,107		
E545D	151,110	142,119	154,107		
E545K	No corta	142,119	No corta		
E542K	No corta	No corta	154,107		
E20wt 352pb				243,109	No corta
H1047R				No corta	245,107
H1047L				No corta	No corta

Tabla 2. La digestión con 5 enzimas puede diferenciar claramente los alelos mutantes en la mezcla con el alelo sin mutaciones (wt)

Para la tipificación de VPH se utilizó el kit comercial de PCR Anyplex® para 19 tipos de alto riesgo y 9 tipos de bajo riesgo, usando como control negativo 5 µl de agua libre de RNasas, para control positivo se utilizaron 5 µl de cada control PC1, PC2, PC3 incluidos en el kit.

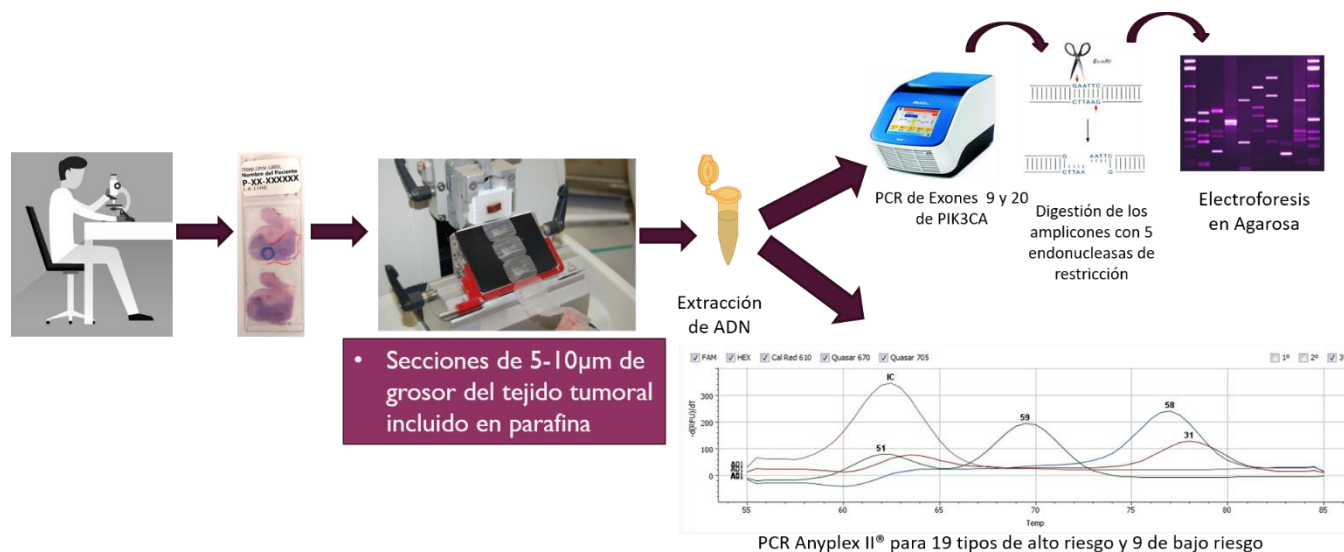


Figura 9. Imagen representativa de la metodología para la valoración de mutaciones de PIK3CA y la tipificación de VPH.

Para valorar la amplificación de EGFR se seleccionaron las áreas más viables de tumor y con menos células inflamatorias, se marcaron en la laminilla previamente teñida con hematoxilina y eosina para posteriormente realizar extracción del área marcada por medio de sacabocados de 0.3 cm de diámetro; una vez obtenidos los sacabocados del bloque de parafina se realizaron microarrays de 9 a 10 casos por bloque de parafina más un caso guía, obteniéndose 5 bloques de parafina con pacientes del grupo de menores de 40 años y 5 bloques de parafina de pacientes del grupo de mayores de 40 años. Posteriormente se siguió el siguiente protocolo:

- Montaje en laminillas silanizadas de cortes de parafina de 4 μ m de grosor utilizando baño de flotación a 42°C.
- Secado de laminillas en estufa de 56°C a 60°C, por 12 horas.
- Enfriamiento de laminillas a temperatura ambiente.
- Desparafinización e hibridación de las laminillas en jarras de coplin siguiendo la siguiente secuencia:
 1. Xilol 10 minutos (2 veces).
 2. Etanol absoluto 5 minutos (2 veces).
 3. Etanol 80% 5 minutos.
 4. Etanol 70% 5 minutos.
 5. Agua bidestilada 3 minutos.
 6. HCl 0.2 N 20 minutos.
 7. Agua bidestilada 3 minutos.
 8. Lavado de laminillas con buffer lavado durante 3 minutos.

- Posteriormente se colocan las laminillas en una solución de pre-tratamiento a 80°C por 30 minutos, en el baño de agua de temperatura controlada.
- Se enjuagan las laminillas con agua bidestilada por 1 minuto y después en solución buffer de lavado 2 veces, por 5 minutos.
- Se realiza digestión enzimática con solución pepsina, y se incuba a 37°C durante 4 a 8 minutos.
- Se enjuagan las laminillas con agua bidestilada por 1 minuto y después en solución de buffer de lavado 2 veces por 5 minutos.
- Se deshidratan las preparaciones en alcoholes crecientes:
 1. Etanol 70% 3 minutos.
 2. Etanol 80% 3 minutos.
 3. Etanol absoluto 3 minutos.
 4. Secado al aire.
- Se aplican 10 microlitros de la sonda (EGFR de espectro rojo y sonda CEP17 de espectro verde como control. Se utilizaron sondas de marca comercial Vysis LSI EGFR de Abbott® para localización de 7p11.2-p12) y se cubrió con cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- Se colocan las laminillas en el Hybridizer y se deja hibridar toda la noche (5 minutos a 95°C/80°C, seguido de 16 horas a 37°C).
- Se colocan las laminillas en buffer de lavado post-hibridización por 3 minutos.
- Se enjuaga con agua bidestilada por 3 minutos.
- Secado de laminillas en la oscuridad por 20 minutos.
- Se guardan las laminillas en la oscuridad antes de valorar la señal.

