

ICLIAD 64 (2), 139-262, 2023

p-ISSN 0535-5133
e-ISSN 2477-9393

Volumen 64

No. 2

Junio 2023

Investigación Clínica

Universidad del Zulia
Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Clínicas
"Dr. Américo Negrette"
Maracaibo, Venezuela



Investigación Clínica

<https://sites.google.com/site/revistainvestigacionesclinicas>

Revista arbitrada dedicada a estudios humanos, animales y de laboratorio relacionados con la investigación clínica y asuntos conexos.

La Revista es de Acceso Abierto, publicada trimestralmente por el Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, de la Facultad de Medicina, de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Investigación Clínica está indizada en Science Citation Index Expanded (USA), Excerpta Medica/EMBASE y Scopus (Holanda), Tropical Diseases Bulletin y Global Health (UK), Biblioteca Regional de Medicina/BIREME (Brasil), Ulrich’s Periodicals, Journal Citation Reports (USA), Index Copernicus (Polonia), SIIEC Data Bases, Sección Iberoamérica (Argentina) e Infobase Index (India), Redalyc y las bases de datos: SciELO (www.Scielo.org.ve), Reveneyt, LILACS, LIVECS, PERIODICA y web de LUZ: <http://www.produccioncientificaluz.org/revistas>

Américo Negrette †
Editor Fundador (1960-1971)

Editora
Elena Ryder

Slavia Ryder
Editora 1972-1990

Asistente al Editor
Lisbeny Valencia

Comité Editorial (2022-2024)

| | |
|----------------------|-------------------|
| Deyseé Almarza | Jesús Mosquera |
| María Díez-Ewald | Jesús Quintero |
| Juan Pablo Hernández | Enrique Torres |
| Yraima Larreal | Nereida Valero |
| Humberto Martínez | Gilberto Vizcaíno |

Asesores Científicos Nacionales (2022-2024)

| | |
|---|-----------------------------------|
| Alberto Aché (Maracay) | Oscar Noya (Caracas) |
| Trino Baptista (Mérida) | José Núñez Troconis (Maracaibo) |
| Rafael Bonfante-Cabarcas (Barquisimeto) | Mariela Paoli (Mérida) |
| Javier Cebrian (Caracas) | Flor Pujol (Caracas) |
| Rodolfo Devera (Ciudad Bolívar) | Alexis Rodríguez-Acosta (Caracas) |
| Saul Dorfman (Maracaibo) | Martín Rodríguez (Caracas) |
| Jorge García Tamayo (Maracaibo) | Vanessa Romero (Maracaibo) |
| José Golaszewski (Valencia) | Liseti Solano (Valencia) |
| Liliana Gomez Gamboa (Maracaibo) | Lisbeth Soto (Valencia) |
| Maritza Landaeta de Jiménez (Caracas) | Marisol Soto Quintana (Maracaibo) |
| Jorymar Leal (Maracaibo) | Herbert Stegemann (Caracas) |
| Diego Martinucci (Maracaibo) | Ezequiel Trejo-Scorza (Caracas) |
| Edgardo Mengual (Maracaibo) | |

Asesores Científicos Internacionales (2022-2024)

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Carlos Aguilar Salinas (México) | Carlos Lorenzo (USA) |
| Francisco Alvarez-Nava (Ecuador) | Juan Ernesto Ludert (México) |
| Germán Añez (USA) | Valdair Muglia (Brasil) |
| César Cuadra Sánchez (Nicaragua) | Alejandro Oliva (Argentina) |
| Peter Chedraui (Ecuador) | José Antonio Páramo (España) |
| Marcos de Donato (México) | Isela Parra Rojas (México) |
| José Esparza (USA) | Joaquín Peña (USA) |
| Francisco Femenia (Argentina) | Mercede Pineda (España) |
| Hermes Flórez (USA) | Heberto Suárez (USA) |
| Elvira Garza-González (México) | Rodolfo Valdez (USA) |
| José María Gutiérrez (Costa Rica) | Gustavo Vallejo (Colombia) |
| Tzasna Hernández (México) | |

*Para cualquier otra información dirigir
su correspondencia a:*

*Dra. Elena Ryder, Editora
Instituto de Investigaciones Clínicas
"Dr. Américo Negrette"
Facultad de Medicina, Universidad del Zulia
Maracaibo, Venezuela.*

Teléfono:

+58-0414-6305451

Correos electrónicos:

elenaryder@gmail.com

riclinicas@gmail.com

Páginas web:

*[https://sites.google.com/site/
revistainvestigacionesclinicas](https://sites.google.com/site/revistainvestigacionesclinicas)*

*[http://www.produccioncientificaluz.
org/revistas](http://www.produccioncientificaluz.org/revistas)*

*For any information please address
correspondence to:*

*Dr. Elena Ryder, Editor
Instituto de Investigaciones Clínicas
"Dr. Américo Negrette"
Facultad de Medicina, Universidad del Zulia
Maracaibo, Venezuela.*

Phone:

+58-0414-6305451

E-mails:

elenaryder@gmail.com

riclinicas@gmail.com

Web pages:

*[https://sites.google.com/site/
revistainvestigacionesclinicas](https://sites.google.com/site/revistainvestigacionesclinicas)*

*[http://www.produccioncientificaluz.
org/revistas](http://www.produccioncientificaluz.org/revistas)*



**Universidad del Zulia
Publicación auspiciada por el
Vicerrectorado Académico
Serbiluz-CONDES**

© 2023. INVESTIGACIÓN CLÍNICA

© 2023. Instituto de Investigaciones Clínicas

CODEN: ICLIAD

Versión impresa ISSN: 0535-5133

Depósito legal pp 196002ZU37

Versión electrónica ISSN: 2477-9393

Depósito legal ppi 201502ZU4667

Artes finales:

Lisbeny Valencia

lisbenyvalencia@gmail.com

EDITORIAL

El dilema del Editor ante las circunstancias actuales de la comunicación científica.

Recientemente la comunidad científica ha sido objeto de mucha controversia por algunos hechos que se han suscitado como el retiro de revistas por parte de un reconocido índice internacional (Web of Science/Clarivate). Las razones expuestas fueron que no estaban llevando a cabo adecuados procesos de revisión por pares y publicando artículos carentes de rigor científico a cambio de altos costos de publicación, la mayoría pagados con dinero público.

Lo cierto es, que se han visto afectados muchos investigadores que confiaron en dichas revistas y temen que ello repercute en su carrera profesional. Uno de los argumentos del índice, sería la aprobación de los manuscritos en tiempo record, y de hecho se puede comprobar que es frecuente encontrar en la WEB, trabajos que aparecen como aceptados en apenas dos o tres días después de la fecha de recepción, cuando en realidad en esta época existe una escasez de árbitros que puedan revisarlos prácticamente de inmediato; por diversas razones los expertos no están aceptando con facilidad las invitaciones para revisar trabajos.

Un segundo caso, probablemente relacionado al mismo tema, es el de un investigador que ha sido sancionado por su universidad en Europa, al considerar dudosa la excesiva autoría de trabajos publicados por dicho individuo en un tiempo muy corto. Efectivamente, es frecuente encontrar casos de autores asesorando a grupos de trabajo de varios países, muy ajenos a su país de origen, quizás solo como analistas de estadística, u ofreciendo su reconocido nombre, para estimular la citación de una institución o país.

Esto conduce a la pregunta que siempre se ha considerado prudente discutir cuando se redacta un trabajo científico: ¿Quiénes deben cumplir con los requisitos de autor?, y ¿Cuál sería la cuantía de publicaciones que pueda tener un autor, para que no resulte sospechoso de autoría gratificante o conveniente, para el mismo o para la institución a la que pertenece?

También se ha hablado de la obtención de autorías en revistas de alto impacto, a través de pagos o favores recibidos y de citaciones que no corresponden al tema tratado en el trabajo. Nuestra revista ha recibido algunas contribuciones con citaciones fuera de contexto, las cuales han sido enmendadas a través de llamados de alerta a los autores, antes de ser enviadas a revisión por pares, gracias a una revisión rigurosa de los textos, y en especial de las referencias.

Si bien es cierto que, para los investigadores universitarios, existe la imperiosa necesidad de publicar en revistas acreditadas por los reconocidos índices internacionales, no solo como éxito propio, sino para contribuir al prestigio de su institución, cada vez se hace más popular la publicación, al menos en los temas del área de la salud, de comunicaciones que provienen de resultados no sujetos a la revisión por pares. Esto es muy común, en los llamados pre-prints de conocidas empresas, o en otros buscadores, o en páginas web individuales, donde cualquier investigador puede colocar resultados que no han sido sometidos a escrutinios de pares; sin embargo, estos son captados por los buscadores de datos y así logran ser citados, al ser ubicados en la página web. Otro

caso, es el novedoso uso de publicación de Resúmenes o Trabajos en Extenso, producto de un evento científico realizado en una institución académica, los cuales se toman en cuenta como publicación regular, cuando es sabido que la mayoría de las comunicaciones a eventos son resultados preliminares que terminan pocas veces en una publicación completa. Es la Ciencia abierta por la que muchos abogan como la libertad de comunicar resultados sin la anuencia de árbitros o requisitos, a veces muy rigurosos, de las revistas científicas. Peor aún, es la comunicación, realizada por cualquier individuo no experto en un campo, a través de las redes sociales más populares, de conceptos que calan profundamente en la opinión pública en general, transmitiéndose como si fueran hechos probados y allí el peligro, en el caso

específico de la Medicina, a daños para la salud. Todas estas situaciones conducen a que nosotros, los Editores de revistas científicas, apoyados en el Comité Editorial y Asesores Científicos, seamos muy vigilantes ante estos hechos, y estemos prestos a discutir las ventajas o inconveniencias de las modernas iniciativas, la influencia de los medios sociales en la disseminación de información y de saber interpretar su impacto en la salud pública y por otro lado, sopesar el papel de las citas y los índices de impacto, en la proyección de los individuos de Ciencia, como lo están haciendo algunas instituciones académicas de países europeos (España) o asiáticos (China).

Elena Ryder

ORCID 0000-0003-4613-6424

The Editor's dilemma in the current circumstances of scientific communication

Recently the scientific community has been the subject of much controversy due to some facts that have arisen. One was the withdrawal of journals by the Web of Science for not carrying out adequate peer review processes and publishing articles lacking in scientific rigor in exchange for high publication costs. In fact, it can be verified that it is common to find works that appear accepted just two or three days after the date of receipt, making it doubtful of an adequate review. Many advocate "Open Science" as the freedom to communicate results without the consent of referees or the sometimes very rigorous requirements of scientific journals. Another example case was that of a researcher sanctioned by his University for considering the excessive authorship of works published by the said individual in a very short time, which seems to be doubtful. It is common to find cases of researchers advising working groups from various countries outside their country of origin, perhaps only as statistical analysts or offering their recognized names to stimulate the citation of an institution or country. It would then be appropriate to ask the question: What would be the number of publications that an author may have so that it is not suspected of gratifying or convenient authorship, for himself or for the institution to which he belongs? On the other hand, it is known that authorship of papers may be obtained in high-impact journals through payments or citations that do not correspond to the topic dealt with in the work. Indeed, we have discovered some contributions with out-of-context citations in *Investigación Clínica* through a rigorous analysis of the references. Worse still, it is the communication, carried out by any individual who is not an expert in a field, through the most popular social networks, of concepts that deeply permeate public opinion in general, being transmitted as if they were proven facts and therein the danger, in the specific case of Medicine, damage to health. For all of the above, the Editors of scientific journals must be very vigilant and ready to discuss the advantages or inconveniences of modern initiatives, the influence of social media in disseminating information, and knowing how to interpret their impact on public health. On the other hand, Journals have to balance the role of citations and impact indexes in the projection of Science individuals, as some academic institutions in European (Spain) or Asian (China) countries are doing.

Analysis of the value of dynamic computed tomography (CT) examination in the diagnosis of early lung cancer.

Liang Sheng, Liang Wu, Xianwu Xia and Junmiao Li

Department of Medical Imaging, Taizhou Municipal Hospital, Municipal Hospital Affiliated to Taizhou University, Taizhou, Zhejiang, China.

Keywords: CT dynamic enhancement scan; early stage; diagnostic value; blood flow.

Abstract. Early diagnosis and treatment are vital to improving lung cancer patients' quality of life and survival rate. This study aimed to investigate the value of dynamic enhanced scanning examination by computed tomography (CT) in early lung cancer diagnosis. One hundred and twenty patients with isolated lung nodules were selected to analyze this diagnostic method, using pathological diagnostic results of cancer as the gold standard. Of the 120 patients with isolated pulmonary nodules, the diagnosis was confirmed by pathological examination in 96 patients with early lung cancer (adenocarcinoma of the lung) and 24 patients with benign lung lesions. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, and negative predictive value of CT dynamic enhancement scans for the diagnosis of early-stage lung cancer were 93.75%, 83.33%, 91.67%, 95.74%, and 76.92%, respectively. Early-stage lung cancer had significantly less blood volume and a noticeably shorter mean time to passage than benign lung lesions ($p < 0.01$). Blood flow and surface permeability were higher in early-stage lung cancer than in benign lung lesions ($p < 0.05$). The areas under the receiver operating characteristic (ROC) curves for blood volume, blood flow, surface permeability, and mean time to passage for the diagnosis of early-stage lung cancer were 0.737, 0.724, 0.779, and 0.946, respectively. In conclusion, CT dynamic enhancement scan has good application value in diagnosing early lung cancer and is worth promoting in clinical practice.

Análisis del valor del escaneo dinámico realizado por tomografía computarizada (TC) en el diagnóstico de cáncer de pulmón temprano.

Invest Clin 2023; 64 (2): 142 – 150

Palabras clave: tomografía computarizada (TC) de realce dinámico; etapa temprana; cáncer de pulmón; valor de diagnóstico; flujo sanguíneo.

Resumen. El diagnóstico y tratamiento tempranos son vitales para mejorar la calidad de vida y la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. Este estudio tuvo como objetivo investigar el valor del examen de escaneo dinámico realizado por tomografía computarizada (TC) en el diagnóstico de cáncer de pulmón temprano. Ciento veinte pacientes con nódulos pulmonares aislados fueron seleccionados para analizar este método diagnóstico, utilizando los resultados del diagnóstico patológico de cáncer como el estándar de oro. De los 120 pacientes con nódulos pulmonares aislados, el diagnóstico fue confirmado mediante un examen patológico en 96 pacientes con cáncer de pulmón temprano (adenocarcinoma de pulmón) y 24 pacientes con lesiones pulmonares benignas. La sensibilidad, la especificidad, la precisión, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de las tomografías computarizadas de realce dinámico para el diagnóstico de cáncer de pulmón en etapa inicial fueron respectivamente del 93,75%, 83,33%, 91,67%, 95,74% y 76,92%. El cáncer de pulmón en etapa temprana tuvo un volumen de sangre de modo significativo menor y un tiempo medio notablemente más corto hasta el paso que las lesiones pulmonares benignas ($p < 0,01$). El flujo sanguíneo y la permeabilidad de la superficie fueron mayores en el cáncer de pulmón en etapa temprana que en las lesiones pulmonares benignas ($p < 0,05$). Las áreas bajo las curvas ROC (Característica Operativa del Receptor) para el volumen de sangre, el flujo sanguíneo, la permeabilidad de la superficie y el tiempo medio hasta el paso para el diagnóstico de cáncer de pulmón en etapa temprana fueron respectivamente 0,737, 0,724, 0,779 y 0,946. En conclusión, la tomografía computarizada de realce dinámico tiene un buen valor de aplicación diagnóstico temprano del cáncer de pulmón y vale la pena promoverla en la práctica clínica.

Received: 07-09-2022 Accepted: 23-10-2022

INTRODUCTION

Lung cancer originates from the bronchial mucosa epithelium, and its incidence gradually increases. The early clinical symptoms of lung cancer are not obvious, and about 2/3 of lung cancer patients are at an advanced stage (stage III or IV) ¹. Aggres-

sive radiotherapy, chemotherapy, or surgery can cure and extend the survival time of patients with early-stage lung cancer. However, patients with intermediate to advanced lung cancer have poor outcomes, high mortality rates, and a significantly lower quality of life ².

Therefore, early detection and treatment are the keys to improving lung cancer

patients' survival rate and quality of life. In clinical practice, the diagnosis of early-stage lung cancer depends mainly on imaging data.

With the more frequent usage of imaging techniques, more research concentrated on detecting pulmonary nodules using computed tomography (CT). CT enhancement peaks and associated parameters are obtained from CT dynamic enhancement scans and analyzed for their diagnostic efficacy³. Due to the aggressive nature of malignant tumors during the growth period, their morphological features and enhancement modes are commonly used for early diagnosis of pulmonary nodules in the clinical practice.

Also, a series of radiomic studies based on tissue analysis of lung nodules have been considered for better interpretation of morphological heterogeneity and irregular proliferation of tumor cells than using traditional CT images^{4,5}. It was confirmed that CT dynamic enhancement detection has considerable value for identifying malignant and benign nodules⁶. Wang and Shan⁷ reported that dynamic enhanced CT scanning showed the ability to differentiate pulmonary inflammatory pseudotumor, pulmonary tuberculosis, and lung cancer, representing its diagnostic value.

The blood supply in lung cancer is markedly different from benign lesions due to tumor angiogenesis, and the change in tissue density after contrast injection is marked. Some studies reported that malignant nodules have higher blood flow, volume, and mean transit time⁸⁻¹⁰. Nevertheless, a study showed that malignant lesions had lower blood volume and mean transit time¹¹. In addition, the results of a meta-analysis showed that blood volume is the best indicator and marker for describing the blood supply, while permeability surface has a high specificity in quantifying the vascular permeability⁴.

However, these studies focused on the high stages of lung cancer. Therefore, investigation of CT parameters in early lung cancer patients is necessary.

In this study, the value of dynamic CT-enhanced scanning examination in the diagnosis of early lung cancer was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and study design

Patients with isolated pulmonary nodules who attended our hospital from January 2017 to December 2020 were selected. Inclusion criteria included that all patients were pathologically confirmed, aged >18 years, without lymph node enlargement, and underwent CT dynamic enhancement scans. Exclusion criteria were that the quality of the images was suboptimal and that the patient had a combination of other malignancies. According to the inclusion and exclusion criteria, 96 patients with isolated pulmonary nodules were included in this study, of whom 68 were males and 28 were females. Their ages ranged from 34 to 71 years, with a mean age of (52.04 ± 5.12) years.

CT dynamic enhancement scan

All patients underwent CT dynamic enhancement scans and pathological examinations. A SOMATOM Definition AS multi-layer spiral CT machine from Siemens, Germany, was employed as the CT dynamic enhancement scanning equipment. A volume of 65 mL of iopamidol injected into the patient's elbow vein at a flow rate of 3 mL/s. Patients were instructed to fast before the examination and adopt the correct breathing method for the iodine allergy test. The patient's lung lesion and a surrounding area of approximately 6 mm were scanned at 20, 80, 140, 200, and 260 s after the contrast injection, and the CT perfusion parameters were calculated.

Observation indicators

The diagnostic value of CT dynamic enhancement scans for early lung cancer was analyzed using pathological findings as the gold standard, including sensitivity, specificity, accuracy, and positive and negative

predictive values. CT dynamic enhancement scans were performed for patients with early lung cancer, whose diagnosis was confirmed by a histological study on the sample removed by biopsy through bronchoscopy.