Para la valoración de las señales se utilizó un microscopio de fluorescencia marca Olympus modelo BX51TF, Se usaron filtros de paso de banda estrechos separados para la detección de señales, Usando lente de objetivo X100, se examinaron aproximadamente 60 células tumorales para cada muestra, y los números de señales fluorescentes dentro de las células tumorales del EGFR. La amplificación de EGFR se definió como una relación de señales de sonda de EGFR a señales de sonda CEP17 de referencia de 2:1 o más.

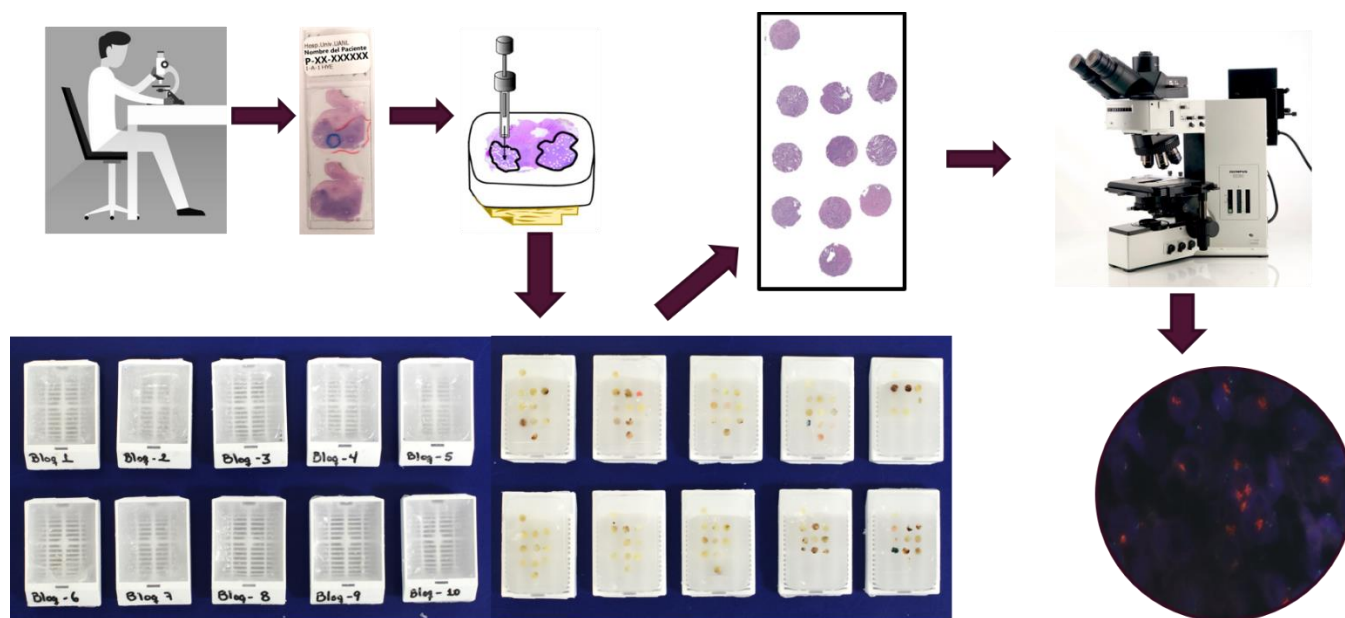


Figura 10. Imagen representativa de la metodología para la valoración de amplificación de EGFR por FISH, se muestran los 10 bloques de parafina de microarrays obtenidos.

Análisis de resultados

El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS statistics 23®, para las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central (media, mediana), y para las cualitativas, frecuencias y porcentajes de cada una de las opciones posibles. Para la asociación de variables cualitativas se utilizó la prueba exacta de Fisher; considerando estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

De la base de datos se obtuvieron un total de 431 casos de carcinoma de cérvix invasor diagnosticados en el período de 2015 a 2018, de los cuales finalmente se estudiaron 48 casos de pacientes menores de 40 años y 49 de pacientes mayores de 40 años. La edad media de ambos grupos fue de 41.3 años, en el grupo de menores de 40 años presentaron una edad media de 31.91 años y el grupo de mayores de 40 años tuvo una edad media de 50.48 años con una desviación estándar de 11.52. Del total de casos 42 correspondieron a biopsias y 55 casos fueron histerectomías.