CT perfusion parameters, which included blood flow, volume, surface permeability, and mean time to passage, were compared between patients with early-stage lung cancer and benign lung nodules. Based on the Patlak analysis method, reflux can be calculated from the maximum slope of the tissue concentration-time curve or its peak height normalized to the arterial input function. According to this theoretical model, the exchange between blood and tissue can be well described by a Patlak diagram, which shows the tissue-to-blood concentration ratio versus the AUC (area under the curve) ratio of the blood-to-blood concentration curve. For different time values, if the data fits this theoretical model, the graph will be a line with a slope equal to the blood vacuum per unit volume (permeability) and an interval equal to the relative blood volume of the tissue.

Statistical analysis

The SPSS 22.0 was used for the statistical analysis of the data. The measurement data were expressed as mean \pm standard deviation ($\bar{x} \pm SD$), and the t-test was used for comparison between groups. The statistical data were expressed as the number of cases and the rate (%), and the χ^2 test was used for comparison between groups. The diagnostic value of the perfusion parameters was assessed using the receiver operating characteristic (ROC) curve. The difference was considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Pathological findings

Among 120 patients with isolated lung nodules, 96 patients were diagnosed with early-stage lung cancer (adenocarcinoma of the lung) by pathological examination. Twenty-five patients of those were classified as stage 0 of TNM (Tumor-Node-Metastasis) staging system, 44 patients were classified as stage I A, and 27 patients were classified as stage I B. There were 24 patients with benign lung lesions, including 11 with pneumonia and 13 with tuberculosis (Table 1).

Demographic of patients

Out of 21 patients in TNM stage 0M, 17 patients were men, and eight were women. Also, out of 44 patients in TNM stage I A, 30 were men, and 14 were women; out of 27 patients in TNM stage I B, 21 were men, and six were women. There were no significant differences in terms of gender in the three stages of the disease.

The average age of patients in TNM stage 0M was 54.05 ± 6.4 years. Moreover, the average age of patients in TNM stage I A and TNM stage I B stages were 52.03 ± 3.1 and 55 ± 4.2 , respectively, and the patients of the three stages were significantly different in terms of average age ($p \leq 0.03$) (Table 2).

Diagnostic value of CT dynamic enhancement scans for early-stage lung cancer

The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, and negative predictive value of CT dynamic enhancement scans for the diagnosis of early-stage lung cancer were 93.75% (90/96), 83.33% (20/24),

Table 1
Pathological findings

| | Early-stage lung cancer | | | Benign lung lesions | |
|-------|-------------------------|---------------|---------------|---------------------|--------------|
| | TNM stage 0 | TNM stage I A | TNM stage I B | pneumonia | tuberculosis |
| Cases | 25 | 44 | 27 | 11 | 13 |

Table 2
Characteristics of the three groups with different pathological findings.

| Characteristics | TNM stage 0M | TNM stage I A | TNM stage I B | p-value |
|-----------------|--------------|---------------|---------------|---------|
| Gender | | | | |
| Male | 17 | 30 | 21 | 0.07* |
| Female | 8 | 14 | 6 | |
| Age (y) | 54.05 ± 6.4 | 52.03 ± 3.1 | 55 ± 4.2 | 0.03** |

*p-value calculated based on chi-square, ** p-value calculated based on One-way ANOVA.

91.67% (110/120), 95.74% (90/94) and 76.92% (20/26), respectively.

Comparison of parameters of early-stage lung cancer and benign lung lesions

The blood volume of early-stage lung cancer was significantly lower than that of benign lung lesions, and the mean time to passage was significantly shorter than that of benign lung lesions, and all differences were statistically significant ($p < 0.01$). Both blood flow and surface permeability were higher in early-stage lung cancer than in benign lung lesions, and the differences were statistically significant ($p < 0.05$). There were no statistically significant differences in lesion size and proportion of solid nodules when comparing early-stage lung cancer and benign lung lesions ($p > 0.05$) (Fig. 1).

Comparison of CT perfusion parameters for early-stage lung cancer at different TNM stages

The differences in blood flow, surface permeability, and mean time to passage were not statistically significant when comparing patients with TNM stage 0, stage IA and stage IB early-stage lung cancer ($p > 0.05$) (Fig. 2).

Diagnostic efficacy of CT perfusion parameters for early-stage lung cancer

The areas under the ROC curves of blood volume, blood flow, surface permeability, and mean time to passage for the diagnosis of early-stage lung cancer were 0.737, 0.724, 0.779, and 0.946, respectively. Sur-

face permeability had the highest sensitivity of 92.5% for diagnosing early-stage lung cancer and the highest specificity of 99.5% for diagnosing early-stage lung cancer by mean time to passage (Table 3).

DISCUSSION

Diagnostic imaging is critical for the detection and staging of lung cancer. Standard clinical imaging examinations are conventional chest scans and dynamic enhancement CT¹². Performing a plain chest examination on a patient usually requires a continuous change of position to ensure that the examination is completed. However, it can worsen the patient's lung pain, leading to poor compliance. Therefore, in practice, this option is not chosen for most patients¹³. The CT dynamic enhancement scanning technique with non-overlapping images allows for precise detection of small early lesions, timely detection of enlarged mediastinal lymph nodes, and determination of the extent of tumor invasion of the pleura and surrounding blood vessels, leading to the correct staging of lung cancer¹⁴. In addition, relevant studies have shown that dynamic CT-enhanced scanning techniques can be used as an effective adjunctive diagnostic tool for early lung cancer in clinical practice¹⁵.

The results of this study showed that the sensitivity, specificity, accuracy, and positive and negative predictive values of CT dynamic enhancement scans for the diagnosis of malignant lesions were all at a high level. This

is because the imaging features in the early diagnosis of lung cancer are manifested by lobar signs, burr signs, vascular collection signs, and bronchial inflation signs, which are absent in patients with benign nodules. These phenomena allow the identification

of benign and malignant nodules and can improve the accuracy of diagnosis of early-stage lung cancer. The lobar sign is caused by the lack of clear cut and heterogeneity of the tumor margins, which is caused by restricted growth¹⁶.

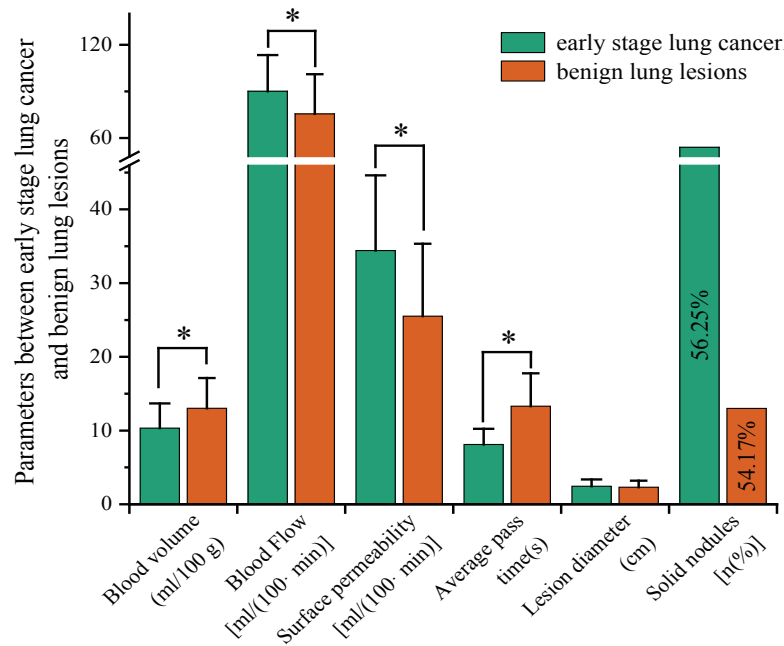


Fig. 1. Comparison of parameters between early-stage lung cancer and benign lung lesions *p<0.05.

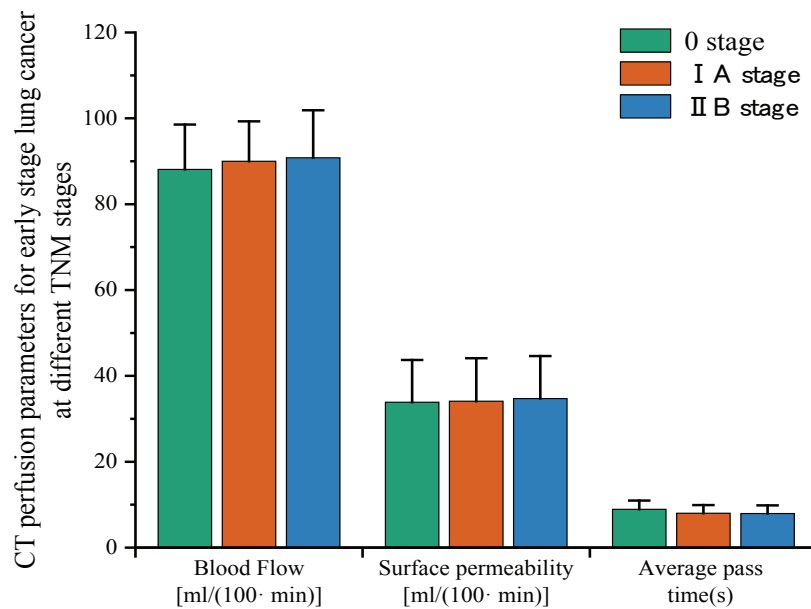


Fig. 2. Comparison of CT perfusion parameters for early-stage lung cancer at different TNM stages.

Table 3
Diagnostic efficacy of CT perfusion parameters for early-stage lung cancer.

| Parameters | Area under the curve | 95%CI | Optimal cut-off value | Sensitivity (%) | Specificity (%) |
|----------------------|----------------------|-----------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Blood volume | 0.74 | 0.60~0.88 | 13.15 | 85.0 | 65.0 |
| Blood Flow | 0.72 | 0.60~0.85 | 72.11 | 81.3 | 60.0 |
| Surface permeability | 0.78 | 0.66~0.89 | 27.27 | 92.5 | 50.0 |
| Average pass time | 0.95 | 0.89~0.99 | 10.64 | 85.0 | 99.5 |

Most tumor cells grow invasively along the alveolar wall and lymphatic vessels, resulting in localized venous stasis and burr. However, signs of pneumonia may also be present in pneumonic nodules, which can lead to misdiagnosis. The CT dynamic enhancement scan examination method is simple, quick, and has non-invasive characteristics, which can detect the whole range and location of lung lesions with clear images and high diagnostic accuracy, indicating that CT dynamic enhancement scan can be used for the diagnosis of lung cancer to effectively reduce the misdiagnosis rate and improve the diagnostic efficiency.

If the differential diagnosis cannot be made based on the imaging features of early lung cancer, the diagnosis can be accomplished by blood flow parameters. The results of this study showed that early-stage lung cancer had significantly less blood volume, significantly shorter mean time to passage, and higher blood flow and surface permeability than benign lung lesions. In contrast, the differences in blood volume, blood flow, surface permeability, and mean time to passage were not statistically significant when comparing patients with early-stage lung cancer at different TNM stages. These results suggest that CT flow parameters can be used clinically to differentiate between benign and malignant lung lesions but are of less diagnostic value for clinical TNM staging, which is caused by the lymphatic return and lymphatic volume of malignant lesions. During a CT dynamic enhancement scan, the patient's lymphatic reflux slows, and the

lymphatic volume decreases, affecting contrast flow due to lymphatic lesions in clinical malignancies. In contrast, the endothelial space of the capillaries widens, and there are various inter endothelial channels, which leads to a loss of basement membrane and, therefore, a high blood flow in the vessels.

Some studies have found that CT perfusion parameters such as blood volume, blood flow, surface permeability, and passage time during CT dynamic enhancement scans are of high diagnostic value for early lung cancer^{17,18}. However, fewer studies have separately accounted for their sensitivity and specificity. In this study, we found that the mean time to passage was of high diagnostic value for early-stage lung cancer by plotting ROC curves.

In conclusion, CT dynamic enhancement scan has high application value in diagnosing early lung cancer and is worthy of clinical promotion. However, the number of cases included in this study was small, and there is a need to expand the sample size in future studies to eliminate statistical errors. In addition, it is necessary to further analyze the intrinsic association between peak CT enhancement and lung cancer pathogenesis in conjunction with some immunohistochemical indicators to elucidate the adjunctive clinical significance of CT dynamic enhancement scanning technology.

Limitation

One of the limitations of the study is that it was conducted in a single hospital. Therefore, it is recommended to carry out

similar studies in several hospitals or medical centers in the future.

Funding

Exploration of personalized screening and graded diagnosis and treatment plans for early lung cancer in Zhejiang Province based on big data and artificial intelligence (Project No: 2022C35008).

Competing Interests

The authors declared that they have no competing interests.

Authors' Contribution

LS, LW and JL contributed to the conception of the study; LS, XX and JL performed the experiment; LW contributed significantly to the analysis and manuscript preparation; LS and JL performed the data analyses and wrote the manuscript; XX helped perform the analysis with constructive discussions.

Authors' ORCID Number

- Liang Sheng: 0000-0003-0620-4779
- Liang Wu: 0000-0002-1247-4583
- Xianwu Xia: 0000-0003-3508-0816
- Junmiao Li: 0000-0001-8890-6242

REFERENCES

1. **Takkal S, Van Muylem A, Gevenois PA.** CT Scan in early detection of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective monocentric study. *Rev Med Brux* 2018; 39(2): 93-100.
2. **Iwano S, Ito S, Kamiya S, Ito R, Kato K, Naganawa S.** Utility of metabolic parameters on FDG PET/CT in the classification of early-stage lung adenocarcinoma: prediction of pathological invasive size. *Clin Nucl Med* 2019; 44(7): 560-565.
3. **Vial MR, O'Connell OJ, Grosu HB, Hernandez M, Noor L, Casal RF, Stewart J, Sarkiss M, Jimenez CA, Rice D, Mehran R.** Diagnostic performance of endobronchial ultrasound-guided mediastinal lymph node sampling in early stage non-small cell lung cancer: A prospective study. *Respirology* 2018; 23(1): 76-81.
4. **Huang C, Liang J, Lei X, Xu X, Xiao Z, Luo L.** Diagnostic performance of perfusion computed tomography for differentiating lung cancer from benign lesions: a meta-analysis. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2019; 25: 3485.
5. **Zhao Q, Shi CZ, Luo LP.** Role of the texture features of images in the diagnosis of solitary pulmonary nodules in different sizes. *Chinese J Cancer Res* 2014; 26(4): 451.
6. **Wang X, Lv L, Zheng Q, Huang X, Li B.** Differential diagnostic value of 64-slice spiral computed tomography in solitary pulmonary nodule. *Exp Ther Med* 2018; 15(6): 4703-4708.
7. **Wang XL, Shan W.** Application of dynamic CT to identify lung cancer, pulmonary tuberculosis, and pulmonary inflammatory pseudotumor. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(21): 4804-4809.
8. **Hou H, Xu Z, Zhang H, Xu Y.** Combination diagnosis of multitaner, pulmonary tuberculosis, and pulmonary inflammatory pseudotumor. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(21): e22250.
9. **Li Y, Yang ZG, Chen TW, Yu JQ, Sun JY, Chen HJ.** First-pass perfusion imaging of solitary pulmonary nodules with 64-detector row CT: comparison of perfusion parameters of malignant and benign lesions. *Br J Radiol* 2010; 83(993): 785-790.
10. **Wang G, Zhou XM, Zhao RR, Xu W, Zhang C, Jiang G, Tang X, Yu H.** Multi-slice spiral computed tomography perfusion imaging technology differentiates benign and malignant solitary pulmonary nodules. *Biomed Res-India* 2017; 28(10): 4605-4609.
11. **Xing N, Cai Z, Zhao S, Yang L.** The comparative study of CT perfusion parameters of solitary pulmonary nodules with microvessel density. *Chinese J Med Imaging* 2009; 19(4): 251-254.
12. **Zhou J, Chen E, Xu H, Ye Q, Li J, Ye S, Cheng Q, Zhao L, Su MY, Wang M.** Feasibi-

- lity and diagnostic performance of Voxelwise Computed Diffusion-Weighted Imaging in breast cancer. *J Magn Reson Imaging* 2019; 49(6): 1610-1616.
13. **Cui S, Cao Z, Guo W, Yu H, Huang R, Wu Y, Zhou Y.** Plasma miRNA-23a and miRNA-451 as candidate biomarkers for early diagnosis of nonsmall cell lung cancer: a case-control study. *Nan fang yi ke da xue xue bao= J South Med Univ* 2019; 39(6): 705-711.
 14. **Chudasama DY, Aladag Z, Felicien MI, Hall M, Beeson J, Asadi N, Gidron Y, Karteris E, Anikin VB.** Prognostic value of the DNA integrity index in patients with malignant lung tumors. *Oncotarget* 2018; 9(30): 21281.
 15. **Misawa K, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Ishikawa R, Kawasaki H, Yamatodani T, Kanazawa T.** Epigenetic modification of SALL1 as a novel biomarker for the prognosis of early stage head and neck cancer. *J Cancer* 2018; 9(6): 941.
 16. **Chang YC, Ding Y, Dong L, Zhu LJ, Jensen R V, Hsiao LL.** Differential expression patterns of housekeeping genes increase diagnostic and prognostic value in lung cancer. *PeerJ* 2018; 6: e4719.
 17. **Du Q, Yu R, Wang H.** Significance of tumor associated autoantibodies in the early diagnosis of lung cancer. *Clin Respir J* 2018; 12(6): 2020-2028.
 18. **Finazzi T, Ronden-Kianoush MI, Spoelstra FOB, Nossent EJ, Nijman SF, Bahce I, Dickhoff C, Senan S.** Stereotactic ablative radiotherapy in patients with early-stage non-small cell lung cancer and co-existing interstitial lung disease. *Acta Oncol (Madr)* 2020; 59(5): 569-573.

Pre-stroke physical activity is related to good functional outcomes in stroke patients after endovascular thrombectomy.

Xiangbo Meng^{1,2}, Haiyan Ding³, Congguo Yin⁴, Wenqing Xia⁴, Yan Wu² and Jianan Li¹

¹Center of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China.

²Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China.

³Department of Radiology, Huai'an Fifth People's Hospital, Huai'an, Jiangsu, China.

⁴Department of Neurology, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China.

Keywords: physical activity; stroke; endovascular thrombectomy; prognosis; functional outcome.

Abstract. Studies have shown that regular physical activity (PA) may reduce the risk of stroke. Nevertheless, the protective effect of pre-stroke PA on the post-stroke functional status in patients treated with endovascular thrombectomy (EVT) is still uncertain. For this study, hospitalized patients with acute ischemic stroke were selected, all of whom underwent EVT after occlusion of the large vessels in the anterior circulation. The PA levels before the stroke were assessed by the International Physical Activity Questionnaire, and the outcome indicators (the modified Rankin scale score and the Barthel index) were evaluated. A total of 144 patients were included in this study. Among the patients with high PA levels before the stroke, men were more active than women, and the proportion of patients with smoking and alcohol abuse was high before admission. Also, the patients with a high PA level were more likely to have no history of hypertension and atrial fibrillation, and had lower triglyceride levels at admission. We determined that a high pre-stroke PA level is independently related to a favorable functional outcome at three months. In addition, there was no correlation between a high pre-stroke PA and a good functional outcome at two weeks. A high pre-stroke PA level is independently associated with satisfactory activities of daily living at three months. Regular PA before a stroke is an independent predictor of a favorable functional outcome in patients with anterior circulation strokes who receive EVT, and it has a protective effect on the functional prognosis.

La actividad física previa al ictus se relaciona con un buen resultado funcional en pacientes con ictus tras una trombectomía endovascular.

Invest Clin 2023; 64 (2): 151 – 164

Palabras clave: actividad física; ictus o infarto cerebral; trombectomía endovascular; pronóstico; resultado funcional.

Resumen. Diversos estudios han demostrado que la actividad física regular (AF) antes del ictus puede reducir su riesgo, pero el efecto protector funcional de la AF previa al ictus sobre el estado funcional posterior al ictus, aún no está claro en los pacientes tratados con trombectomía endovascular (TEV). Se seleccionaron pacientes hospitalizados con ictus isquémico agudo, a todos los cuales se les realizó TEV por una oclusión de los grandes vasos de la circulación anterior. El nivel de la AF antes del infarto cerebral fue evaluado por el Cuestionario Internacional de Actividad Física y se evaluaron los indicadores de resultado de acuerdo a la puntuación de la escala de Rankin modificada y el índice de Barthel. Un total de 144 pacientes fueron incluidos en este estudio. Entre los pacientes con niveles elevados de AF antes del ictus, los hombres eran más activos que las mujeres, y la proporción de pacientes con hábito tabáquico y abuso de alcohol era alta antes del ingreso. Además, lo más probable es que los pacientes con los niveles elevados de AF no tenían antecedentes de hipertensión y fibrilación auricular, y los niveles de triglicéridos estaban más bajos al momento de su ingreso. Se determinó que un nivel alto de AF previa al ictus se relaciona de forma independiente con un buen resultado funcional a los 3 meses. Además, no hubo correlación entre la AF previa al ictus avanzado y un buen resultado funcional a las 2 semanas. Un nivel alto de AF previa al infarto cerebral se asocia de forma independiente con actividades satisfactorias de la vida diaria a los 3 meses. Conclusión: La AF regular antes del ictus es un predictor independiente de un buen resultado funcional en los pacientes con el ictus de la circulación anterior que reciben TEV, y tiene un efecto protector sobre el pronóstico funcional.

Received: 02-10-2022 Accepted: 21-11-2022

INTRODUCTION

Stroke is one of the most prevalent clinical diseases in the cerebrovascular system and compromises patients' health and quality of life ^{1,2}. In this disease, cell death happens because of an unexpected decrease or stop of the local arterial blood flow to the brain tissue. This leads to cell death and

damage to some parts of the brain, causing its malfunction. It can cause the following symptoms: paralysis, weakness or sensory changes in one side of the body or face, vertigo, understanding or speech disruption, or low vision on one side ^{3,4}. Stroke is divided into two types: ischemic stroke, with high morbidity, it can cause disability or death, because of the loss of blood supply and hem-

orrhagic stroke, caused by bleeding, with high mortality, high disability rate and high relapse speed^{3,5,6}. Ischemic stroke is the main cause of death and disability. This disease almost always happens in people over 40 years-old. To date, recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), endovascular thrombectomy (EVT) and antiplatelet therapy are the only three well-documented emergency treatment methods for ischemic stroke⁷. For patients with acute ischemic stroke caused by an occlusion of the large vessels in the anterior circulation, EVT has become one of the standard treatment methods when there is an indication for EVT (within a specified time limit, based on the mismatch between regional cerebral perfusion and infarction)^{8,9}. Approximately two-thirds of stroke survivors need some help in their daily life¹⁰, so it is very important for them to have a reduced degree of functional impairment.

Fors M *et al.* found that preoperative exercise therapy was moderately correlated with maintaining the postoperative physical activity level of patients with degenerative lumbar diseases¹¹. Moran *et al.* found that preoperative exercise rehabilitation training can reduce all kinds of postoperative complications after abdominal surgery¹². In addition, there is strong evidence that regular physical activity (PA), as a preconditioning stimulus¹³, has been consistently shown to be associated with a reduced risk of first stroke and its recurrence¹⁴. Animal studies have proven the beneficial effects of preischemic exercise training on stroke, and these beneficial effects include a prolonged survival time, a reduction in neurological deficits¹⁵, a decreased infarct volume and an improvement in the sensorimotor function after stroke^{13,16}. The mechanism by which exercise provides this protection may involve a combination of highly interactive ways, such as reducing the neurotoxicity through the glutamate system¹⁵, reducing oxidative stress and apoptosis of nerve cells¹⁷, inhibiting the inflammatory injury after cere-

bral ischemia/reperfusion¹⁸, improving the function of the blood-brain barrier after an ischemic stroke¹⁹, activating endothelial nitric oxide synthase¹⁶ to reduce the vascular injury after stroke, and promoting the expression of heat shock protein in neurons and glia²⁰. Therefore, the clinical guidelines for stroke prevention recommends regular PA (2014, Class IIa, Level of Evidence C)²¹. Regular PA is an important recommendation in preventing stroke²².

In this study, we intend to provide PA advice to the public by investigating the PA level before stroke and determining whether it has a beneficial effect on the poststroke functional status in patients who have had EVT, for a stroke that was caused by an anterior circulation large vessel occlusion.

METHODS

This study is a prospective cohort study that was conducted from September 2018 to May 2020. Patients with acute stroke consecutively admitted to the Department of Neurology of the Affiliated Hangzhou First People's Hospital of Zhejiang University School of Medicine (Hangzhou, China, a first-class tertiary hospital) were included. Stroke was defined according to the World Health Organization (WHO) standard²³. In addition, according to the diagnosis and treatment standard that was currently used in the respective stroke unit ward of the neurology department, all patients received standardized reperfusion therapy (EVT with or without intravenous rt-PA).

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria of this study were as follows: patients with acute ischemic stroke who were at least 18 years old and were hospitalized within 24 hours after symptoms had appeared; patients who had a confirmed occlusion of the anterior circulation large vessels on admission; patients who were treated with emergency EVT; and patients who had a modified Rankin scale

(mRs) score of ≤ 1 before the stroke. The exclusion criteria were as follows: no reliable information about the patient's past physical activities; patients with pre-stroke cognitive impairment; patients who were lost to follow-up; and patients who were missing information on their mRs at three months.

The Medical Ethics Committee of the Affiliated Hangzhou First People's Hospital of Zhejiang University School of Medicine approved this study. After fully informing the patients of the condition assessment and treatment methods in this study, the patients or their legally authorized person signed the informed consent form and participated in the clinical trial. The patient had the right to withdraw from the trial.

Observation and evaluation index

We recorded information including age, sex, height, weight, body mass index, education level, smoking (currently smoking more than ten cigarettes a day), alcohol abuse, on-going antiplatelet therapy, ongoing anticoagulant therapy, hypertension, diabetes, atrial fibrillation (persistent or paroxysmal), the severity of stroke (the National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS) at admission, hypertension, vascular occlusion, blood lipids, blood glucose, fibrinogen and the PA level before the stroke.

All patients had a CTP (computed tomography-guided perfusion scan), an emergency computed tomography (CT) and/or a magnetic resonance imaging scan. The patient's baseline arterial occlusion was evaluated by two methods: digital subtraction angiography and computed tomography angiography. If the M2-MCA segment (middle cerebral artery, MCA, the second segment of the middle cerebral artery) was noted to be occluded when evaluating the anterior circulation of large vessels, then a distal occlusion was considered. The M1 segment (the first segment of the middle cerebral artery) and intracranial carotid artery, ICA) were considered proximal occlusions (proximal-M1, proximal-ICA).

Our research group conducted quantitative and qualitative interviews with each patient by a questionnaire to determine the patient's regular PA level before the stroke.

When the patient could not answer because of aphasia, memory loss or any other stroke-related reasons, we interviewed the patient's close relatives. In this study, we used a standardized and validated questionnaire, the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)¹⁸, which recorded the PA of the patients during the week before admission. The participants were asked if the activity level of that week actually represented the activities of the previous several weeks. If not, the patients were excluded from the study. The IPAQ quantified the level of PA. The calculation of the total score of the questionnaire was defined as the sum of the daily cumulative time (in minutes) and frequency (days) of all activities with different intensities (low, medium, or intense) in four fields (work, transportation, housework, gardening, and leisure) that were performed in a week. The level of physical activity (MET-min/week) is expressed by the metabolic equivalent (MET).

According to the criteria recommended by the IPAQ working group, the patients were divided into three groups based on their pre-stroke PA levels. The details are as follows:

High PA was defined as meeting any one of the following two standards: (a) the total number of days that the patient engaged in various types of vigorous-intensity physical activity was ≥ 3 d/w, and the overall level of physical activity was ≥ 1500 MET-min/week; (b) the total number of days that the patient engaged in physical activity at three intensities was > 5 d/w, and the overall level of physical activity was ≥ 3000 MET-min/week.

Moderate PA was defined as meeting any one of the following three standards: (a) engaging in all kinds of vigorous physical activity for at least 20 min every day that totaled ≥ 3 d/w; (b) engaging in all kinds of moderate intensity and/or walking activities for at least 30 minutes every day that totaled ≥ 5

d/w; (c) the total number of days of that the patient engaged in physical activity at 3 intensities was ≥ 5 d/w, and the overall level of physical activity was ≥ 600 MET-min/week.

Low PA was defined as no activity had been reported, or if there was some activity, it was lower than 600 MET-min/week¹⁹.

We used the mRS to evaluate the functional results and the Barthel Index to evaluate the activities of daily living (ADL) results, and these data were obtained from in person interviews or communication tools.

Evaluation at admission

Within 48 hours after admission, an interview was conducted by a researcher (Yan Wu) who did not participate in the clinical treatment and was trained on how to conduct the clinical evaluation. The basic information and clinical information of the patients were recorded in the case report form.

Follow-up endpoint

The primary outcome was a good functional outcome defined as an mRS ≤ 2 after three months of stroke (90 days (within a window of ± 7 days) after entering the study). The secondary outcomes were the mRS score (Good defined as ≤ 2) two weeks after stroke (14 days and within a window of ± 1 day after the study entry) and the ADL I level (Good defined as a Barthel index score between 95 and 100) three months after admission (90 days within a window of ± 7 days after the study entry).

Statistical analysis

Data for continuous variables were reported as the mean \pm standard deviation (SD) or median (interquartile range, IQR), depending on whether the variables were normally distributed. Categorical variables are described as percentages. The χ^2 test was used to compare the categorical variables between the groups, and Student's t test or ANOVA (normal distribution variables) and the Kruskal–Wallis test (nonnormal distribution variables) were used to compare the continuous variables between the groups.

We used a multivariate logistic regression model to evaluate the correlation between the PA level before stroke and the functional outcome. In the logistic regression model, the pre-stroke PA was evaluated in two different ways as an independent variable: (1) as a categorical variable, it was compared with the high, moderate and low PA groups; (2) as a binary variable, we used the receiver operating curve (ROC) to determine the predictive value of the IPAQ score for predicting a good functional outcome in order to find the best cutoff point for the total IPAQ score for the prediction of a good functional outcome. The weekly exercise time corresponding to the IPAQ cutoff point can be calculated by IPAQ score / (days * METs assigned by different intensity activities). The cutoff point was used to divide the patients with different pre-stroke PA levels into two groups, high and low PA, and the differences between the two groups were compared. The results are expressed as the adjusted odds ratios (ORs) with corresponding 95% confidence intervals (95% CIs).

All statistical analyses were conducted using SPSS 20.0 for Windows (IBM Corp). A two-sided P value of < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Clinical characteristics of the population

During the trial, 945 patients with ischemic stroke were admitted to the researcher's hospital. Patients who did not meet the inclusion criteria were excluded: six patients whose PA in the last week before admission did not represent the patient's activity in the weeks prior to stroke and four patients who lacked reliable information on their previous physical activity. No patients were lost to follow-up. A total of 144 patients were finally included in this study (Fig. 1). Table 1 summarizes the baseline characteristics of the cohort and the three groups of patients with different PA levels, and this data included the patients' basic data and clinical information.

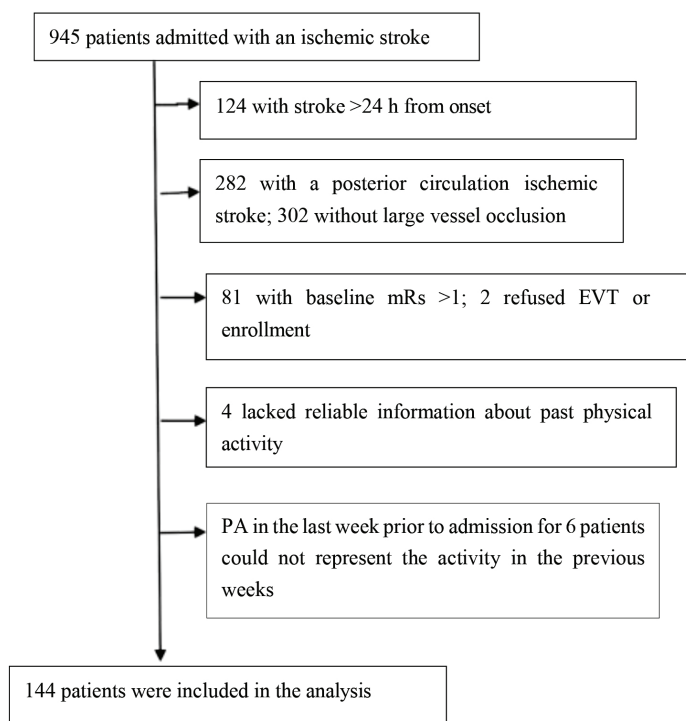


Fig. 1. Flow diagram of patients' selection for the study (PA= Physical activity. EVT= Endovascular thrombectomy; mRs = modified Rankin scale).

Table 1
Socio-demographic of the patient.

| Variables | Total population (n=144) | Low PA (n=35) | Moderate PA (n=65) | High PA (n=44) | P |
|------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|-------------------|-------|
| Sex (males) | 88(61.1%) | 17(48.6%) | 36(55.4%) | 35(79.5%) | 0.009 |
| Age, years | 69.6±11.3 | 69.3±13.0 | 71.0 ±10.3 | 67.9±11.3 | 0.375 |
| Education level | Primary school and below | 24(68.6%) | 43(66.2%) | 31(70.5%) | 0.972 |
| | Junior middle school | 32(22.2%) | 7(20.0%) | 16(24.6%) | |
| | Senior high school or above | 14(9.7%) | 4(11.4%) | 6(9.2%) | |
| Smoking habit | 45(31.2%) | 12(34.3%) | 13(20.0%) | 20(45.5%) | 0.017 |
| Alcohol abuse | 37(25.7%) | 5(14.3%) | 14(21.5%) | 18(40.9%) | 0.016 |
| BMI, kg/m ² | 23.4±3.5 | 23.7±4.1 | 23.1±3.5 | 23.5±2.9 | 0.389 |
| NIHSS at admission | 16 [13-20.75] | 17 [12.5-21.5] | 16 [12.25-21] | 16 [13-20] | 0.894 |

Notes: Data are expressed as n (%), mean ± standard deviation or the median [interquartile ranges].

Data on BMI were missing for four patients (1 in the low PA group, and 3 in the moderate PA group) Data on NIHSS at admission were missing for 4 patients (2 in the low PA group, 1 in the moderate PA group, and 1 in the high PA group).

The average age of the enrolled population was 69.6 ± 11.3 years old, 61.1% of the patients were male, and their average baseline NIHSS was 16 (quartile 13, 20.75). Cardiogenic stroke was the most common subtype of stroke (46.50%). The median total IPAQ score was 1680 MET-min/week (quartile range 661.5, 3659.25). According to the IPAQ grouping criteria, there were 44 (30.56%) patients with high PA levels, 65 (45.14%) patients with moderate levels, and 35 (24.31%) patients with low activity levels.

The differences between the groups (patients classified according to the PA levels before the stroke) are shown in Table 1 and Table 2. When the patients with high pre-stroke PA levels were compared with the patients with low and moderate PA levels, men were more active than women, and the proportion of patients with smoking and alcohol abuse was high before admission. The patients with high pre-stroke PA levels were more likely to have no history of hypertension or atrial fibrillation and had lower triglyceride levels at admission. The baseline NIHSS scores did not differ among the three groups of patients ($p = 0.894$).

Comparison of the primary neurological outcomes

Seventy patients (48.61%) showed good functional outcomes at three months (Table 3). The proportion of functionally-independent patients at three months was significantly higher in the patients with high PA levels (Table 3). The logistic regression analysis showed that high pre-stroke PA levels were independently associated with good functional outcomes (OR=3.19, 95% CI: 1.07-9.47, $p=0.037$, Table 4, Model A).

Model A: PA of the patients during the week before admission and Model B: High PA was defined as meeting any one of the following two standards: (a) the total number of days that the patient engaged in various types of vigorous-intensity physical activity was ≥ 3 d/w, and the overall

level of physical activity was ≥ 1500 MET-min/week; (b) the total number of days that the patient engaged in physical activity at three intensities was > 5 d/w, and the overall level of physical activity was ≥ 3000 MET-min/week.

Analysis of the ROC curve analysis showed that the total IPAQ cutoff point score of 3859.5 MET-min/week (the area under the curve is 0.688, 95% CI 0.586-0.789) has the highest predictive value of functional independence, with a sensitivity of 74.8% and a specificity of 68.8% ($p=0.001$). Regarding the ROC curve, it is necessary to mention that due to the sensitivity of 68.8% and specificity of 74.8%, and subsequently high false negative and false positive values (FN= 25.2%; FP: 21.84%), this test has limitations as a good indicator to distinguish PA groups (Fig. 2).

The logistic regression analysis showed that the pre-stroke high PA level group, which was above the cutoff point (IPAQ > 3859.5 MET-min/week), was also independently associated with good functional outcomes (OR = 3.3, 95% CI: 1.25-8.71, $p = 0.016$, Table 4, model B).

Comparison of the secondary neurological outcomes

Thirty-nine patients (27.08%) showed good functionality at two weeks (Table 3). The logistic regression analysis showed no correlation between a high pre-stroke PA and a good functional outcome at two weeks (Table 4, Models A and B). Regarding the Barthel index, 71 patients (49.30%) showed satisfactory activities in daily living at three months (Table 3). The proportion of patients with acceptable activities of daily living at three months was significantly higher in the patients with high levels of PA (Table 3). The logistic regression analysis showed that a high pre-stroke PA was correlated independently with good ADL ($p < 0.05$, Table 4, Models A and B). Pre-stroke PA is an independent predictor of good ADL.