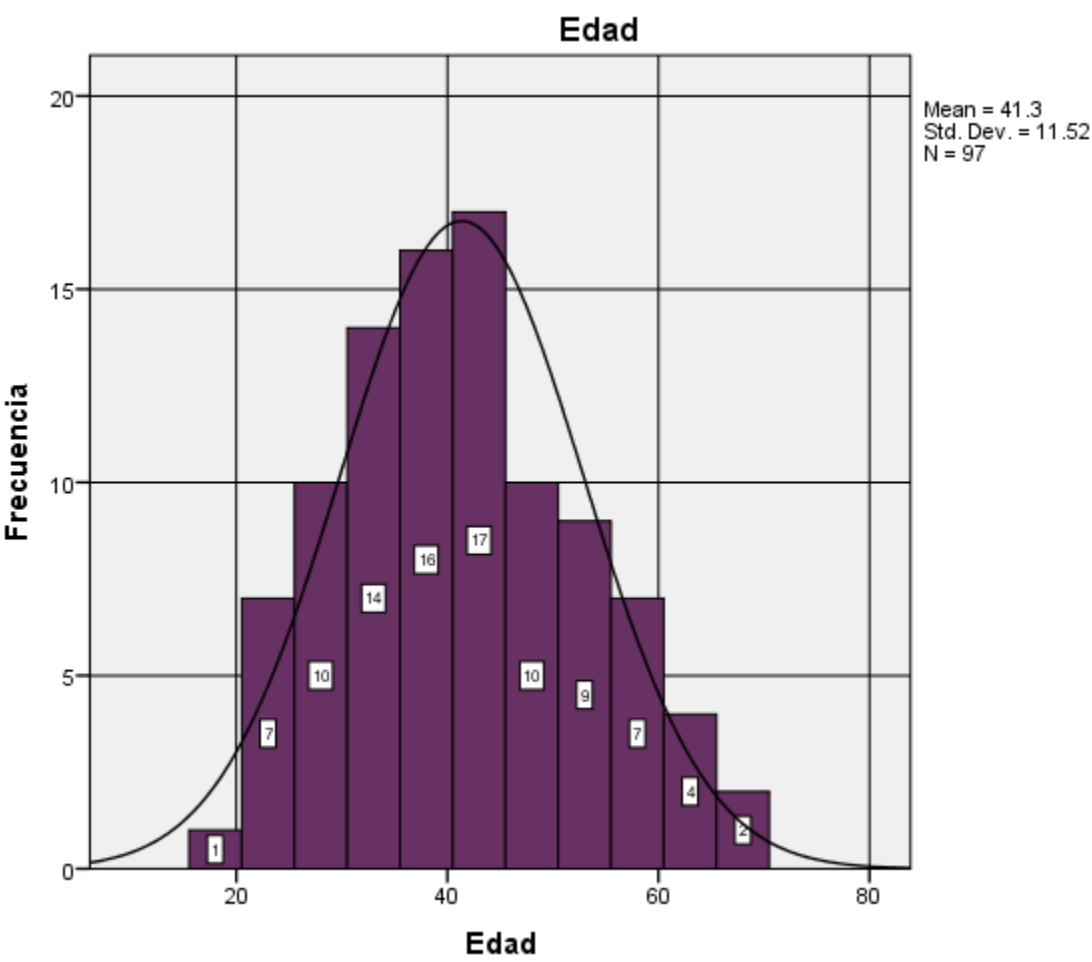


Figura 11. Frecuencia por edades de los casos analizados.

		No. De Pacientes (%)		
		Total, N = 97	Menores de 40 años N = 48 (49.4%)	Mayores de 40 años N = 49 (50.5%)
Edad:	Media	41.3	31.91	50.48
	Mínima	18		
	Máxima	68		
Especímen				
Biopsia		42 (43.29)	23 (47.91)	19 (38.77)
Histerectomía		55 (56.70)	25 (52.08)	30 (61.22)

Tabla 3. Edad media por grupo de pacientes y tipos de especímenes valorados.

Dentro del grupo de pacientes menores de 40 años se presentó una mayor cantidad de casos poco diferenciados (50%) comparado con el grupo de pacientes mayores de 40 años (24.44%), lo cual fue estadísticamente significativo (p 0.017).

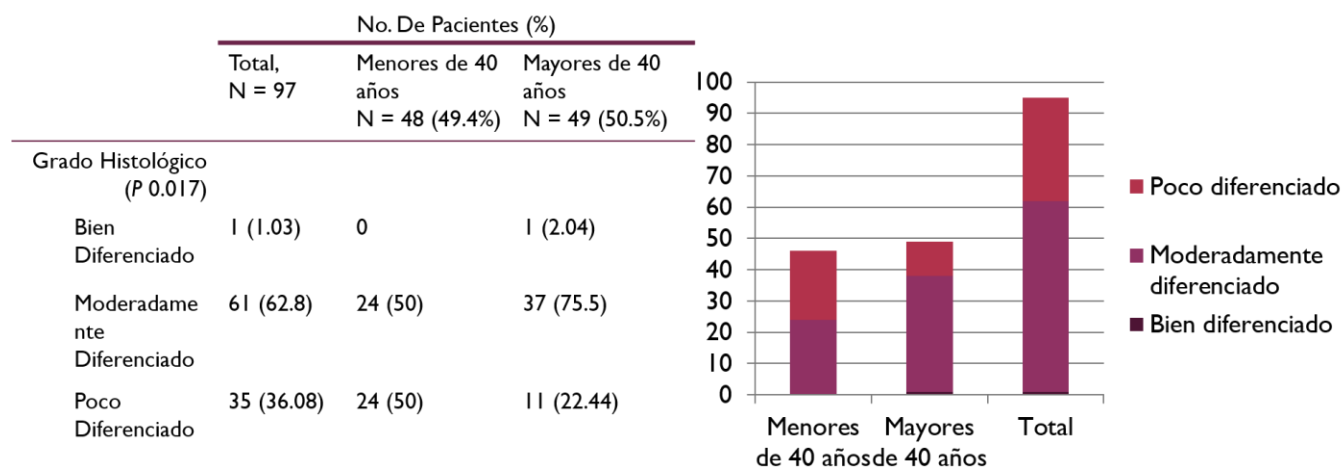


Tabla 4. Grado de diferenciación histológica por grupo de edad.

El grupo de pacientes menores de 40 años presentó 40 casos de carcinoma espinocelular, 3 casos de adenocarcinomas y 5 casos de carcinomas adenoescamosos, contrastando con el grupo de pacientes mayores de 40 años en el cual hubo 35 casos de carcinoma espinocelular, 14 casos de adenocarcinomas y ningún caso de carcinomas adenoescamosos.

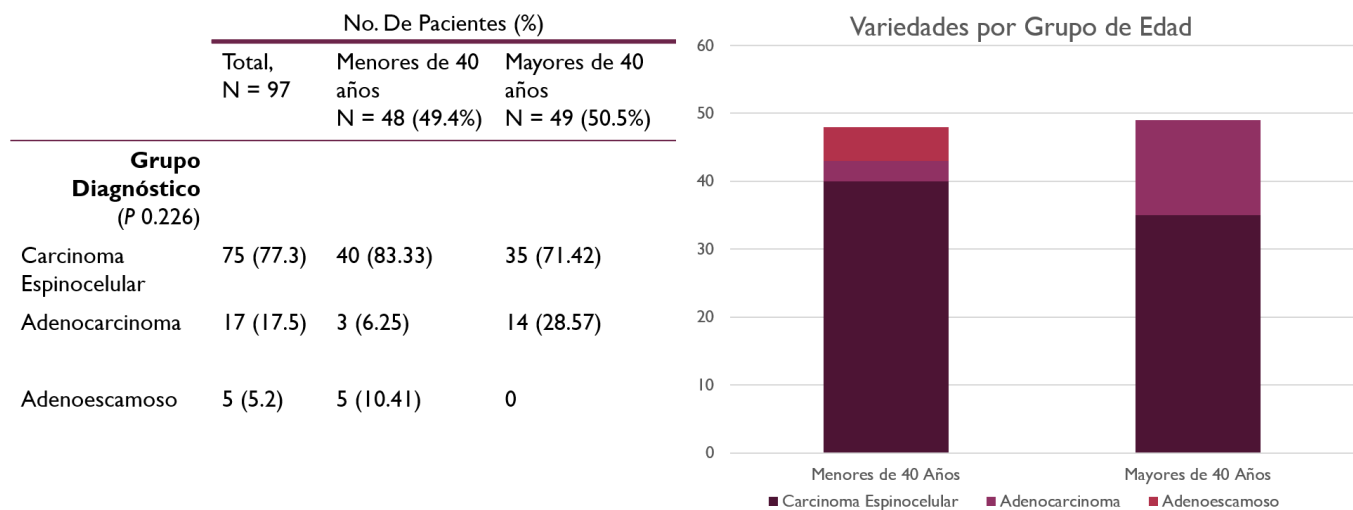


Tabla 5. Tipos histológicos por grupo de edad.

Resultados PIK3CA

De las 97 pacientes, sólo 13 presentaron mutaciones para PIK3CA, 11 correspondieron a mutaciones en el exón 9 y 3 fueron mutaciones del exón 20; la mutación más frecuente fue en E542K con 9 mutaciones, 6 de las cuales se presentaron en pacientes menores de 40 años. Ninguna paciente mayor de 40 años presentó mutaciones en el exón 20 (tabla 6). De los 14 casos que presentaron mutación, 9 correspondieron a carcinomas escamosos y 5 a adenocarcinomas (tabla 7). Destaca 1 caso que corresponde a una paciente de 18 años con un carcinoma de células claras la cual presentó mutaciones simultáneas en el exón 9 y 20, dominios E542K y H1047L. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de edad.

		No. De Pacientes (%)	
		Total, N = 97	Menores de 40 años N = 48 (49.4%)
			Mayores de 40 años N = 49 (50.5%)
Exón 9 (P 0.412)	11	7	4
E542K	9	6	3
E545K	2	1	1
E454D	0	0	0
Exón 20 (P 0.234)	3	3	0
H1047L	2	2	0
E1047L	1	1	0

Tabla 6. Frecuencia de mutaciones de PIK3CA por grupo de edad.

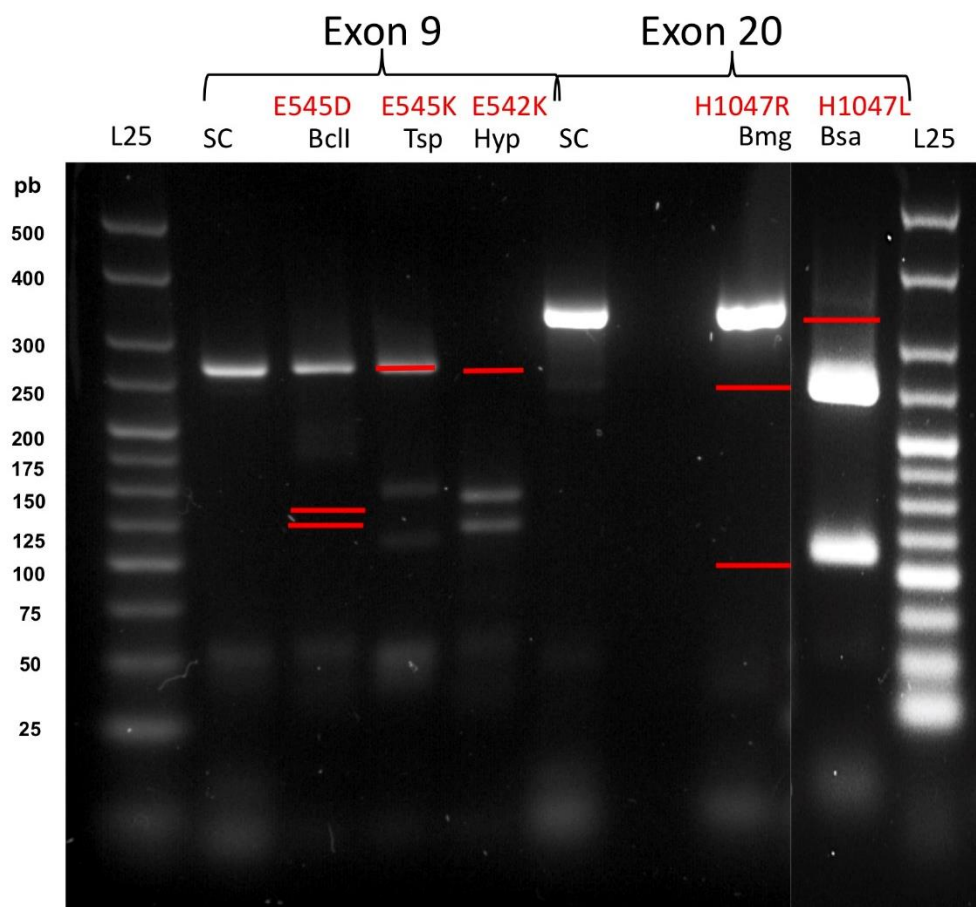


Figura 12. Ejemplo de electroforesis en agarosa con enzimas de restricción, correspondiente al caso 12 el cual resultó con mutación del dominio E545K.

		Exón 9		Exón 20		
		Total	E542K	E545K	H1047L	E1047L
Tipo Histológico						
<i>(P 0.222)</i>						
Escamoso	9	6	1	1	1	
Adenocarcinoma	5	3	1	1		0

Tabla 7. Mutaciones de PIK3CA por tipo histológico.