Table 2
Characteristics of the patients at baseline.

| Variables | | Total population (n=144) | Low PA (n=35) | Moderate PA (n=65) | High PA (n=44) | p |
|--|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-------|
| Etiology of cerebral infarction | Atherosclerosis | 28(19.4%) | 7(20.0%) | 10(15.4%) | 11(25.0%) | 0.101 |
| | Cardiogenic | 67(46.5%) | 15(42.9%) | 38(58.5%) | 14(31.8%) | |
| | Undetermined | 49(34.0%) | 13(37.1%) | 17(26.2%) | 19(43.2%) | |
| Site of occlusion | Proximal-ICA | 53(36.8%) | 13(37.1%) | 20(30.8%) | 20(45.5%) | 0.6 |
| | Proximal-M1 | 77(53.5%) | 18(51.4%) | 39(60.0%) | 20(45.5%) | |
| | Distal-M2 | 14(9.7%) | 4(11.4%) | 6(9.2%) | 4(9.1%) | |
| Minutes from stroke onset to admission | | 260 [185.5-363] | 292 [169-402] | 239 [182-332] | 296 [213-403.75] | 0.116 |
| Reperfusion therapies | EVT alone | 102(70.8%) | 26(74.3%) | 44(67.7%) | 32(72.7%) | 0.745 |
| | Combined rt-PA and EVT | 42(29.2%) | 9(25.7%) | 21(32.3%) | 12(27.3%) | |
| On-going antiplatelet therapy | | 24(16.7%) | 9(25.7%) | 8(12.3%) | 7(15.9%) | 0.226 |
| On-going anticoagulant therapy | | 16(11.1%) | 5(14.3%) | 7(10.8%) | 4(9.1%) | 0.761 |
| Hypertension | | 96(66.7%) | 28(80.0%) | 46(70.8%) | 22(50.0%) | 0.012 |
| Diabetes | | 31(21.5%) | 10(28.6%) | 13(20.0%) | 8(18.2%) | 0.494 |
| Glucose, mmol/L | | 7.2 [6.4-8.5] | 7.7 [6.375-9.25] | 7.2 [6.4-7.99] | 6.985 [6.275-8.125] | 0.470 |
| Total cholesterol, mmol/L | | 3.69 [3.165-4.425] | 3.78 [3.25-4.4125] | 3.695 [3.1375-4.3025] | 3.59 [3.13-4.87] | 0.828 |
| HDL cholesterol, mmol/L | | 1.13 [0.925-1.245] | 1.045 [0.8975-1.18] | 1.14 [0.955-1.25] | 1.16 [0.93-1.25] | 0.140 |
| LDL cholesterol, mmol/L | | 1.97 [1.635-2.565] | 2.13 [1.7375-2.4825] | 1.99 [1.6325-2.5825] | 1.9 [1.56-2.93] | 0.902 |
| Triglyceride, mmol/L | | 1.31 [0.8-1.74] | 1.435 [1.1575-2.0525] | 1.365 [0.8-2.2175] | 1.01 [0.63-1.54] | 0.018 |
| Fibrinogen, g/L | | 2.57 [2.28-2.99] | 2.65 [2.45-3.09] | 2.45 [2.1425-2.99] | 2.595 [2.2875-2.94] | 0.269 |
| Atrial fibrillation | | 79(54.9%) | 20(57.1%) | 42(64.6%) | 17(38.6%) | 0.027 |
| CAD | | 15(10.4%) | 4(11.4%) | 6(9.2%) | 5(11.4%) | 0.915 |

Notes: Data are expressed as n (%), mean \pm standard deviation or the median [interquartile ranges].

Proximal-ICA= Proximal- intracranial carotid artery; Proximal-M1= Proximal- the first segment of middle cerebral artery; Distal-M2= Distal- the second segment of the middle cerebral artery; rt-PA = recombinant tissue plasminogen activator; EVT= Endovascular thrombectomy; HDL= High density lipoprotein; LDL=Low density lipoprotein; CAD= Coronary heart disease; PA= Physical activity.

Data on glucose was missing for 1 patient (in the low PA group)

Data on total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride were missing for 3 patients respectively (1 in the low PA group, 1 in the moderate PA group, and 1 in the high PA group), Data on fibrinogen was missing for 1 patient (in the moderate PA group).

Table 3

Comparison of primary and secondary neurological outcomes in different groups.

| Variables | Total population (n = 144) | Low PA (n = 35) | Moderate PA (n = 65) | High PA (n = 44) | P |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------|
| mRs(≤ 2) at 3 months | 70(48.61%) | 10(28.57%) | 31(47.69%) | 29(65.91%) | 0.004 |
| mRs(≤ 2) at 2 weeks | 39(27.08%) | 4(11.43%) | 18(27.69%) | 17(38.64%) | 0.026 |
| Barthel index (95~100) at 3 months | 71(49.30%) | 10(28.57%) | 30(46.15%) | 31(70.45%) | 0.001 |

Notes: Data are expressed as n (%); PA= Physical activity. mRs= modified Rankin scale

Table 4

Multivariate regression analyses of the association between pre-stroke physical activity level and outcome variables.

| Level of PA | mRs 0–2 at 3 months ^a Odds ratio | p-value | mRs ≤ 2 at 2 weeks ^a Odds ratio | p-value | Barthel Index of 95 or 100 at 3 months ^a | p |
|---|---|---------|---|---------|--|-------|
| Model A Low | 1.0 | 0.096 | 1.0 | 0.163 | 1.0 | 0.03 |
| Moderate | 2.34(0.89,6.15) | 0.086 | 3.18(0.92, 11.03) | 0.068 | 2.07(0.81, 5.28) | 0.13 |
| High | 3.19(1.07,9.47) | 0.037 | 3.12(0.84, 11.58) | 0.089 | 4.25(1.45,12.41) | 0.008 |
| Model B High PA group: IPAQ \geq cutoff point | 3.3(1.25, 8.71) | 0.016 | 1.91(0.77, 4.78) | 0.166 | 3.32 (1.29, 8.56) | 0.013 |

Notes:

In model A, the relationship between pre-stroke PA and prognosis in high, moderate and low level groups was compared.

In model B, the IPAQ cutoff point was 3859.5 MET-min/week.

Patients were divided into high level and low level PA groups with this cutoff point.

The relationship between these two groups and good functional outcomes was compared. PA= Physical activity; IPAQ= International Physical Activity Questionnaire. mRs= modified Rankin scale

^a Adjustment for sex, smoking, alcohol abuse, hypertension, atrial fibrillation and triglyceride levels.

DISCUSSION

This prospective study on patients with an acute anterior circulation large vessel occlusion shows that a high level of regular PA before stroke was significantly related to a good functional outcome and better activities of daily living after an EVT.

To the best of our knowledge, there is no report on the influence of the PA on the functional prognosis of stroke in patients who have received an EVT for a stroke caused by an anterior circulation occlusion.

For people who are relatively inactive, such as the elderly (who had an average age of 69 years old in this study), the necessity of physical activity in their daily life and work has been confirmed in this research. As a benefit for the patients themselves and society, PA before a stroke can play a neuro-protective role, which is helpful to improve significantly the outcome of a stroke, reduce the social burden and achieve a healthy and disability-free life.

As shown in Table 1, PA may play a dose-dependent role. The ROC curve indicated a

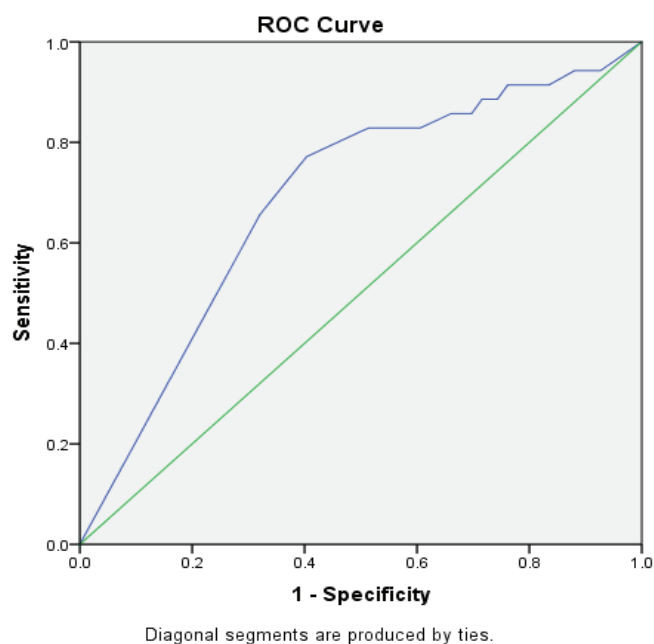


Fig 2. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis for predictive power of International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) score on functional outcome in stroke patients who were treated with EVT (= Endovascular thrombectomy). Area under curve (95%CI) = 0.688(0.586-0.789).

beneficial effect of PA before a stroke on the stroke outcome and that the cutoff point was 3,859.5 MET-min/week. The required PA level can be reached by walking for approximately three hours (180 minutes) every day for seven days or by intense physical activity (such as lifting heavy objects, digging, jogging or fast cycling) for approximately 69 minutes every day. Among the above activities, walking is common, convenient, and cheap. Walking requires the use of large skeletal muscles of the whole body, with almost no side effects; therefore, it is worthy of promotion.

Previous studies that evaluated patients who did not receive rt-PA and EVT^{20,21}, a study that did not mention thrombolysis²⁴, and other retrospective observational study that evaluated patients who received rt-PA²⁵, showed that pre-stroke PA could benefit patients with ischemic stroke in terms of its severity at admission, the final infarct area size reduction

and the prognosis. In contrast, other studies that evaluated patients with intravenous rt-PA thrombolytic therapy²⁶, or only conventional drug therapy²⁷, showed that PA had no significant effects on the stroke severity and functional outcome.

In this study, we found that there was no significant association between the physical activity level before stroke and the severity of the stroke. However, we found a significant association between the PA level before the stroke and obtaining a satisfactory functional outcome at three months, consistent with some of the abovementioned research results. The inconsistency of the results may be caused by the inclusion population and the research design. The patients in this study had a high degree of stroke (NIHSS score was 16 at admission), which was why they were willing to undergo EVT.

The operation itself may also affect the functional outcome. Another reason may

be that we used the IPAQ to evaluate PA. This questionnaire is currently recognized as an effective and worldwide used method for measuring the physical activity levels of adults. It has been used in Chinese population research and has excellent validity and reliability^{28,29}. The IPAQ involves asking about the patient's physical activities in various fields of daily life, so the estimated level of the patient's physical activity is higher than the other survey results (in some of above mentioned studies) that simply asked about the patient's physical activity that was undertaken in their leisure time^{25,26,30}. The IPAQ will not classify the patients with high-intensity professional sports activities and lack of leisure time for physical activities into the moderate or low PA group. In addition, compared with the effective drugs for treating stroke, the physical activity level is more likely to be only a surrogate marker of the patient's past health status³¹.

Our research has some limitations. First, we used a cohort study. The nature of this type of observational study makes us unable to determine the causality. There may also be residual confounding factors, such as the different surgical times and smoothing degrees for each patient, the degree of professional rehabilitation intervention during the postoperative recovery, and psychological factors, such as depression and anxiety symptoms that affect the patient's physical function and stroke prognosis. Second, because the patients entered the study based on their will and compliance with the inclusion criteria, researchers could not select the participants in a targeted way, which resulted in the inconsistency in some of the baseline data levels in the different groups of patients. However, we believe that these inconsistencies are due to the characteristics of the different level of PA groups and the results of the study. Third, the severities of the strokes in the patients enrolled in this study were high. For patients with severe disability and

aphasia, most of their PA levels before onset were determined by questioning their families. Moreover, we used self-reports for retrospective registration to assess the level of physical activity before stroke. All these may lead to bias in the results of pre-stroke activity.

In conclusion, this study confirms that regular PA before stroke is an independent predictor of a good functional outcome in patients with an anterior circulation stroke who receive EVT, and PA can play a protective role in the functional prognosis. In future research, we can expand the sample size to determine whether pre-stroke exercise plays a beneficial role in the stroke outcome.

Limitation

According to the cut off obtained from the ROC curve and the values of FN and FP, the test used had limitations for distinguishing groups, and it is necessary and important to pay attention to this point in future studies.

Funding

This research was supported by the Zhejiang Provincial Medical and Health Technology Project under Grant number 2020KY701.

Competing Interests

The authors declared that they have no competing interests.

Authors' Orcid Number

- Xiangbo Meng: 0000-0002-5329-8459
- Haiyan Ding: 0000-0002-6126-278X
- Congguo Yin: 0000-0002-8026-4174
- Wenqing Xia: 0000-0002-1373-3567
- Yan Wu: 0000-0002-2829-047
- Jianan Li: 0000-0003-3177-4335

Authors' Contribution

XM, CY, WX, and JL contributed to the conception of the study. XM, HD, and WX performed the experiment. YW contributed significantly to the analysis and manuscript preparation. XM, HD, CY and YW performed the data analyses and wrote the manuscript. JL helped perform the analysis with constructive discussions.

REFERENCES

1. Wu X, Du H. Research on the effect of mdt nursing pattern on the rehabilitation of oral feeding function of stroke patients with tracheotomy and dysphagia in icu. *Acta Medica Mediterr* 2022; 38: 2683-2689. https://doi.org/10.19193/0393-6384_2022_4_402.
2. Xu S, Dong X, Zhao M, Zhao C, Wu Y, Luo W, Yang Z. The evaluation value of videofluoroscopic swallowing study in dysphagia after stroke. *Acta Medica Mediterr* 2022; 38(3): 2187-2192. https://doi.org/10.19193/0393-6384_2022_3_334.
3. Raminda S, Astuti I, Rahayu UB. Effect of transcranial magnetic stimulation with rehabilitation program on motor function and ADL in upper extremity ischemic stroke: a randomized controlled trials. *J Med Chem Sci* 2021; 4(4): 308-315. <https://doi.org/10.26655/JMCHEMSCI.2021.4.1>.
4. Sun S, Sun X, Gao H, Zhu C. Comparison of risk factors between progressive ischemic stroke and non-progressive ischemic stroke. *Acta Medica Mediterr* 2022; 38: 2973-2978. https://doi.org/10.19193/0393-6384_2022_5_441.
5. Hu Y, Wang T, Han S, Zhan X, Feng Z, Du X, Wang C, Wu Y. Impact of anti-aspiration nursing intervention on clinical outcomes in elderly stroke patients with aspiration pneumonia. *Acta Medica Mediterr* 2022; 38: 2905-2910. https://doi.org/10.19193/0393-6384_2022_4_432.
6. Wang S, Bao N, Cao X, Zhou J, Jiang G, Wang L. The neuroprotective mechanism of microrna in ischemic stroke. *Acta Medica Mediterr* 2022; 38(3): 1601-1602. https://doi.org/10.19193/0393-6384_2022_3_242.
7. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2019; 50(12): e344-e418. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000211>.
8. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, Van Den Berg, LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn, PJ, Wermer MJH. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015; 372: 11-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411587>.
9. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DW, Mitchell PJ, Demchuk AM, Dávalos A, Majoie CB, van der Lugt A, De Miquel MA, Donnan GA. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 2016; 387(10029): 1723-1731. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00163-X).
10. Kramer SF, Hung SH, Brodtmann A. The impact of physical activity before and after stroke on stroke risk and recovery: a narrative review. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2019; 19(6): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11910-019-0949-4>.
11. Fors M, Enthoven P, Abbott A, Öberg B. Effects of pre-surgery physiotherapy on walking ability and lower extremity strength in patients with degenerative lumbar spine disorder: Secondary outcomes of the PREPARE randomised controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2019; 20(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12891-019-2850-3>.
12. Moran J, Guinan E, McCormick P, Larkin J, Mockler D, Hussey J, Moriarty J, Wilson F. The ability of prehabilitation to influence postoperative outcome after intra-abdominal operation: a systematic review and meta-analysis. *Surgery* 2016; 160(5): 1189-1201. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.05.014>.
13. Zhang F, Wu Y, Jia J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. *Neu-*

- rosience 2011; 177: 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.018>.
14. **Diep L, Kwagyan J, Kurantsin-Mills J, Weir R, Jayam-Trouth A.** Association of physical activity level and stroke outcomes in men and women: a meta-analysis. *J Women's Health* 2010; 19(10): 1815-1822. <https://doi.org/10.1089/jwh.2009.1708>.
 15. **Wang X, Zhang M, Yang SD, Li WB, Ren SQ, Zhang J, Zhang F.** Pre-ischemic treadmill training alleviates brain damage via GLT-1-mediated signal pathway after ischemic stroke in rats. *Neuroscience* 2014; 274: 393-402. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.053>.
 16. **Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schröck H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Bohm M, Dirnagl U.** Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res* 2006; 99(10): 1132-1140. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000250175.14861.77>.
 17. **Otsuka S, Sakakima H, Sumizono M, Takada S, Terashi T, Yoshida Y.** The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2016; 303: 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.049>.
 18. **Zhu L, Ye T, Tang Q, Wang Y, Wu X, Li H, Jiang Y.** Exercise preconditioning regulates the toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway and reduces cerebral ischemia/reperfusion inflammatory injury: a study in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2016; 25(11): 2770-2779. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.033>.
 19. **Naderi S, Alimohammadi R, Hakimizadeh E, Roohbakhsh A, Shamsizadeh A, Allahtavakoli M.** The effect of exercise preconditioning on stroke outcome in ovariectomized mice with permanent middle cerebral artery occlusion. *Can J Physiol Pharmacol* 2018; 96(3): 287-294. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0157>.
 20. **Lin C, Chang C, Chang C, Hsu Y, Lin M, Lin J.** Protecting against ischaemic stroke in rats by heat shock protein 20-mediated exercise. *Eur J Clin Invest* 2015; 45(12): 1297-1305. <https://doi.org/10.1111/eci.12551>.
 21. **Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, Fang MC, Fisher M, Furie KL, Heck DV, Johnston SC.** Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for health-care professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2014; 45(7): 2160-2236. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000024>.
 22. **McDonnell MN, Hillier SL, Hooker SP, Le A, Judd SE, Howard VJ.** Physical activity frequency and risk of incident stroke in a national US study of blacks and whites. *Stroke* 2013; 44(9): 2519-2524. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001538>.
 23. **Investigators WHOMPP.** The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988; 41(2): 105-114. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(88\)90084-4](https://doi.org/10.1016/0895-4356(88)90084-4).
 24. **Reinholdsson M, Palstam A, Sunnerhagen KS.** Pre-stroke physical activity could influence acute stroke severity (part of PAPSIGOT). *Neurology* 2018; 91(16): e1461-e1467. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006354>.
 25. **Urbanek C, Gokel V, Safer A, Becher H, Grau AJ, Buggele F, Palm F.** Low self-reported sports activity before stroke predicts poor one-year-functional outcome after first-ever ischemic stroke in a population-based stroke register. *BMC Neurol* 2018; 18(1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1189-y>.
 26. **Decourcelle A, Moulin S, Sibon I, Murao K, Ronzière T, Godefroy O, Poli M, Cordonnier C, Sagnier S, Lassalle V, Okada Y.** Influence of previous physical activity on the outcome of patients treated by thrombolytic therapy for stroke. *J Neurol* 2015; 262(11): 2513-2519. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7875-4>.
 27. **Morovatdar N, Di Napoli M, Stranges S, G. Thrift A, Kapral M, Behrouz R, Farzadfard MT, Sheikh Andalibi MS, Rahimzadeh Os-kooie R, Sawant A, Mokhber N, Azarpazhooh MR.** Regular physical activity post-

- pones age of occurrence of first-ever stroke and improves long-term outcomes. *Neurol Sci* 2021; 42(8): 3203-3210. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04903-7>.
28. **Deng HB, Macfarlane DJ, Thomas GN, Lao XQ, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH.** Reliability and validity of the IPAQ-Chinese: the Guangzhou Biobank Cohort study. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40(2): 303-307. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e31815b0db5>.
29. **Macfarlane DJ, Lee CCY, Ho EYK, Chan KL, Chan DTS.** Reliability and validity of the Chinese version of IPAQ (short, last 7 days). *J Sci Med Sport* 2007; 10(1): 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2006.05.003>.
30. **Deplanque D, Masse I, Libersa C, Leys D, Bordet R.** Previous leisure-time physical activity dose dependently decreases ischemic stroke severity. *Stroke Res Treat* 2012; 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/614925>.
31. **Stranahan AM, Zhou Y, Martin B, Maudsley S.** Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. *Curr Med Chem* 2009; 16(35): 4668-4678. <https://doi.org/10.2174/092986709789878292>.

Laparoscopic and Seldinger techniques for the treatment of concomitant gallstones and choledocholithiasis. A retrospective study

Ruijin Song¹, Li Feng², Xiang Li³, Xueyi Liu³, Bo Yang⁴, Ming Gong¹ and Tie Qiao⁵

¹Interventional Department, the People's Hospital of Pengzhou, Chengdu, China.