Resultados EGFR

Del total de 97 casos analizados, 7 mostraron amplificación de EGFR, correspondiendo 6 casos a carcinomas espinocelulares y solamente 1 caso a adenocarcinoma. Se identificaron 6 casos de carcinomas de cérvix con amplificación de EGFR y solamente 1 caso en el grupo de pacientes mayores de 40 años, sin embargo, a pesar de esta diferencia no fue estadísticamente significativo ($p=0.111$).

		No. De Pacientes (%)	
Total, N = 97		Menores de 40 años N = 48 (49.4%)	Mayores de 40 años N = 49 (50.5%)
Resultado FISH			
<i>(P 0.111)</i>			
Amplificado	7	6	1
Escamoso	6	5	1
Adenocarcinoma	1	1	0
No Amplificado	83	40	43

Tabla 8. Resultados EGFR por grupo de edad y tipo histológico.

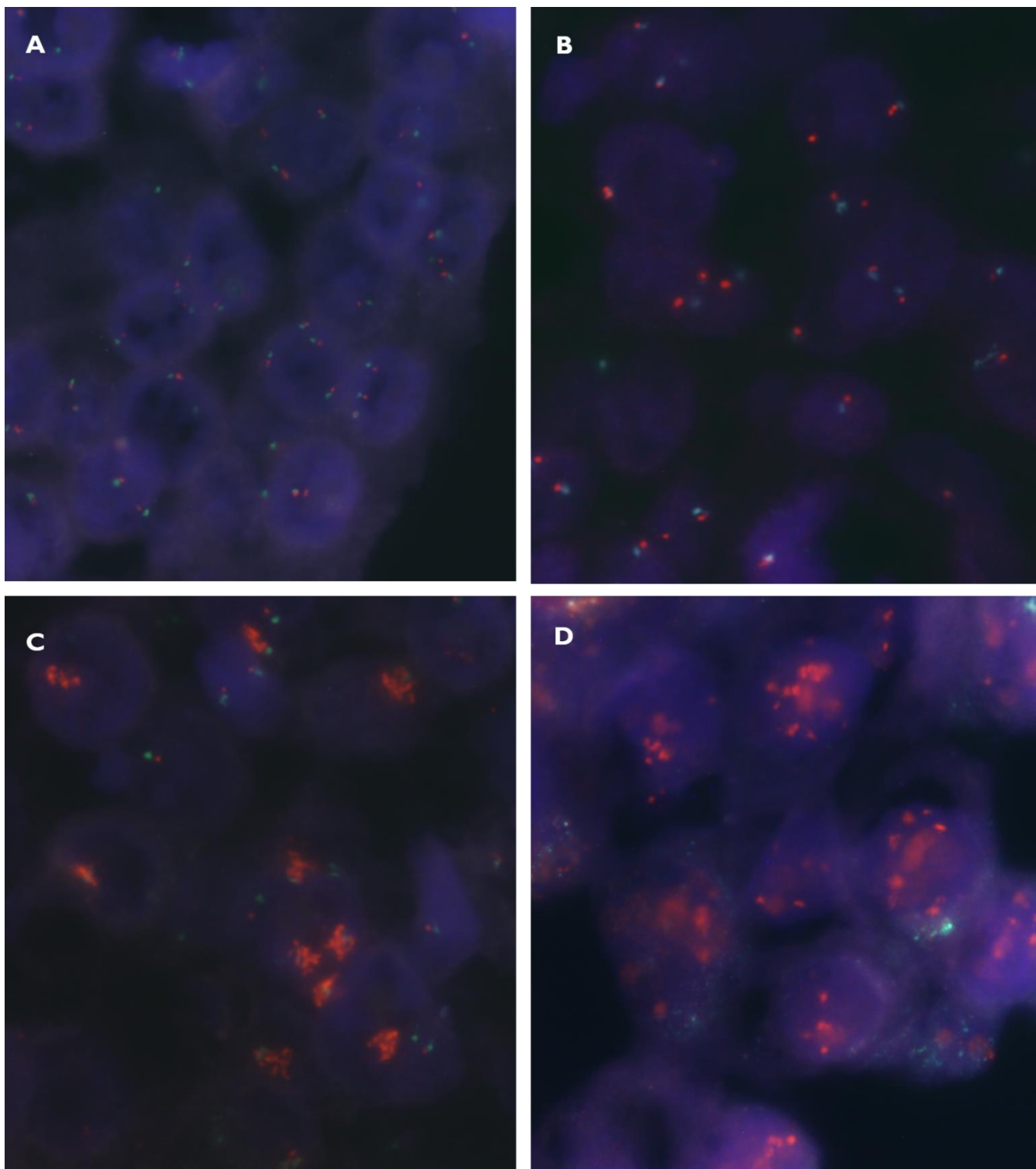


Figura 13. Ejemplo de FISH para EGFR, A y B Casos 8 y 34, mostrando negatividad para amplificación de EGFR, conservando 2 señales verdes y 2 señales rojas por núcleo. C y D casos 73 (paciente de 33 años con carcinoma espinocelular) y 90 (paciente de 39 años con adenocarcinoma poco diferenciado) mostrando amplificación de EGFR con aumento de señales rojas con relación mayor de 2 a 1 en relación con las señales verdes.

Resultados VPH

Del total de pacientes valoradas se encontró que el tipo de VPH más prevalente fue VPH16 con 46 casos, seguido de VPH33, VPH52 y VPH18 con 21, 21 y 19 casos respectivamente; también se encontró una mayor incidencia de coinfecciones en pacientes menores de 40 años con virus de alto y bajo riesgo en comparación con las pacientes mayores de 40 años. Al separar por grupos de edad ambos mostraron una mayor prevalencia de VPH16, sin embargo el VPH33 fue más prevalente en el grupo de pacientes menores de 40 años, siendo VPH52 y VPH18 más prevalentes en las pacientes mayores de 40 años.