²Nutrition Department, the People's Hospital of Pengzhou, Chengdu, China.

³Hepatobiliary Surgery, Guangdong Tongji Hospital, Guangzhou, China.

⁴Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the People's Hospital of Pengzhou, Chengdu, China.

⁵General Surgery, the Second People's Hospital of Panyu Guangzhou, Guangzhou, China.

Keywords: minimally invasive cholelithotomy; cholelithiasis and choledocholithiasis; postoperative recovery.

Abstract. This study aimed to determine the efficacy and safety of a minimally invasive combined approach for concomitant stone clearance of cholelithiasis and choledocholithiasis. From November 2018 to March 2021, 30 patients were enrolled in this retrospective study that compared two methods of treating combined cholelithiasis and choledocholithiasis. The study comprised two groups: 15 patients in Group A underwent combined laparoscopic and Seldinger techniques for complete stone clearance, retaining the gall bladder in situ. In Group B, 15 patients underwent laparoscopic cholecystectomy and choledocholithotomy with T-tube drainage. The rates of successful completion of the operations, procedure-related complications, length of hospitalization, hospital cost, and patient satisfaction were compared between the two groups. The two groups had no differences in general patient characteristics, and all procedures were successfully completed. Compared to Group B, patients in Group A had a shorter operative time (84 vs. 105 min), less blood loss (10 vs. 28 mL), were less expensive, and had a shorter postoperative recovery. A single patient in group B developed bile leakage. The satisfaction rate was 93% in Group A, in contrast to 80% in Group B. The combined use of laparoscopic and Seldinger techniques to achieve complete stone removal in patients with concomitant cholelithiasis and choledocholithiasis was demonstrated to be safe and successful.

Técnicas laparoscópica y de Seldinger para el tratamiento de cálculos biliares y coledocolitiasis concomitantes. Un estudio retrospectivo.

Invest Clin 2023; 64 (2): 165 – 172

Palabras clave: coledocotomía mínimamente invasiva; colelitiasis y coledocolitiasis; recuperación postoperatoria.

Resumen. Este estudio tuvo como objetivo determinar la eficacia y la seguridad de un enfoque combinado mínimamente invasivo para la eliminación de cálculos de la vesícula biliar y del conducto colédoco. Desde noviembre de 2018 hasta marzo de 2021, treinta pacientes se inscribieron en este estudio retrospectivo que comparó dos métodos combinados de tratamiento de colelitiasis y coledocolitiasis. El estudio comprendió dos grupos: en el Grupo A 15 pacientes se sometieron a coledocotomía laparoscópica y a colecistostomía con la técnica de Seldinger para el tratamiento simultáneo de la litiasis de la vesícula biliar y coledociana, dejando la vesícula biliar in situ. En el grupo B, 15 pacientes se sometieron a colecistectomía y coledocotomía laparoscópica con drenaje del tubo T. Las tasas de conclusión exitosa de las operaciones, complicaciones relacionadas con el procedimiento, la duración de la hospitalización, el costo hospitalario y la satisfacción del paciente se compararon entre los dos grupos. No hubo diferencias en las características generales del paciente entre los dos grupos y todos los procedimientos se completaron con éxito. En comparación con el grupo B, los pacientes en el Grupo A tuvieron un tiempo operativo más corto (84 frente a 105 min), menos pérdida de sangre (10 frente a 28 mL), eran menos costosas y tenían una recuperación postoperatoria más corta. Un solo paciente en el Grupo B desarrolló fugas biliares. La tasa de satisfacción fue del 93% en el Grupo A en contraste con el 80% en el Grupo B. La técnica laparoscópica combinada con la colecistostomía de Seldinger para lograr la eliminación completa de cálculos en pacientes con cálculos de la vesícula biliar y del colédoco fue segura y exitosa.

Received: 11-11-2022 Accepted: 09-12-2022

INTRODUCTION

Cholelithiasis is a commonly encountered condition caused by several factors, such as metabolic abnormalities and unhealthy lifestyle habits ¹. The treatment of patients with combined cholelithiasis and choledocholithiasis is more complex. In recent years, multiple operative approaches have been undertaken to address both prob-

lems. These have included the combination of laparoscopic cholecystectomy (LC) with laparoscopic common bile duct exploration (LCBDE), endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), and LC plus transcystic exploration ²⁻⁴. There have been advantages and disadvantages to all these strategies. Similar to the classic open cholecystectomy and CBD (common bile duct) exploration, a T-tube has often been placed

during LCBDE to prevent postoperative bile leakage. An associated potential of damage to the CBD exists, and the postoperative management and inconveniences of the T-tube are well known. Transcystic stone removal can avoid the need for a T-tube and obviate the need and risk of postoperative ERCP for stone management.

Additional minimally invasive treatments are needed for patients with cholelithiasis combined with choledocholithiasis. In 2016, Pet *et al.*² reported the placement of an intraoperative endoscopic nasobiliary drainage (ENBD) tube in the common bile duct with primary closure of the CBD to prevent postoperative bile leakage. This was accomplished using Tri-scope (laparoscope, choledochoscope, and gastroscope) surgery, which appeared feasible, safe, and cost-effective.

In the present study, we treated patients with concomitant cholelithiasis and choledocholithiasis with a combination of laparoscopic and Seldinger technology. Management involved a guide wire, catheter, and balloon catheter placed into and through the gallbladder into the CBD to clear the stones. To provide a frame of reference, we compared the outcomes of the above patients with those treated with laparoscopic choledocholithotomy and T-tube drainage.

METHODS

Patients

Thirty patients (17 males, 13 females) with concomitant cholelithiasis and choledocholithiasis were enrolled from November 2018 to March 2021. These patients (age range, 24-80 years) were diagnosed using computed tomography (CT) and magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP). All patients underwent preoperative physical examination, including blood tests, to assess liver and kidney function, urine amylase, and coagulation parameters.

Inclusion criteria included: no previous surgical treatment of the hepatobiliary

system, duodenum, or stomach and preoperative confirmation of concomitant cholelithiasis and choledocholithiasis by MRCP. The gallstones were removed, leaving the intact gallbladder in Group A. The cholecystectomy was performed in Group B.

Exclusion criteria in all two groups: acute or suppurative inflammation of the hepatobiliary system; mental illness; the presence of pancreatic cancer, diabetes, or other relatively serious diseases; and the presence of severe lung or kidney problems.

Patients group

All patients signed informed consent. The approach of surgery was performed according to the principle of voluntary participation. This study was approved by the ethics committee of our hospital (registration No. ChiCTR2100047160).

Surgery techniques

Combined laparoscopic and Seldinger techniques

Group A. Under satisfactory general endotracheal anesthesia, a pneumoperitoneum was established through a standard umbilical incision, and two ports were placed⁵. A 2-3 cm incision was made 10 mm below the umbilical cord to establish pneumoperitoneum by injecting CO₂ and finding the gallbladder. The bottom of the gallbladder was sutured with a traction line, and the bottom of the gallbladder was filled with sterile gauze to protect the tissues around the gallbladder. With laparoscopic visualization, the gallbladder was elevated, and a 1-cm incision was performed. Bile was aspirated with steady fixation of the gallbladder, and the gallstones were completely removed using a rigid choledochoscope. An 8.5-F Dawson-Mueller drainage catheter was then inserted into the gallbladder lumen under the guidance of fluoroscopy. Stone removal was performed after the alleviation of cholecystitis or cholangitis at a mean of 4.5 days after cholecystostomy. The drainage catheter was then exchanged over a 0.035-inch super-stiff

guide wire to an 8-F sheath. A 5F catheter (40 cm long) was introduced through the sheath, and a 0.035-inch hydrophilic guide wire was used to navigate the cystic duct. After crossing the cystic duct, the guide wire was further inserted down the common bile duct (CBD) through the papilla of Vater into the duodenum. The size, location, and number of stones in the common bile duct were determined by choledochography using iodixanol. A stone extractor was used to remove the gallbladder directly for smaller stones. For larger stones, a biopsy forceps was used for crushing the stones before removing them. According to the size of the stones and the common bile duct dilatation, a suitable balloon catheter was used to expand the duodenal papilla. The stone could be pushed through the papilla into the duodenum using a stiff guide wire. Intraoperative choledochography was performed again to verify there were no residual stones and patency of the common bile duct. After withdrawing the guide wire and catheter, the gallbladder incision was sutured, and the abdomen was closed. The sheath was finally exchanged with an 8.5-F Dawson-Mueller drainage catheter in the gallbladder to allow drainage and prevent complications.

In group A, the gallbladder was normal in size, without structural abnormality, and its wall was smooth without thickening. The stones can move within the capsule, and it is better if they are large and few.

Laparoscopic choledocholithotomy and T-tube drainage

Group B. Under satisfactory general endotracheal anesthesia, a pneumoperitoneum was established through a standard umbilical incision, and a four-port technique was performed^{6,7}. The gallbladder was dissected, and the cystic and common bile ducts were visualized and safely dissected. The cystic duct was ligated with No.7 silk, and the common bile duct was opened using hook electrocautery at the point where the cystic duct joins the common bile duct. The stones were

removed using previous choledochoscopic irrigation. If necessary, the operation was converted to a laparotomy, and the CBD stones were retrieved with choledocholithotomy forceps through the infra xiphoid incision. At the completion of the choledochoscopic exploration, a T-tube was placed in the common bile duct, which was closed with a 3-0 absorbable suture, and the gallbladder was then removed. The gallbladder bed drainage tube and T-tube exited through laparoscopic portholes. On postoperative day 2 or 3, the drainage tube was removed if the drainage was satisfactory. One month postoperatively, after satisfactory T-tube cholangiography, the T-tube was removed.

In group B, the gallbladder structure was abnormal, and the cyst wall was thickened. The contraction function of the gallbladder was lost.

Operative and postoperative comparison parameters

Comparison parameters for the two groups included operative success rate, operative time and blood loss, postoperative fasting time and complications, total hospitalization time and expenses, and patient satisfaction.

All patients were contacted postoperatively either by telephone or WeChat as well as the scheduled one-month follow-up visit. All 30 patients were successfully followed.

Statistical analysis

The SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software was used to analyze the data. Measurement data were analyzed by the Student's *t*-test, and categorical data were analyzed by the Chi-square test or Fisher's exact test. Statistical significance was defined by $p < 0.05$.

RESULTS

General characteristics

The general characteristics of the patients in both groups are shown in Table 1.

Table 1
General characteristics of the two groups.

| Characteristics | Group A | Group B | p |
|----------------------------------|---------------|---------------|-------|
| Age (years) | 60.67±12.06 | 56.07±16.54 | 0.391 |
| Female | 7 | 6 | |
| Male | 8 | 9 | |
| Aspartate aminotransferase (U/L) | 256.67±342.23 | 167.27±136.87 | 0.356 |
| Alanine aminotransferase (U/L) | 201.07±214.38 | 199.07±152.87 | 0.977 |
| Glutamyl transpeptidase (U/L) | 449.73±314.36 | 456.33±456.85 | 0.964 |
| Globulin ratio | 1.46±0.46 | 1.44±0.47 | 0.907 |
| Direct bilirubin (umol/L) | 39.85±28.07 | 33.80±30.94 | 0.579 |
| Uric acid (umol/L) | 275.67±98.13 | 299.27±91.68 | 0.502 |
| Creatinine (umol/L) | 64.80±14.10 | 72.80±20.58 | 0.225 |

The differences in data between groups were analyzed by the Student's *t*-test.

There were no significant differences with respect to age, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glutamyl transpeptidase (GGT), globulin ratio, direct bilirubin, uric acid, or creatinine.

Postoperative complications

The patients in both groups underwent successful operations. Postoperative complications are detailed in Table 2. In group A, one patient had elevated amylase and hematuria on the day of the operation but recovered to normal with fasting and treatment with somatostatin for two days. In group B, one patient developed bile leakage after removing the drainage tube three days postoperatively. The remaining group B patients were discharged with T-tubes from five to seven days postoperatively.

Outcomes of procedures

The outcome parameters of operative time, blood loss, postoperative times of fasting and hospitalization, and expenses are tabulated in Table 3. Group A patient outcomes were significantly better than Group B with regard to operative time, blood loss, fasting, and hospitalization times ($p < 0.01$). The two groups had no significant difference in average hospitalization expenses ($p = 0.745$).

Clinical follow-up

Longer-term follow-up results are shown in Table 4. The time needed to return to work in Group A was significantly shorter than in group B ($p < 0.001$). Except for a single patient with incisional discomfort in Group A and one case of upper abdominal discomfort in Group B, no other problems were encountered at the 1-month follow-up. Patient satisfaction rates of group A and B were 93% (14/15) and 80% (12/15), respectively. In group B, three patients noted that the time interval the T-tube remained in place was too long, which greatly impacted their daily life.

DISCUSSION

The development of minimally invasive surgery has provided various options for treating concomitant cholelithiasis and choledocholithiasis. The laparoscopic approach, enhanced with choledochoscopy and duodenoscopy to perform common bile duct exploration and lithotomy, has been recognized as unique minimally invasive biliary surgery technology^{8,9}. With the development of multi-disciplinary consultation and joint treatment of diseases, disciplines previously working independently have been united, minimizing iatrogenic injury and improving work efficiency.

Table 2

Postoperative complications in the two groups.

| Postoperative complications | Group A | Group B | p |
|----------------------------------|---------|---------|-------|
| Bile leakage | 0 | 1 | 1.000 |
| Residual stone | 0 | 0 | |
| Postoperative acute pancreatitis | 0 | 0 | |

The difference in data between groups was analyzed by the Chi-square test.

Extending these advanced combined technologies, laparoscopy combined with the Seldinger techniques described for stone clearance when cholelithiasis is complicated with choledocholithiasis offers advantages of minimal tissue trauma, quicker recovery, and preservation of sphincter of Oddi's anatomy and function. The present study data would also indicate this technique provides extraordinary patient satisfaction.

With the increasing demand by patients to maximize quality of life, increasing attention has been paid to gallbladder preservation^{10,11}. Although the long-term assessment

of this approach has yet to be fully reviewed, combining laparoscopic and Seldinger techniques to clear the gallbladder and CBD of stones while preserving the gall bladder in situ and avoiding the need for a T-tube pays attention to the restoration of normal anatomy and function. Moreover, if gallstones recur, the minimal tissue trauma of this operation should pose minimal scarring or other issues if reoperation is needed.

However, this study has limitations. The overall patient numbers were relatively small, and the follow-up was limited to the early postoperative period (one month). Additionally, advanced laparoscopic skills are required, and longer follow-ups with larger patient series are necessary for the validation of the present findings.

As a conclusion, combined laparoscopic and Seldinger techniques to clear stones in patients with concomitant cholelithiasis and choledocholithiasis, with preservation of the gallbladder in situ, has the advantages of minimal tissue trauma, quick recovery, avoidance of a T-tube, high patient satisfaction, and restoration of normal anatomy and function.

Table 3

Outcomes of procedures in the two groups.

| Outcomes of procedures | Group A | Group B | p |
|--------------------------------|------------------|----------------|-------|
| Blood loss (mL) | 9.95±2.45 | 27.55±7.57 | 0.000 |
| Operation time (min) | 84.20±16.84 | 105.75±14.80 | 0.001 |
| Fasting time (h) | 24.15±11.21 | 43.65±11.55 | 0.000 |
| Hospitalization time (d) | 4.27±1.03 | 10.20±1.52 | 0.000 |
| Hospitalization expenses (CnY) | 16108.93±1366.11 | 16430.0±3516.5 | 0.745 |

The difference in data between groups was analyzed by the Student's *t*-test.

Table 4

The follow-up results in the two groups.

| Follow-up results | Group A | Group B | p |
|--------------------------------------|--------------|------------|-------|
| Time return to work (d) | 3.67±0.82 | 32.87±1.19 | 0.000 |
| Number of people with discomfort (n) | 1 | 1 | |
| Satisfaction rate (%) | 93.3%(14/15) | 80%(12/15) | 0.598 |

The difference in "time return to work" between groups was analyzed by the Student's *t*-test. The difference in "satisfaction rate" between groups was analyzed by the Chi-square test.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to EditSprings.com (<https://www.editsprings.cn/>) for the expert linguistic services provided.

Funding

No.

Conflict of interests

All authors declare there are no conflicts of interest.

Author's ORCID numbers

- Ruijin Song: 0000-0002-1111-9360
- Li Feng: 0000-0002-9233-4088
- Xiang Li: 0000-0001-7378-1846
- Xueyi Liu: 0000-0002-7167-0234
- Bo Yang: 0000-0002-4625-4706
- Ming Gong: 0000-0002-2064-3623
- Tie Qiao: 0000-0002-1294-0759

Author contributions

SJ and FL analyzed and interpreted the patients' data. SJ, LX, QT, GM and YB performed the surgery. SJ and QT were major contributors to writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Availability of data and materials

The datasets during the current study could be available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

1. Jiang X, Yang G, Wang K, Bi W, Shang D, Zhang G. Clinical efficacy analysis of the combination of the laparoscope and preoperative or intraoperative duodenoscopy in the treatment of cholecystolithiasis with choledocholithiasis: A retrospective study. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2019; 29(12):1539-1543. doi: 10.1089/lap.2019.0541.
2. Yin P, Wang M, Qin R, Zhang J, Xiao G, Yu H, Ding Z, Yu Y. Intraoperative endoscopic nasobiliary drainage over primary closure of the common bile duct for choledocholithiasis combined with cholecystolithiasis: a cohort study of 211 cases. *Surg Endosc* 2017; 31(8):3219-3226. doi: 10.1007/s00464-016-5348-1.
3. Lou SM, Zhang M, Wu ZR, Jiang GX, Shen H, Dai Y, Liang YL, Cao LP, Ding GP. Combined gastroscopic and choledochoscopic transabdominal nasobiliary drainage. *J Zhejiang Univ Sci B* 2019; 20(11):940-944. doi: 10.1631/jzus.B1900060.
4. Ricci C, Pagano N, Taffurelli G, Pacilio CA, Migliori M, Bazzoli F, Casadei R, Minni F. Comparison of efficacy and safety of 4 combinations of laparoscopic and intraoperative techniques for management of gallstone disease with biliary duct calculi: A systematic review and network meta-analysis. *JAMA Surg* 2018; 153(7):e181167. doi: 10.1001/jamasurg.2018.1167.
5. Sun DP, Wang WC, Wen KC, Lin KY, Lin YF, Wen KS, Uen YH. Two-port laparoscopic common bile duct exploration with T-tube choledochostomy for management of choledocholithiasis: an initial clinical report. *Am Surg* 2011; 77(4):422-425. doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2011.035.
6. Choi WK, Kim JK, Yang JB, Ko YB, Nam SL, Lee KH. Two-port access versus four-port access laparoscopic ovarian cystectomy. *Obstet Gynecol Sci* 2014; 57(5):379-385. doi: 10.5468/ogs.2014.57.5.379.
7. Sulu B, Allahverdi TD, Altun H, Koksall N. The comparison of four-port, two-port without suspension suture and single port laparoscopic cholecystectomy results. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25(1):101-109. doi: 10.17219/acem/26237.
8. Zhang Z, Liu Z, Liu L, Song M, Zhang C, Yu H, Wan B, Zhu M, Liu Z, Deng H, Yuan H, Yang H, Wei W, Zhao Y. Strategies of minimally invasive treatment for intrahepatic and extrahepatic bile duct stones. *Front Med* 2017; 11(4):576-589. doi: 10.1007/s11684-017-0536-5.