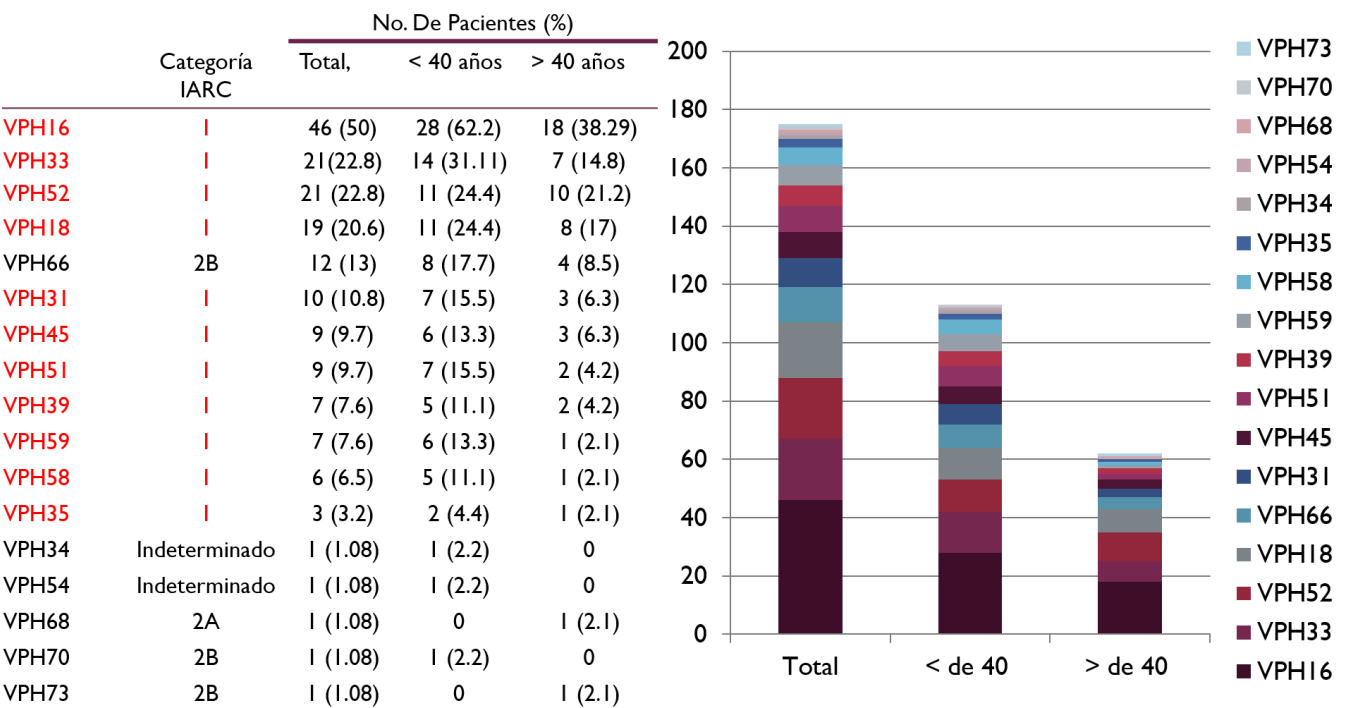


Tabla 9. Prevalencia de tipos de VPH de alto riesgo por grupo de edad, los grupos de alto riesgo categoría I de la IARC se encuentran marcados en rojo.

Al realizar una valoración de la cantidad de tipos de VPH detectados por paciente comparando grupos de edad se encontró que el grupo de menores de 40 años presentó una mayor cantidad de coinfecciones con virus de alto riesgo IARC I, llegando a resultar casi

estadísticamente significativo (p 0.055). 2 pacientes presentaron 8 coinfecciones simultáneas con virus de alto riesgo, con edades de 34 y 38 años, una de ellas con un carcinoma escamoso y la otra con un adenocarcinoma, ambos de alto grado histológico.

No. De Pacientes (%)				No. De Pacientes (%)			
Total, N = 97		Menores de 40 años N = 48 (49.4%)	Mayores de 40 años N = 49 (50.5%)	Total, N = 97		Menores de 40 años N = 48 (49.4%)	Mayores de 40 años N = 49 (50.5%)
Inhibido	5	3	2	IARC 2A y 2B (P 0.511 y 0.100)			
IARC I (P 0.055)				0	78	36	42
	0	16	4	1	14	9	5
	1	42	17	Bajo Riesgo (P 0.859)			
	2	15	10	5			
	3	5	4	0	4	1	3
	4	8	5	1	45	22	23
	5	1	1	2	40	21	19
	6	3	2	3	1	0	2
	7	0	0	4	2	1	1
	8	2	2	0			

Tabla 10. Cantidad de tipos de VPH detectados por paciente por grupo de edad.

Entre las coinfecciones por VPH, las mas frecuentes fueron VPH16-VPH33, VPH33-VPH52, VPH18-VPH33, VPH52-VPH18 y VPH33-VPH51 con 11, 10, 9, 8 y 8 casos respectivamente.

Coinfecciones frecuentes	Frecuencia
16-33	11
33-52	10
18-33	9
52-18	8
33-51	8

Tabla 11. Coinfecciones por VPH más frecuentes en ambos grupos de edad

FRECUENCIA DE INFECCIONES MIXTAS DE VPH POR GRUPO DE EDAD

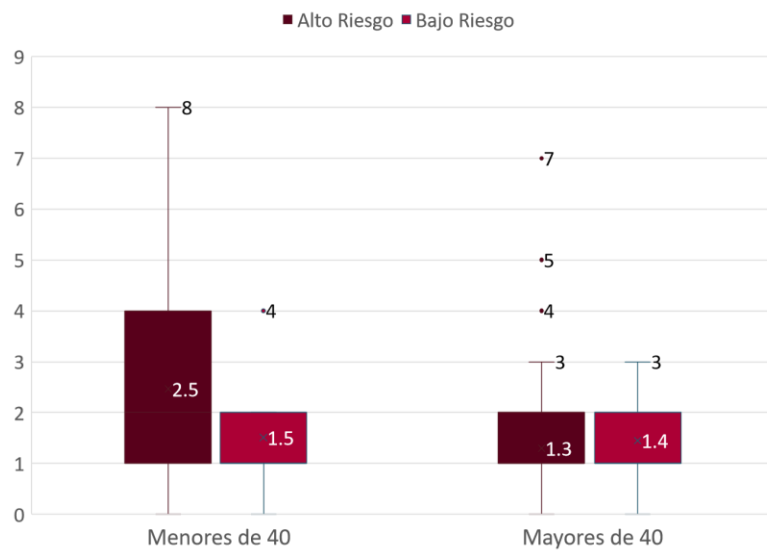


Figura 14. Gráfica de cajas mostrando la frecuencia de infecciones mixtas de VPH por grupo de edad.

DISCUSIÓN

En base al estudio preliminar realizado en nuestro hospital, el cual se comentó en la introducción podemos decir que el cáncer cervicouterino en nuestra población muestra una alta incidencia en pacientes menores de 40 años, lo cual muestra diferencias con lo reportado en la literatura internacional, así como en las estadísticas nacionales.^{4,5}

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los carcinomas de cérvix en pacientes jóvenes presentan grados histológicos más agresivos, sin embargo, es necesario un estudio más amplio que dé seguimiento a estas pacientes para determinar si este aspecto histológico se correlaciona con la evolución clínica. También destaca que en un estudio de cáncer de cérvix en pacientes menores de 35 años realizado en Estados Unidos en 2016 el grado histológico de los casos presentó una distribución variada, con 15% de los casos de histología bien diferenciada, 30.7% con histología moderadamente diferenciada y 30.7% con histología poco diferenciada;³⁰ esto difiere de lo encontrado en nuestra investigación, donde el grupo de pacientes menores de 40 años no presentó carcinomas bien diferenciados y el porcentaje se dividió 50% y 50% entre los carcinomas moderadamente y poco diferenciados.

Las mutaciones de PIK3CA encontradas en esta investigación fueron principalmente en el exón 9, concordando con lo reportado en publicaciones previas,^{22,23,28} igualmente las principales mutaciones fueron en el dominio E542K, el cual forma parte de las firmas de mutaciones del gen APOBEC.

Las amplificaciones de EGFR encontradas correspondieron en su mayoría a carcinomas escamosos y solamente un caso de adenocarcinoma presentó amplificación. Este hallazgo muestra similitud con un estudio reportado previamente en el cual todos los casos con amplificación de EGFR fueron carcinomas escamosos y ningún adenocarcinoma resultó

positivo.²⁶ Esto sugiere que posiblemente existen vías diferentes para el desarrollo de carcinomas escamosos y adenocarcinomas, igualmente sugiere blancos terapéuticos potenciales en carcinomas escamosos que muestran amplificación de EGFR; considerando también que la amplificación de EGFR es un mecanismo importante en el desarrollo de la transformación epitelial-mesenquimal se podrían realizar estudios de seguimiento en pacientes con amplificación de EGFR para observar si presentan un comportamiento clínico diferente de las pacientes que no muestran amplificación. A pesar de que de las 7 pacientes con amplificación de EGFR 6 fueron pacientes menores de 40 años no se obtuvo un resultado estadísticamente significativo, siendo necesario ampliar este estudio comparativo a más pacientes.

Los tipos de VPH más frecuentemente encontrados en este estudio fueron 16, 33, 52 y 18, lo cual difiere de las publicaciones a nivel internacional, en los cuales se presenta más frecuentemente los tipos 16 y 18 como los de mayor prevalencia.^{8,11,12,13,14} sin embargo, existen estudios a nivel nacional que muestran mayor prevalencia de los tipos 51, 52, 16 y 33; siendo estos resultados mas similares a lo encontrado en nuestra investigación pueden existir diferencias en la distribución de los tipos de VPH en la población del norte de México al comparar con poblaciones de otros países.

Se encontró una alta prevalencia de coinfecciones por virus de VPH de alto riesgo, principalmente en el grupo de pacientes menores de 40 años, resultando esto estadísticamente significativo, aunque no es posible establecer que esta sea una causa de que los carcinomas en pacientes menores sean más agresivos.

CONCLUSIONES

- En este estudio no es posible descartar la hipótesis nula de que no existen diferencias en las mutaciones de los genes PIK3CA y EGFR en carcinoma de cérvix entre mujeres menores y mayores de 40 años.
- El grupo de pacientes menores de 40 años presenta con mayor frecuencia carcinomas más agresivos y menos diferenciados.
- La alta frecuencia de amplificación de EGFR en carcinomas escamosos comparado con adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos es un hallazgo que sugiere que los carcinomas de cérvix se originan de diferentes vías dependiendo del tipo histológico.
- Se requiere un estudio que compare proporciones iguales de carcinomas escamosos y adenocarcinomas para determinar si esta diferencia es significativa entre grupos de edad.
- El exón 9 presentó la mayor cantidad de mutaciones, con predominio en los dominios E542K y E545K, lo cual concuerda con lo encontrado en carcinomas vesicales y carcinomas escamosos de cabeza y cuello.
- Ambos dominios se asocian a mutagénesis de APOBEC pudiendo ser un blanco terapéutico en un futuro.
- Los tipos de VPH más frecuentes fueron 16, 33, 52 y 18; lo cual difiere de lo reportado a nivel mundial, pero mantiene cierta concordancia con lo reportado a nivel nacional
- Las pacientes menores de 40 años presentan mayor promedio de coinfecciones por VPH de alto riesgo en comparación con las pacientes mayores de 40 años

REFERENCIAS

1. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2019: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2019. Lyon, France: IARC; 2019 Dec: <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Ferlay, Jacques, et al. "Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 12, 2010, pp. 2893–2917., doi:10.1002/ijc.25516.
3. Forouzanfar, Mohammad H, et al. "Breast and Cervical Cancer in 187 Countries between 1980 and 2010: a Systematic Analysis." *The Lancet*, vol. 378, no. 9801, 2011, pp. 1461–1484., doi:10.1016/s0140-6736(11)61351-2.
4. <http://conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/19018-prevencion-control-cancer-cervicouterino>
5. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
doi:10.1002/cncr.28288.
6. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487307/Hoja_de_Datos_2019_CACU.pdf
7. Zheng, Zhi-Ming. "Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation." *Frontiers in Bioscience*, vol. 11, no. 1, 2006, p. 2286., doi:10.2741/1971.
8. Bosch, F X, et al. "The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer." *Journal of Clinical Pathology*, vol. 55, no. 4, 2002, pp. 244–265., doi:10.1136/jcp.55.4.244.
9. Doorbar, John, et al. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine*, vol. 30, 2012, doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083.