9. **Lv F, Zhang S, Ji M, Wang Y, Li P, Han W.** Single-stage management with combined tri-endoscopic approach for concomitant cholecystolithiasis and choledocholithiasis. *Surg Endosc* 2016; 30(12):5615-5620. doi: 10.1007/s00464-016-4918-6.
10. **Qu Q, Chen W, Liu X, Wang W, Hong T, Liu W, He X.** Role of gallbladder-preserving surgery in the treatment of gallstone diseases in young and middle-aged patients in China: results of a 10-year prospective study. *Surgery* 2020; 167(2):283-289. doi: 10.1016/j.surg.2019.09.001.
11. **Carrilho-Ribeiro L, Serra D, Pinto-Correia A, Velosa J, De Moura MC.** Quality of life after cholecystectomy and after successful lithotripsy for gallbladder stones: a matched-pairs comparison. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14(7):741-744. doi: 10.1097/00042737-200207000-00005.

The sonographic features of preoperative ultrasonography of metastatic tumors of thyroid cancer confirmed by surgical pathology.

Lingling Ruan¹, Qingxin Zhang² and Qinghong Qu

¹Department of Ultrasound Imaging, The First People's Hospital of Wenling, Wenling, Zhejiang, China.

²Department of Critical Medicine, The First People's Hospital of Wenling, Wenling, Zhejiang, China.

Keywords: surgical pathology; thyroid cancer; metastatic lesions; ultrasonography; sonographic features.

Abstract. This study aimed to analyze the sonographic features of metastatic tumors in patients with thyroid cancer that underwent preoperative ultrasonography. One hundred and three thyroid cancer patients whose metastases were confirmed by surgical pathology in The First People's Hospital of Wenling from January 2020 to December 2021 were enrolled. All patients received preoperative ultrasound examinations, and the sonographic features were analyzed. Ultrasound examination showed 83.50% of cervical lymph node metastasis (CLNM), 24.27% of soft tissue invasion (STI), 3.88% of distant organ metastasis (DOM), 8.74% of CLNM + STI, 0.97% of CLNM + DOM, and 0.97% of CLNM + STI+DOM. Unilateral CLNM accounted for 72.09%, while bilateral CLNM accounted for 27.91%. The mean long diameter of metastatic lymph nodes was (1.83 ± 0.63) cm, and the mean short diameter was (1.03 ± 0.42) cm. Metastases to zone II, III, IV, V, VI, and VII accounted for 8.14%, 48.84%, 23.26%, 4.65%, 11.63%, and 3.49%, respectively. The L/T ratio of lymph nodes in 65 cases was lower than 2; 45 of 70 solid metastases exhibited solid hyperechoic, 15 multifocal hyperechoic, seven unifocal hyperechoic, and three diffusely distributed solid hyperechoic images. There were 25 patients with STI that experienced invasion of the thyroid capsule, ten patients experienced the invasion of the cervical fatty muscles, two patients had invasion of the trachea, and one patient had invasion of the thyroid cartilage. Of the four patients with DOM, one had parotid metastasis, one had submandibular metastasis, one had axillary metastasis, and one had uterine metastasis. The most common metastatic sites of thyroid cancer are cervical lymph nodes. However, there were also metastases in the soft tissues and distant organs. The ultrasonography exhibited typical sonographic features. An adequate familiarity with these sonographic features can aid in detecting suspicious metastases in time, which is crucial to the clinical diagnosis, treatment, and prognostic assessment.

Características ecográficas de la ultrasonografía preoperatoria de tumores metastásicos de cáncer de tiroides confirmados por patología quirúrgica.

Invest Clin 2023; 64 (2): 173 – 183

Palabras clave: patología quirúrgica; cáncer de tiroides; lesiones metastásicas; ultrasonografía; Características ecográficas.

Resumen. Este estudio tuvo como objetivo analizar las características ecográficas de tumores metastásicos en pacientes con cáncer de tiroides que se sometieron a una ultrasonografía preoperatoria. Se inscribieron 103 pacientes con cáncer de tiroides cuyas metástasis fueron confirmadas por patología quirúrgica en el primer Hospital Popular de Wenling desde enero de 2020 hasta diciembre de 2021. Todos los pacientes recibieron un examen de ultrasonido preoperatorio y se analizaron sus características ecográficas. El examen de ultrasonido mostró 83,50% de metástasis de ganglios linfáticos cervicales (CLNM), 24,27% de invasión de tejidos blandos (ITS), 3,88% de metástasis de órganos distantes (DOM), 8,74% de CLNM + ITS, 0,97% de CLNM + DOM y 0,97% de CLNM + STI + DOM. La CLNM unilateral representó un 72,09%, mientras que la CLNM bilateral representó el 27,91%. El diámetro largo medio de los ganglios linfáticos metastásicos fue $1,83 \pm 0,63$ cm, y el diámetro corto medio fue $1,03 \pm 0,42$ cm. La metástasis a las Zonas II, III, IV, V, VI y VII representan 8,14%, 48,84%, 23,26%, 4,65%, 11,63% y 3,49%, respectivamente. La relación L/T del ganglio linfático en 65 casos fue inferior a 2. Cuarenta y cinco de 70 metástasis sólidas exhibieron hiperecoico sólido, 15 hiperecoico multifocal, 7 hiperecoico unifocal y 3 hiperecoico sólido distribuido difusamente. Hubo 25 pacientes con ITS experimentados por invasión de la cápsula tiroidea, 10 pacientes experimentaron invasión de los músculos grasos cervicales, 2 pacientes con invasión de la tráquea y 1 paciente con invasión del cartílago tiroideo. De los 4 pacientes con DOM, 1 tenía metástasis parótidas, 1 tenía metástasis submandibulares, 1 tenía metástasis axilares y 1 tenía metástasis uterina. Los sitios metastásicos más comunes de cáncer de tiroides son los ganglios linfáticos cervicales. También hay metástasis en los tejidos blandos y los órganos distantes. La ultrasonografía exhibió características ecográficas típicas. La familiaridad adecuada con las características ecográficas puede ayudar a detectar metástasis sospechosas a tiempo, lo cual es clave para el diagnóstico clínico, el tratamiento y la evaluación pronóstica.

Received: 11-11-2022 Accepted: 28-12-2022

INTRODUCTION

The thyroid is a vital hormone gland that critically impacts the body's metabolism. Thyroid cancer refers to malignant tumors originating from the thyroid¹. Regar-

ding pathological types, papillary thyroid carcinoma has the highest incidence and a higher degree of differentiation than other types. However, it is less malignant, resulting in a relatively better prognosis. Patients can survive longer, while local and distant

metastases primarily invade the lymph nodes². Evidence on metastasis of papillary thyroid carcinoma found that the incidence of CLNM surpassed 80%³. Another study found that more than 60% of patients with medullary thyroid carcinoma already have lymph node metastases in the neck when receiving surgery. In comparison, about 80% of undifferentiated thyroid carcinomas will induce lymph node metastases⁴.

Since thyroid cancer does not present specifically in its early stage, most patients see a doctor due to neck lumps and palpable nodules. Some patients even have swellings that have been present for years upon consultation^{5,6}. Once local invasion or distant metastases occurs, the probability of postoperative recurrence is significantly higher, severely increasing the risk of patient death⁷. Metastasis of thyroid cancer is widely recognized as an independent factor affecting prognosis⁸. Thus, early clinical detection of metastases in patients with thyroid cancer can guide physicians to formulate a comprehensive treatment plan and determine the efficacy as well as patient prognosis by observing the metastatic lesions.

Ultrasound, as the most common imaging method, has shown good value in clinical applications with simple operation and accurate results. As diagnosis and treatment technologies advance, the performance of ultrasound instruments is gradually improved, and high-frequency ultrasound can not only show the internal structure of the lesion but also visualize the blood flow of the lesion site, which can guide the clinical judgment of the nature of the lesion^{9,10}. Most studies have explored ultrasound's role in examining thyroid cancer^{11,12}. However, there is a lack of research on its effectiveness in the diagnosis of metastatic thyroid cancer. This study was conducted to investigate the value of the preoperative implementation of ultrasound in 103 patients with pathologically confirmed metastatic thyroid cancer.

MATERIALS AND METHODS

Baseline data

One hundred and three thyroid cancer patients whose metastases were confirmed by surgical pathology in The First People's Hospital of Wenling from January 2020 to December 2021 were enrolled, including 45 males and 58 females, with patient ages ranging from 22 to 71 years, with an average age of 51.16 ± 10.38 years. All patients had pathologically confirmed metastasis after surgery and underwent preoperative ultrasonography. All patients were aware of the study procedures and voluntarily signed the study consent form. This study got ethical approval from our hospital.

Methods

SONOLINE, a color Doppler ultrasound diagnostic instrument (Type: MylabClassC), was used for examination with a probe frequency set from 7.0 to 12.0 MHz. During the examination, the patient lay in a supine position with the head slightly tilted back, and the shoulder and neck were elevated with soft pillows to ensure complete exposure of the examined area. The parameter settings of the color Doppler diagnostic instrument were tuned, and the patient's position was adjusted to ensure the most satisfactory ultrasound images. For patients diagnosed with metastatic thyroid cancer on ultrasonography, the type and location of the metastasis were recorded, and its characteristics, such as long and short diameters, morphology, borders, fusion, internal echogenicity, calcification, cystic changes, and blood flow signals were recorded. Metastases were typed according to the metastatic patterns, including Type I: CLNM, Type II: STI, and Type III: DOM. The subdivision of the lymph nodes was completed according to the neck dissection classification^{13,14} (Fig. 1) and endorsed by the relevant organizations and committees. If there were metastatic lymph nodes in a zone that were present for more than one month, the largest of these lymph nodes was examined.



Fig. 1. Image of levels and sublevels of the neck (Modified image from Robbins *et al.*¹⁴).

Outcome Measurements

The metastases of 103 patients with thyroid cancer were analyzed. The ultrasound features of metastatic lymph nodes, including location, number, size, morphology, and internal echogenicity, were analyzed. The ultrasound features of soft tissue invasion and distant organ metastases were also analyzed.

Statistical Methods

All data were analyzed using SPSS 23.0. Count data [n (%)] were tested by χ^2 .

ANOVA with post hoc F test was performed for multi-point comparisons. Measurement data were indicated by mean \pm standard deviations, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Overall thyroid cancer metastasis

Among the 103 patients with thyroid cancer, there were 86 cases (83.50%) of CLNM, 25 cases (24.27%) of STI, and 4 cases (3.88%) of DOM revealed by preoperative ultrasonography. There were nine patients with CLNM and STI, accounting for 8.74%, and one patient presented with CLNM and DOM, accounting for 0.97%. Some of the ultrasound findings are shown in Fig. 2 and Fig. 3.

The ultrasound features of CLNM

Preoperative ultrasonography showed 86 patients with CLNM, of which 62 cases were unilateral CLNM, accounting for 72.09%, and 24 cases were bilateral CLNM, accounting for 27.91%. The long diameter of metastatic lymph nodes in these 86 patients ranged from 0.6-2.9 cm, with a mean long diameter of 1.83 ± 0.63 cm, and short diameter ranged from 0.3-1.7 cm, with a mean short diameter of 1.03 ± 0.42 cm.

In terms of location, there were seven cases in zone II, accounting for 8.14%; 42 cases in zone III, accounting for 48.84%; 20 cases in zone IV, accounting for 23.26%; four cases in zone V, accounting for 4.65%; 10 cases in zone VI, accounting for 11.63%; three cases in zone VII, accounting for 3.49%, and no metastasis in zone I. Morphologically, 65 of the 86 patients with CLNM had a lymph node L/T ratio < 2 and showed a round-like or round shape.

Regarding internal echogenicity, 66 cases of CLNM showed no medullary manifestations. Punctate hyperechogenicity could be observed within the lymph nodes in 43 patients, and the pathological examination showed microcalcified colloid. Coarse calcification could be observed within the lymph nodes in three patients, and the metastatic lymph nodes in six patients with pathologically confirmed papillary thyroid cancer showed internal cystic necrosis with partial or complete cystic changes.

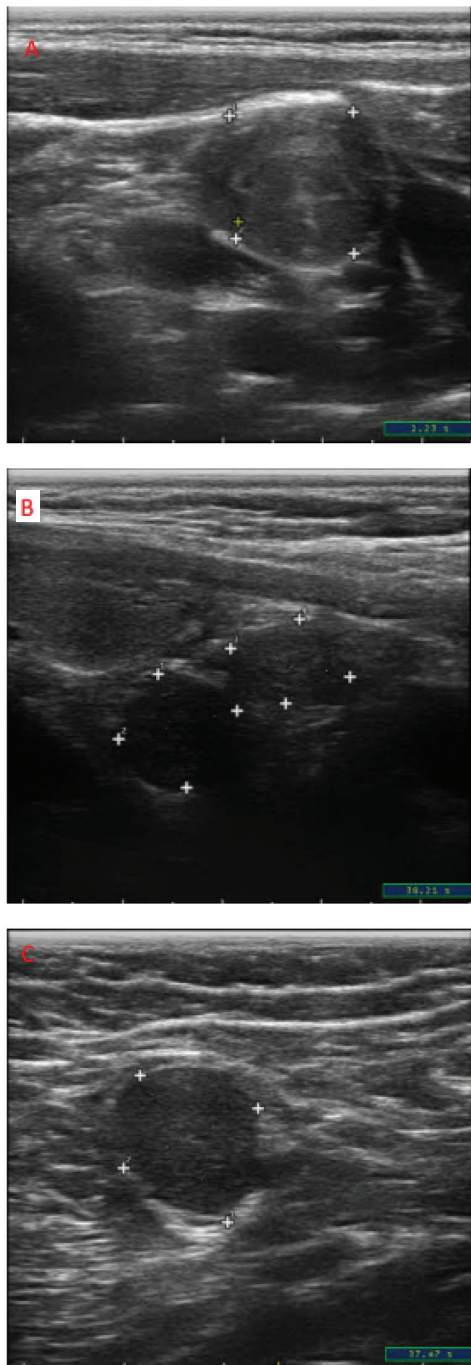


Fig. 2. Morphology of thyroid metastases. (A) shows an enlarged lymph node in the right cervical region III, partly with intense echogenicity, clear borders, full shape, indistinct corticomedullary demarcation, and absence of the lymphatic hilum; (B) shows an enlarged lymph node in the right cervical region VI; (C) shows the right axillary metastasis.

The sonograms of metastatic lymph node cystic changes showed mostly heterogeneous thickness separation, some with wall nodules or with punctate hyperechogenicity, and larger wall nodules showed the presence of blood flow signal within them. Seventy cases developed solid metastases, including 45 cases of solid hypoechogenicity, 15 cases of multifocal hyperechogenicity, seven cases of unifocal hyperechogenicity, and three cases of diffusely distributed solid hyperechogenicity (Table 1).

Ultrasound features of soft tissue invasion

Cervical soft tissue invasion occurred in 25 cases, manifesting as the invasion of the thyroid peritoneum in all patients, invasion of the fatty muscles in 10 patients, invasion of the trachea in two cases, and invasion of the thyroid cartilage in one case. Ultrasonography showed capsule disruption, no clear line of demarcation between the primary lesion and the soft tissues, heterogeneous echogenicity, and calcification (Table 2). Some of the ultrasound findings are shown in Fig. 4.

Ultrasound features of distant organ metastases

Distant organ metastases occurred in four cases, including one case, with uterine metastasis, in which the ultrasonography showed a solid mass with septa. One case presented with parotid metastasis and showed as a solitary and solid hypoechoic nodule in the parotid gland with clear borders, sharp margins, and posterior acoustic enhancement, very close to mixed tumors of the salivary gland. One case presented with axillary metastasis, and ultrasonography showed axillary lymph nodes with a L/T ratio of <2 and no medullary type. Finally, one case presented metastasis in the submandibular gland, and ultrasonography showed a solid, hypoechoic nodule with coarse margins (Table 3). Some of the ultrasound findings are shown in Fig. 5.

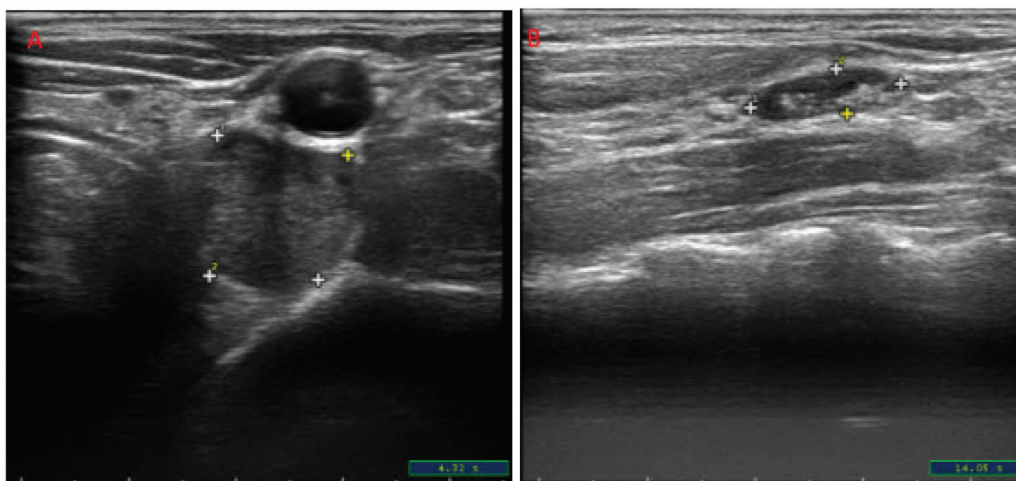


Fig. 3. Internal echo image of the thyroid gland. (A) shows an enlarged lymph node in the right cervical region IV; (B) shows a left cervical enlarged lymph node with clear borders, indistinct corticomedullary demarcation, and multiple intense echogenic foci.

Table 1

The ultrasound features of cervical lymph node metastasis from thyroid cancer

| Ultrasound features and manifestations | | Number of cases/results | % | P |
|--|------------------------|-------------------------|-------|-------|
| L/T ratio <2 | | 65 | 75.58 | / |
| Loss of cortical medulla | | 66 | 76.74 | / |
| Cystic changes | | 6 | 6.98 | / |
| Mean length diameter of metastatic lymph nodes | | 1.83±0.63 | / | / |
| Mean short diameter of metastatic lymph nodes | | 1.03±0.42 | / | / |
| The side | Unilateral metastases | 62 | 72.09 | <0.01 |
| | Bilateral metastases | 24 | 29.91 | |
| Calcification | Microcalcification | 43 | 50.00 | <0.01 |
| | Coarse calcification | 3 | 3.49 | |
| Solid metastases | Diffuse hyperechoic | 3 | 3.49 | <0.05 |
| | Unifocal hyperechoic | 7 | 8.14 | |
| | Multifocal hyperechoic | 15 | 17.44 | |
| | Solid hypoechoic | 45 | 52.33 | |
| Location of lymph node metastases | Zone I | 0 | 0.00 | <0.05 |
| | Zone II | 7 | 8.14 | |
| | Zone III | 42 | 48.84 | |
| | Zone IV | 20 | 23.26 | |
| | Zone V | 4 | 4.65 | |
| | Zone VI | 10 | 11.63 | |
| | Zone VII | 3 | 3.49 | |

Note: The parametric test was used, including the t-test and the analysis of variance (ANOVA, namely the F test).

Table 2
The ultrasound features of soft tissue invasion

| Ultrasound sonographic features | Number of cases | % |
|-----------------------------------|-----------------|--------|
| Invasion of the thyroid capsule | 25 | 100.00 |
| Invasion of the fatty muscles | 10 | 40.00 |
| Invasion of trachea | 2 | 8.00 |
| Invasion of the thyroid cartilage | 1 | 4.00 |

Note: χ^2 test was used.