10. El, M., et al. "Evaluation of p53, p16INK4a and E-Cadherin Status as Biomarkers for Cervical Cancer Diagnosis." *Topics on Cervical Cancer with an Advocacy for Prevention*, 2012, doi:10.5772/29279.
11. Schiffman, Mark, et al. "Human Papillomavirus and Cervical Cancer." *The Lancet*, vol. 370, no. 9590, 2007, pp. 890–907., doi:10.1016/s0140-6736(07)61416-0.
12. Clifford, Gm, et al. "Worldwide Distribution of Human Papillomavirus Types in Cytologically Normal Women in the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys: a Pooled Analysis." *The Lancet*, vol. 366, no. 9490, 2005, pp. 991–998., doi:10.1016/s0140-6736(05)67069-9.
13. Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure E, Medina-Martinez I, Alfaro A, et al. (2014) The Distribution of High-Risk Human Papillomaviruses Is Different in Young and Old Patients with Cervical Cancer. *PLoS ONE* 9(10): e109406. doi:10.1371/journal.pone.0109406
14. Muñoz, Nubia, et al. "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer." *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 6, 2003, pp. 518–527., doi:10.1056/nejmoa021641.
15. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Mexico. Summary Report 17 June 2019.
16. Gallegos-Bolaños, Jazbet, et al. "High Prevalence of Co-Infection between Human Papillomavirus (HPV) 51 and 52 in Mexican Population." *BMC Cancer*, vol. 17, no. 1, 2017, doi:10.1186/s12885-017-3519-7.

17. Fajardo-Ramírez, Oscar R., et al. "Prevalence and 3-Year Persistence of Human Papillomavirus Serotypes in Asymptomatic Patients in Northern Mexico." *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, vol. 136, no. 1, 2016, pp. 40–46., doi:10.1002/ijgo.12009.
18. Castellsague, X., and N. Munoz. "Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis--Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking." *JNCI Monographs*, vol. 2003, no. 31, 2003, pp. 20–28., doi:10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003477.
19. Deacon, J M, et al. "Sexual Behaviour and Smoking as Determinants of Cervical HPV Infection and of CIN3 among Those Infected: a Case–Control Study Nested within the Manchester Cohort." *British Journal of Cancer*, vol. 83, no. 11, 2000, pp. 1565–1572., doi:10.1054/bjoc.2000.1523.
20. Okunade, Kehinde Sharafadeen, et al. "Prevalence and Risk Factors for Genital High-Risk Human Papillomavirus Infection among Women Attending the out-Patient Clinics of a University Teaching Hospital in Lagos, Nigeria." *Pan African Medical Journal*, vol. 28, 2017, doi:10.11604/pamj.2017.28.227.13979.
21. Lau, Hei-Yu, et al. "Aggressive Characteristics of Cervical Cancer in Young Women in Taiwan." *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, vol. 107, no. 3, 2009, pp. 220–223., doi:10.1016/j.ijgo.2009.07.029.
22. Wright, Alexi A. "Oncogenic Mutations in Cervical Cancer." *Cancer*, vol. 119, no. 21, 2013, pp. 3776–3783., doi:10.1002/cncr.28288.
23. "Integrated Genomic and Molecular Characterization of Cervical Cancer." *Nature*, vol. 543, no. 7645, 2017, pp. 378–384., doi:10.1038/nature21386.

24. Mimeault M, Batra SK. "Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies." *Ann Oncol* 2007;18:1605-19.
25. ShenMR, HsuYM, Hsu KF, ChenYF, TangMJ, Chou CY. Insulin-like growth factor1 is a potent stimulator of cervical cancer cell invasiveness and proliferation that is modulated by avh3 integrin signaling. *Carcinogenesis* 2006;27:962-71.
26. Iida, K. "EGFR Gene Amplification Is Related to Adverse Clinical Outcomes in Cervical Squamous Cell Carcinoma, Making the EGFR Pathway a Novel Therapeutic Target." *British Journal of Cancer*, vol. 105, no. 3, 2011, pp. 420–427., doi:10.1038/bjc.2011.222.
27. Ojesina, Akinyemi I., et al. "Landscape of Genomic Alterations in Cervical Carcinomas." *Nature*, vol. 506, no. 7488, 2013, pp. 371–375., doi:10.1038/nature12881.
28. Tornesello, Maria Lina. "TP53 And PIK3CA Gene Mutations in Adenocarcinoma, Squamous Cell Carcinoma and High-Grade Intraepithelial Neoplasia of the Cervix." *Journal of Translational Medicine*, vol. 12, no. 1, 2014, doi:10.1186/s12967-014-0255-5.
29. Olson, Margaret E., and Reuben S. Harris. "APOBEC Enzymes as Targets for Virus and Cancer Therapy." *Cell Chemical Biology*, vol. 25, no. 1, 2018, pp. 36–49., doi:10.1016/j.chembiol.2017.10.007.
30. Pelkofski, Elizabeth, et al. "Cervical Cancer in Women Aged 35 Years and Younger." *Clinical Therapeutics*, vol. 38, no. 3, 2016, pp. 459–466., doi:10.1016/j.clinthera.2016.01.024.