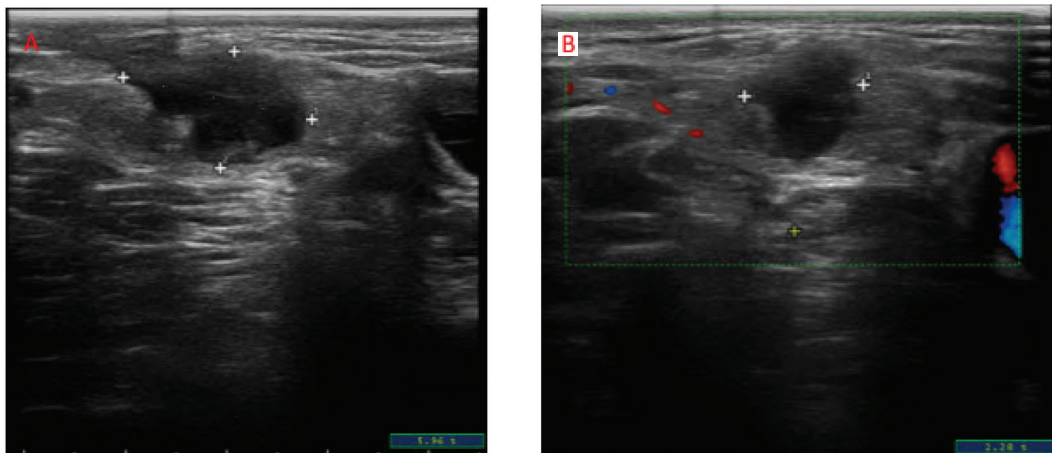


Fig. 4. Cervical soft tissue invasion. The hypoechoic mass in the subcutaneous soft tissue of the left neck has a clear border, irregular shape, and uneven edge; CDFI: no evident blood flow signal was observed.

Table 3
The ultrasound features of distant organ metastases

| Ultrasound sonographic features | Number of cases | % |
|---------------------------------|-----------------|-------|
| Uterine metastasis | 1 | 25.00 |
| Parotid metastases | 1 | 25.00 |
| Axillary metastasis | 1 | 25.00 |
| Submandibular metastases | 1 | 25.00 |

Note: χ^2 test was used.

DISCUSSION

The types of metastasis in patients with thyroid cancer include cervical lymph node metastasis, soft tissue invasion, and distant organ metastasis, and the incidence of cervical lymph node metastasis is the highest¹⁵. Clinical data showed that half of

the patients with thyroid cancer had developed regional lymph node metastasis upon consultation, with the highest incidence of ipsilateral and middle CLNM, which contains bilateral CLNM and supraclavicular lymph node metastasis¹⁶. A small fraction of patients developed lymph node metastasis when the primary tumor was tiny, which

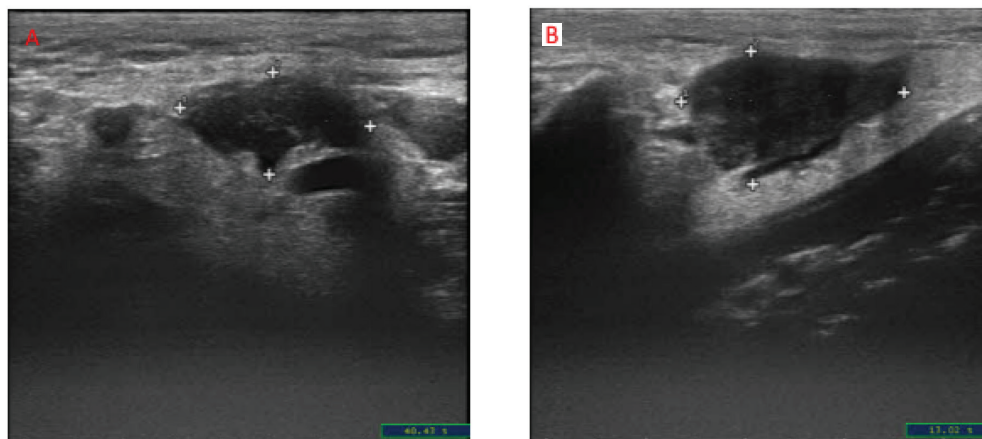


Fig. 5. Distant metastases. Figure A: left side; Figure B: right side. Hypoechoic masses were observed in both parotid glands, with clear borders, uneven edges, partially angular and irregular shapes, and no evident internal blood flow signal.

was the first symptom of metastatic lymph node enlargement in some patients¹⁷.

Lymph node metastasis was predominantly unilateral. Unilateral metastasis accounted for 72.09% of this study's 86 patients with thyroid cancer. Statistics showed that lymph node metastases were mostly in the middle and lower of the neck, being approximately 68% of all neck lymph nodes¹⁸. Studies have shown that lymph node enlargement could be detected in only 30% of patients with papillary thyroid cancer undergoing physical examination. Pathological examination revealed that over 80% of patients have lymph node metastasis, indicating some underdiagnosis of lymph node metastasis by ultrasound¹⁹. It was found that thyroid cancer patients with CLNM experience higher recurrence rates, mortality, and worse prognosis than patients without CLNM²⁰. Early examination is required for the detection of lymph node metastasis in patients with thyroid cancer. Comprehensive observation of lymph node in terms of morphology, borders, internal echogenicity and other features was performed. The following reliable features of lymph node metastasis were summarized in this study with reference to ultrasound findings. Solid hyperechoic or hypoechoic nodules, cystic changes, and

gravel-like calcifications were found, with zones III, IV, and VI being the metastatic areas with the highest incidence rate. Studies have shown that ultrasound showed an accuracy of >75% in the diagnosis of CLNM in patients with thyroid cancer²¹. Studies have proposed that thyroid cancer first metastasized to zone VI lymph nodes, showing the highest rate of metastasis²². A study analyzed patients with papillary thyroid cancer treated with systemic lymph node dissection. It showed that over 80% of patients had multi-divisional metastases, with the highest rates in Zone III, Zone IV, Zone II, and Zone V. However, there were no cases of metastasis to Zone I²³, which is consistent with the results of this study, demonstrating that the rate of metastasis from the highest to the lowest occurred in Zone III, Zone IV, Zone VI, Zone II, Zone V, and Zone VII. There were no patients with metastasis to Zone I. However, in clinical practice, the missed rate of lymph node metastases was highest in zone VI, and the diagnostic rate by ultrasound for metastatic lymph nodes in this region was low. However, typical features could be obtained since other primary head and neck tumors basically do not metastasize to this region²⁴. It can be concluded from the above analysis that

clinical physicians should pay attention to zones III, IV and VI of the neck to reduce missed diagnoses and ensure the diagnostic accuracy.

Invasion of the surrounding soft tissues and organs is also one metastatic route of thyroid cancer, primarily affecting the thyroid capsule, the fatty muscles, the tracheal ring, the thyroid cartilage, and the larynx²⁵. In this study, 25 patients developed soft tissue invasion involving the thyroid capsule, ten patients developed invasion of the fatty muscles. Two patients had invasion of the trachea, and one patient had invasion of the thyroid cartilage. If the primary lesion is in close proximity to the thyroid capsule, there is a higher risk of CLNM and also the invasion of adjacent soft tissues, in which aggressive surgical treatment and complete clearance of regional lymph nodes on the lateral side of the neck are required²⁶. Although papillary thyroid carcinoma showed a slight malignant transformation, it can develop distant metastases, with bone, brain, and lung more likely involved. The limitations of ultrasonography result in a low detection rate in these sites by ultrasonography²⁷. Previous evidence showed that distant metastases from papillary thyroid cancer occurred in the breast, axilla, orbit, and pancreas, and ultrasonography was performed based on patient history²⁸. In this study, distant organ metastases occurred in four cases of thyroid cancer (parotid gland, submandibular gland, axilla) and one case in the uterus.

In conclusion, the most common metastatic site of thyroid cancer is the cervical lymph nodes. The soft tissues and distant organs were also involved. There are typical sonographic features in ultrasonography, and adequate familiarity with the sonographic features can help to diagnose suspicious metastases in a timely manner, which is crucial for clinical diagnosis, treatment, and prognostic assessment. However, there are shortcomings in the present study, as shown by the small sample size and the lack

of sufficient representativeness of the obtained results, as well as the lack of differentiation of thyroid cancer types for the analysis of metastases, which need to be improved in future studies.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interests

The authors declared no conflict of interest.

Author's ORCID numbers

- Lingling Ruan:
0000-0002-4402-7323
- Qingxin Zhang:
0000-0002-1748-2005
- Qinghong Qu:
0000-0002-9261-5592

Participation in development and writing of the paper

Concept and design: QQ and LR. Acquisition of data, literature review, and refinement of manuscript: All authors. Analysis and interpretation of data: LR and QZ. Manuscript writing: LR. Review of final manuscript: QQ.

REFERENCES

1. Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet* 2016; 388(10061):2783-2795. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30172-6.
2. Vasileiadis I, Boutzios G, Karalaki M, Misiakos E, Karatzas T. Papillary thyroid carcinoma of the isthmus: Total thyroidectomy or isthmusectomy? *Am J Surg* 2018; 216(1):135-139. doi: 10.1016/j.amjsurg.2017.09.008.
3. Yu J, Deng Y, Liu T, Zhou J, Jia X, Xiao T, Zhou S, Li J, Guo Y, Wang Y, Zhou J, Chang C. Lymph node metastasis predic-

- tion of papillary thyroid carcinoma based on transfer learning radiomics. *Nat Commun* 2020; 11(1):4807. doi: 10.1038/s41467-020-18497-3.
4. **Zhao H, Huang T, Li H.** Risk factors for skip metastasis and lateral lymph node metastasis of papillary thyroid cancer. *Surgery* 2019; 166(1):55-60. doi: 10.1016/j.surg.2019.01.025.
 5. **Takano T.** Natural history of thyroid cancer [Review]. *Endocr J* 2017; 64(3):237-244. doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0026.
 6. **Paulson VA, Rudzinski ER, Hawkins DS.** Thyroid Cancer in the Pediatric Population. *Genes (Basel)* 2019; 10(9). doi: 10.3390/genes10090723.
 7. **Ruiz E, Niu T, Zerfaoui M, Kunnimalaiyaan M, Friedlander PL, Abdel-Mageed AB, Kandil E.** A novel gene panel for prediction of lymph-node metastasis and recurrence in patients with thyroid cancer. *Surgery* 2020; 167(1):73-79. doi: 10.1016/j.surg.2019.06.058.
 8. **Lee JH, Ha EJ, Kim JH.** Application of deep learning to the diagnosis of cervical lymph node metastasis from thyroid cancer with CT. *Eur Radiol* 2019; 29(10):5452-5457. doi: 10.1007/s00330-019-06098-8.
 9. **Liu T, Zhou S, Yu J, Guo Y, Wang Y, Zhou J, Chang C.** Prediction of lymph node metastasis in patients with papillary thyroid carcinoma: a radiomics method based on preoperative ultrasound images. *Technol Cancer Res Treat* 2019; 18:1078099361. doi: 10.1177/1533033819831713.
 10. **Ke Z, Liu Y, Zhang Y, Li J, Kuang M, Peng S, Liang J, Yu S, Su L, Chen L, Sun C, Li B, Cao J, Lv W, Xiao H.** Diagnostic value and lymph node metastasis prediction of a custommade panel (thyroline) in thyroid cancer. *Oncol Rep* 2018; 40(2):659-668. doi: 10.3892/or.2018.6493.
 11. **Kim SY, Lee E, Nam SJ, Kim EK, Moon HJ, Yoon JH, Han KH, Kwak JY.** Ultrasound texture analysis: Association with lymph node metastasis of papillary thyroid microcarcinoma. *Plos One* 2017; 12(4):e176103. doi: 10.1371/journal.pone.0176103.
 12. **Lin P, Yao Z, Sun Y, Li W, Liu Y, Liang K, Liu Y, Qin J, Hou X, Chen L.** Deciphering novel biomarkers of lymph node metastasis of thyroid papillary microcarcinoma using proteomic analysis of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples. *J Proteomics* 2019; 204:103414. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103414.
 13. **Roman BR, Morris LG, Davies L.** The thyroid cancer epidemic, 2017 perspective. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2017; 24(5):332-336. doi: 10.1097/MED.000000000000359.
 14. **Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT. American Head and Neck Society; American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.** Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128(7):751-758. doi: 10.1001/archotol.128.7.751.
 15. **Li F, Pan D, He Y, Wu Y, Peng J, Li J, Wang Y, Yang H, Chen J.** Using ultrasound features and radiomics analysis to predict lymph node metastasis in patients with thyroid cancer. *Bmc Surg* 2020; 20(1):315. doi: 10.1186/s12893-020-00974-7.
 16. **Jiang W, Wei HY, Zhang HY, Zhuo QL.** Value of contrast-enhanced ultrasound combined with elastography in evaluating cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *World J Clin Cases* 2019; 7(1):49-57. doi: 10.12998/wjcc.v7.i1.49.
 17. **Chen L, Chen L, Liu J, Wang B, Zhang H.** Value of qualitative and quantitative contrast-enhanced ultrasound analysis in preoperative diagnosis of cervical lymph node metastasis from papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med* 2020; 39(1):73-81. doi: 10.1002/jum.15074.
 18. **Yu ST, Ge JN, Sun BH, Wei ZG, Lei ST.** Lymph node metastasis in suprasternal space in pathological node-positive papillary thyroid carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2019; 45(11):2086-2089. doi: 10.1016/j.ejso.2019.07.034.
 19. **Liu C, Xiao C, Chen J, Li X, Feng Z, Gao Q, Liu Z.** Risk factor analysis for predicting cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: a study of 966 patients. *Bmc Cancer* 2019; 19(1):622. doi: 10.1186/s12885-019-5835-6.

20. Qi ZJ, Liu LF, Cheng L, Han X, Wang T, Li F, Lu C, Zhang AB. [Risk factors analyses for lateral neck lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2019; 33(7):603-606. doi: 10.13201/j.issn.1001-1781.2019.07.007.
21. Xing Z, Qiu Y, Yang Q, Yu Y, Liu J, Fei Y, Su A, Zhu J. Thyroid cancer neck lymph nodes metastasis: Meta-analysis of US and CT diagnosis. *Eur J Radiol* 2020; 129:109103. doi: 10.1016/j.ejrad.2020.109103.
22. Sakorafas GH, Koureas A, Mpampali I, Balalis D, Nasikas D, Gantzoulas S. Patterns of Lymph Node Metastasis in Differentiated Thyroid Cancer; Clinical Implications with Particular Emphasis on the Emerging Role of Compartment-Oriented lymph node dissection. *Oncol Res Treat* 2019; 42(3):143-147. doi: 10.1159/000488905.
23. Genpeng L, Jianyong L, Jiaying Y, Ke J, Zhihui L, Rixiang G, Lihan Z, Jingqiang Z. Independent predictors and lymph node metastasis characteristics of multifocal papillary thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(5):e9619. doi: 10.1097/MD.00000000000009619.
24. Jiang HJ, Hsiao PJ. Clinical application of the ultrasound-guided fine needle aspiration for thyroglobulin measurement to diagnose lymph node metastasis from differentiated thyroid carcinoma-literature review. *Kaohsiung J Med Sci* 2020; 36(4):236-243. doi: 10.1002/kjm2.12173.
25. Zhai T, Muhanhali D, Jia X, Wu Z, Cai Z, Ling Y. Identification of gene co-expression modules and hub genes associated with lymph node metastasis of papillary thyroid cancer. *Endocrine* 2019; 66(3):573-584. doi: 10.1007/s12020-019-02021-9.
26. Wang B, Wen XZ, Zhang W, Qiu M. Clinical implications of Delphian lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: a single-institution study, systemic review and meta-analysis. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2019; 48(1):42. doi: 10.1186/s40463-019-0362-7.
27. Feng JW, Qin AC, Ye J, Pan H, Jiang Y, Qu Z. Predictive factors for lateral lymph node metastasis and skip metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol* 2020; 31(1):67-76. doi: 10.1007/s12022-019-09599-z.
28. Guo JN, Song LH, Yu PY, Yu SY, Deng SH, Mao XH, Xiu C, Sun J. Ultrasound elastic parameters predict central lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma. *J Surg Res* 2020; 253:69-78. doi: 10.1016/j.jss.2020.03.042.

Expression of MiR-20a-5p and its target gene in colon cancer and its effect on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells.

Xingkui Tang¹, Yukun Lin², Yaqiong Wang², Jialin He¹, Xijun Luo¹, Jun Jie Liang¹ and Xianjun Zhu¹

¹ Department of General Surgery, Guangzhou Panyu Center Hospital, Guangzhou, Guangdong Province, China.

² Department of Electron Microscopy, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, China.

Keywords: MicroRNA-20a-5p; similar gene of breast cancer metastasis suppressor gene 1; colon cancer; proliferation; apoptosis.

Abstract. We investigated the expression of micro ribonucleic acid (miR)-20a-5p and its target gene, breast cancer metastasis suppressor 1 like (BRMS1L), in colon cancer tissues and their effects on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. The dual luciferase assay was used to detect the targeted regulation of miR-20a-5p on BRMS1L. The expression levels of miR-20a-5p and BRMS1L in colon cancer tissues and cells were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). MiR-20a-5p mimic and mimic negative control (NC) were transfected into the colon cancer cell line SW480 by the liposome transient transfection method. The MTT assay, monoclonal formation of cancer cells, and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. The expression level of miR-20a-5p in colon cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues, and the expression level of BRMS1L was significantly lower than that in adjacent tissues. The expression level of miR-20a-5p was significantly correlated with tumor-node-metastasis (TNM) stage, lymph node metastasis, invasion depth, and differentiation degree. The higher the expression level of miR-20a-5p, the more advanced the TNM stage and invasion depth, and the easier it is for lymph nodes to metastasize ($p < 0.05$). Compared with the control and the miR-NC groups, the miR-20a-5p group's cell proliferation ability, expression of CyclinD1 and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were significantly increased, while apoptosis ability and caspase-3 protein expression were significantly decreased ($p < 0.05$). The expression of miR-20a-5p in colon cancer tissues and cells increased. Overexpression of miR-20a-5p could promote the proliferation of colon cancer cells and inhibit their apoptosis.

Expresión del MiR-20a-5p y su gen objetivo en cáncer de colon y sus efectos sobre la proliferación y apoptosis de células cancerosas de colon

Invest Clin 2023; 64 (2): 184 – 195

Palabras clave: MicroARN-20a-5p; gen similar al gen supresor de metástasis del cáncer de mama 1; cáncer de colon; proliferación; apoptosis.

Resumen. Investigamos la expresión del ácido microrribonucleico (miR)-20a-5p y su objetivo, el gen similar al supresor de metástasis del cáncer de mama 1 (BRMS1L), en tejidos de cáncer de colon y sus efectos sobre la proliferación y la apoptosis de las células de cáncer de colon. Se utilizó el ensayo de luciferasa dual para detectar la regulación específica del miR-20a-5p en BRMS1L. Los niveles de expresión de miR-20a-5p y BRMS1L en tejidos y células de cáncer de colon se detectaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El MiR-20a-5p mimico y el control mimico negativo (NC) se transfectaron a la línea celular de cáncer de colon SW480 mediante el método de transfección transitoria de liposomas. Se utilizaron el ensayo MTT, la formación monoclonal de células cancerosas y la citometría de flujo para detectar la proliferación celular y la apoptosis. El nivel de expresión de miR-20a-5p en tejidos de cáncer de colon fue significativamente mayor que en los tejidos adyacentes, y el nivel de expresión de BRMS1L fue significativamente menor que en tejidos adyacentes. El nivel de expresión de miR-20a-5p se correlacionó significativamente con el estadio tumor-ganglio-metástasis (TNM), la metástasis al ganglio linfático, la profundidad de la invasión y el grado de diferenciación. Cuanto mayor era el nivel de expresión de miR-20a-5p, más avanzada eran la etapa TNM y la profundidad de la invasión, y más fácil era que los ganglios linfáticos hicieran metástasis ($p < 0,05$). En comparación con los grupos control y miR-NC, la capacidad de proliferación celular del grupo miR-20a-5p, la expresión de CyclinD1 y el linfoma-2 de células B (Bcl-2) aumentaron significativamente; mientras que la capacidad de apoptosis y la expresión de la proteína caspasa-3 disminuyeron significativamente ($p < 0,05$). La expresión del miR-20a-5p en células y tejidos de cáncer de colon aumentó. La sobreexpresión del miR-20a-5p podría promover la proliferación de células de cáncer de colon e inhibir su apoptosis.

Received: 11-11-2022 Accepted: 04-12-2022

INTRODUCTION

Colon cancer (CC) is a common malignant tumor of the digestive tract, and its morbidity and mortality are increasing year by year. Every year, there are 1.2 million new colon cancer patients in the world,

with 600,000 deaths¹. The pathogenesis of colon cancer is complex, and the activation of carcinogenic pathways and the inhibition of defense mechanisms are important causes of the tumor, which not only affect the function of the digestive system but also involve the liver, lung, and other organs in

distant metastasis². When colorectal cancer is diagnosed at an early stage, it can be cured by surgery, but when it is diagnosed at an advanced stage, the curative effect of chemotherapy drugs is very limited³. Therefore, finding new therapeutic methods and targets is very important. Micro ribonucleic acid (MiRNA) is an endogenous single-stranded non-coding RNA with a length of 20-25 nt, which combines with the messenger ribonucleic acid (mRNA) of the target gene through base complementary pairing, resulting in its degradation or translation stop, thus down-regulating the expression of the target gene⁴. MiRNA plays the role of oncogene or tumor suppressor gene in tumors and can regulate biological processes such as proliferation, differentiation, invasion, and apoptosis of tumor cells⁵. It has been reported that miR-20a-5p regulates tumor growth, cell differentiation, and apoptosis of many cancers. Luo Sheng *et al.*⁶ pointed out that up-regulation of the expression of miR-20a-5p could promote the proliferation of pancreatic cancer cells and inhibit their apoptosis. Liu Xiao dong *et al.*⁷ found that HAGLROS inhibited the expression of miR-20a-5p, thus inhibiting the proliferation of cardiomyocytes induced by high glucose and promoting their apoptosis. MiR-20a-5p was sheared from miR-20a. At present, miR-20a is widely studied in the serum of colon cancer patients, but the expression of miR-20a-5p in colon cancer tissues and its effect on colon cancer cells are rarely reported. Therefore, this study intended to explore the expression level of miR-20a-5p and its target gene in colon cancer tissues and cells, as well as its effects on proliferation and apoptosis of colon cancer cells, so as to provide theoretical basis for early diagnosis and treatment of colon cancer.

MATERIALS AND METHODS

Objectives

This study belongs to a single-center study, and the research objects are collected

in a continuous way. Inclusive criteria: All patients were diagnosed as colon cancer by histopathology, and had not received radiotherapy, chemotherapy or other anti-tumor adjuvant therapy before operation. Exclusion criteria: Other digestive diseases (colon polyps, chronic enteritis, etc.) and other systemic malignant tumors (lung cancer, breast cancer, etc.). From January 2021 to October 2022, 87 cases of colon cancer patients in our hospital were collected. The specimens of colon cancer tissues and adjacent tissues >5cm from the tumor edge were collected. The collected specimens were kept in liquid nitrogen. General clinical data include age, sex, smoking history, drinking history, tumor diameter, tumor location, tumor-node-metastasis (TNM) stage, lymph node metastasis, infiltration depth, differentiation degree and other information were collected.

Cells

Human normal colon epithelial cell lines FHC, colon cancer cell lines SW480, HT-29 and HCT-116 (Beina Biotechnology Co., Ltd.) (Wuhan, China).

Reagents and Equipment

MiR-20a-5p mimic (MiR-20a-5p mimic) and mimic negative control (NC) (Shanghai Jima Pharmaceutical Technology Co., Ltd.); MiR-20a-5p and BRMS1L primers (Shanghai Shenggong Bioengineering Co., Ltd.); Monoclonal antibodies against CyclinD1, B-cell lymphoma-2(Bcl-2), caspase-3 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) (Cell Signal Technology Company, USA); Trizol ribonucleic acid(RNA) extraction kit, Lipofectamine TM3000 liposome and reverse transcription kit (Dalian Bao Biotechnology Co., Ltd.); Bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit (Shanghai Biyuntian Biotechnology Co., Ltd.); Fetal serum, Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) medium and trypsin (GIBCO Company, USA); Net Airtech clean bench (Thermo Fisher Company, USA); DYCZ 425D double vertical elec-

trophoresis apparatus (Beijing Liuyi Instrument Factory); Carbon dioxide incubator (Thermo Company, USA); SpectraMax i D5 microplate reader (Thermo, USA); IXplore Standard inverted microscope (Olympus, Japan).

Cell culture

Colon cancer cell lines (SW480, HT-29, HCT-116) and human normal colon epithelial cell line FHC were resuscitated, then added into DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, and cultured in an incubator at 37°C and 5% CO₂. When the cell fusion rate reached 80%, the cells were digested and passaged with trypsin.

Grouping processing

SW480 cells were divided into three groups: control group: untransfected SW480 cells; MiR-NC group: SW480 cells transfected with mimic NC; miR-20a-5p group: SW480 cells transfected with miR-20a-5p mimic.

10 mL SW480 cell fluid were inoculated into 6-well plate, 100 pmol of miR-20a-5p mimic and mimic NC were added into DMEM medium, and 4 μL Lipofectamine 3000 were added to incubate for 30 min. The cells were washed with the mixture, cultured in DMEM medium for 24 h, and the transfection efficiency was detected by flow cytometry.

Bioinformatics prediction and double luciferase experiment

Using bioinformatics database TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_72/) to predict the related target genes of miR-20a-5p, it was found that BRMS1L might be the target gene of miR-20a-5p. The wild-type 3'UTR vector (pGL3-BRMS1L-3'UTR-wt) and the mutant 3'UTR luciferase reporter vector (pGL3-BRMS1L-3'UTR-MUT) were constructed in turn. SW480 cells in logarithmic growth phase were inoculated into 6-well plates, and the two plasmids were mixed with mimic NC and miR-20a-5p mimic respectively, and then co-transfected into the cells by Lipofectamine TM3000 for

48 hours. Collect cells from each group to prepare cell lysate, and detect luciferase activity according to the requirements of the kit, to determine whether miR-20a-5p binds to 3'UTR of BRMS1L. Each group had three parallel settings.

Detection of miR-20a-5p and BRMS1L in colon cancer tissues and cells by qRT-PCR

Total RNA was extracted from tissues and cells by Trizol reagent. RNA was reverse transcribed into cDNA by reverse transcription kit, and amplified by SYBR Green method. The U6 was used as internal reference. The reaction conditions: pre-denaturation at 95°C for 5min, pre-denaturation at 95°C for 30s and pre-denaturation at 60°C for 30 s, a total of 40 cycles. The relative expression levels of miR-20a-5p and BRMS1L were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula. PCR primers: miR-20a-5p forward primer, 5'-AGTCTATACAAGGGCAAGCTCTC-3', reverse primer, 5'-CCCAATACGACCAAATCCGTT-3'. U6 forward primer 5'-CTGCTTCGGCAGCACA-3', reverse primer 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'. BRMS1L forward primer, 5'-GGCAGCATTGATATTACCTCA-3', reverse primer, 5'-TATGGACCTGAAACAACAACCTGG-3'. Each group had three parallel settings.

Detection of cell proliferation by MTT assay and cell cloning

After 24 hours of transfection, the cells were digested and inoculated in 96-well plates at the density of 1×10^3 /well. Each well was equipped with three duplicate wells, which were cultured for 24, 48, 72 and 96 hours, respectively. MTT solution was added, incubated at 37°C for 4 hours, centrifuged to remove supernatant, DMSO was added, and the absorbance value was detected at 490 nm with enzyme-labeled instrument. Each group had three parallel settings.

The cell density was adjusted to 1×10^3 /well, and the cells were inoculated in 6-well culture plates, and each well was provided with three duplicate wells. After culturing for ten days, it was fixed with 4% paraformal-

dehydrate solution, stained with crystal violet, and the colony formation was observed under microscope and counted. Each group had three parallel settings.

Detection of the apoptosis of cell lines by flow cytometry

The adjusted cell density was 1×10^5 /well, which was inoculated into 6-well plates, cultured for 48 h, washed with PBS, and suspended with binding buffer. AnnexinV FITC and PI were added, incubated in the dark for 10 min, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. Each group had three parallel settings.

Detection of CyclinD1, Bcl-2 and caspase-3 by Western blotting

Cell precipitation was harvested and added with precooled protein lysate, followed by incubation on ice for 30 min and centrifugation at 10,000 rpm at 4°C. Subsequently, the supernatant was taken for protein quantification using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher), and the total protein content was adjusted for sample preparation. After electrophoresis at 90 V, the proteins were transferred onto a PVDF membrane. The target band was cut, blocked with 5% skim milk, and incubated on a shaker at room temperature for 1 h. After antibody corresponding incubation solution (CyclinD1, Bcl-2, caspase-3, GAPDH, 1:2000) was added, the membrane was incubated on a shaker at room temperature for 30 min, and then 4°C overnight. On the second day, after returning to room temperature, the membrane was washed. Next, the membrane was added with secondary antibody corresponding incubation solution (1:5,000), and incubated on a shaker at room temperature for 2 h. After washing, the membrane added with an appropriate amount of ECL solution, followed by reaction for 5 min avoiding light. Then, fluorescence results were gathered using a quantitative imager. Each group had three parallel settings.

Statistical analysis

The SPSS 26.0 software (International Business Machines Corporation, New York, USA) was utilized for statistical analysis, and GraphPad Prism 5.0 software was employed for plotting. The *t*-test was adopted for comparison between groups, and one-way ANOVA was used for comparison among groups. A difference of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Bioinformatics prediction and double luciferase experiment

TargetScanHuman prediction showed that miR-20a-5p and BRMS1L had targeted binding sites. The double luciferase experiment showed that the luciferase activity of wild-type BRMS1L was significantly decreased ($p < 0.05$) after transfection of miR-20a-5p, while that of mutant BRMS1L was no significantly different ($p > 0.05$) (Fig. 1), indicating that there was a targeted regulation relationship between miR-20a-5p and BRMS1L.

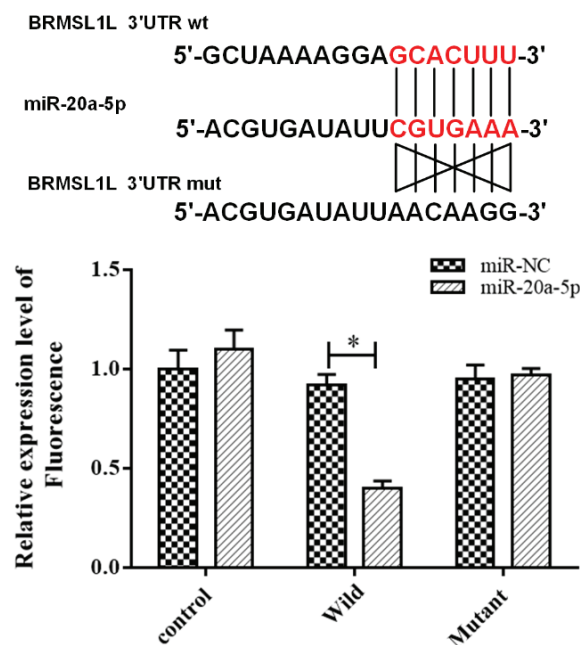


Fig. 1. Double luciferase verification experiment (compared with miR-NC group, *: $p < 0.05$).

Expression of miR-20a-5p and BRMS1L mRNA in colon cancer tissues and colon cancer cell lines

The results of qRT-PCR (Fig. 2) showed that the expression of miR-20a-5p in colon cancer tissue was significantly higher than that in para-cancerous tissues ($p < 0.05$), and the expression of BRMS1L was significantly lower ($p < 0.05$). Compared with human normal colon epithelial cell line FHC, the expression of miR-20a-5p in colon cancer cell lines SW480, HT-29 and HCT-116 increased significantly, and the expression of BRMS1L decreased significantly ($p < 0.05$).

Relationship between the expression of miR-20a-5p and clinicopathological features of patients

To verify the role of miR-20a-5p in the occurrence and development of colon cancer, 87 patients were divided into a high-expression group ($n=43$) and a low-expression group ($n=44$) according to the p median expression of miR-20a-5p. Results (Table 1) showed that age, sex, smoking history, drinking history, tumor size, and tumor location had no significant differences between the high-expression group and the low-expression group of miR-20a-5p ($p > 0.05$), but had

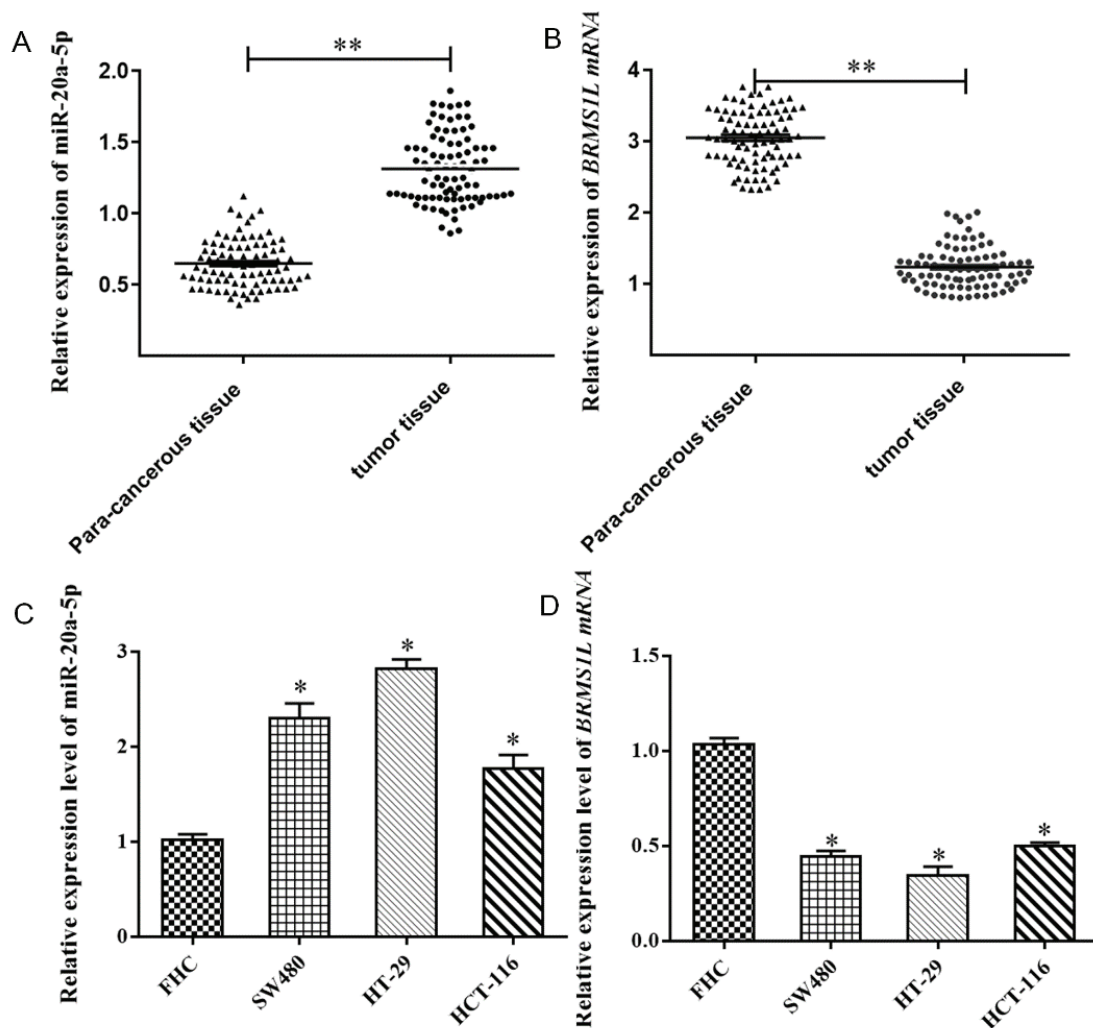


Fig. 2. The expression of miR-20a-5p and BRMS1L in colon cancer tissues (A, B, Compared with normal tissues, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$) and colon cancer cells (C, D, Compared with FHC, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).

Table 1
Relationship between expression level of miR-20a-5p in colon cancer and clinicopathological parameters of patients.

| | n | miR-20a-5p | | χ^2 | p |
|---------------------------|----|-------------------------|--------------------------|----------|-------|
| | | Low expression n (%) | High Expression n (%) | | |
| Age | | | | 1.299 | 0.254 |
| <65 | 22 | 13 (52.00) | 9 (36.00) | | |
| ≥65 | 28 | 12 (48.00) | 16 (64.00) | | |
| Gender | | | | 0.725 | 0.395 |
| Male | 27 | 15 (60.00) | 12 (48.00) | | |
| Female | 23 | 10 (40.00) | 13 (52.00) | | |
| History of smoking | | | | 0.368 | 0.544 |
| Yes | 16 | 7 (28.00) | 9 (36.00) | | |
| No | 34 | 18 (72.00) | 16 (64.00) | | |
| History of drinking | | | | 0.439 | 0.508 |
| Yes | 12 | 5 (20.00) | 7 (28.00) | | |
| No | 38 | 20 (80.00) | 18 (72.00) | | |
| Tumor diameter (cm) | | | | 1.389 | 0.239 |
| ≤5 | 18 | 11 (44.00) | 7 (28.00) | | |
| >5 | 32 | 14 (56.00) | 18 (72.00) | | |
| Tumor location | | | | 3.949 | 0.139 |
| Gastric antrum | 23 | 15 (60.00) | 8 (32.00) | | |
| Gastric body | 11 | 4 (16.00) | 7 (28.00) | | |
| Gastric fundus and cardia | 16 | 6 (24.00) | 10 (40.00) | | |
| TNM | | | | 6.65 | 0.01 |
| I~II | 29 | 19 (76.00) | 10 (40.00) | | |
| III~IV | 21 | 6 (24.00) | 15 (60.00) | | |
| Lymph node metastasis | | | | 5.195 | 0.023 |
| Yes | 28 | 10 (40.00) | 18 (72.00) | | |
| NO | 22 | 15 (60.00) | 7 (28.00) | | |
| Infiltration depth | | | | 6.876 | 0.009 |
| Mucosa layer | 31 | 11 (44.00) | 20 (80.00) | | |
| Submucosal layer | 19 | 14 (56.00) | 5 (20.00) | | |
| Degree of differentiation | | | | 5.882 | 0.015 |
| poorly | 34 | 13 (52.00) | 21 (84.00) | | |
| Medium/high | 16 | 12 (48.00) | 4 (16.00) | | |

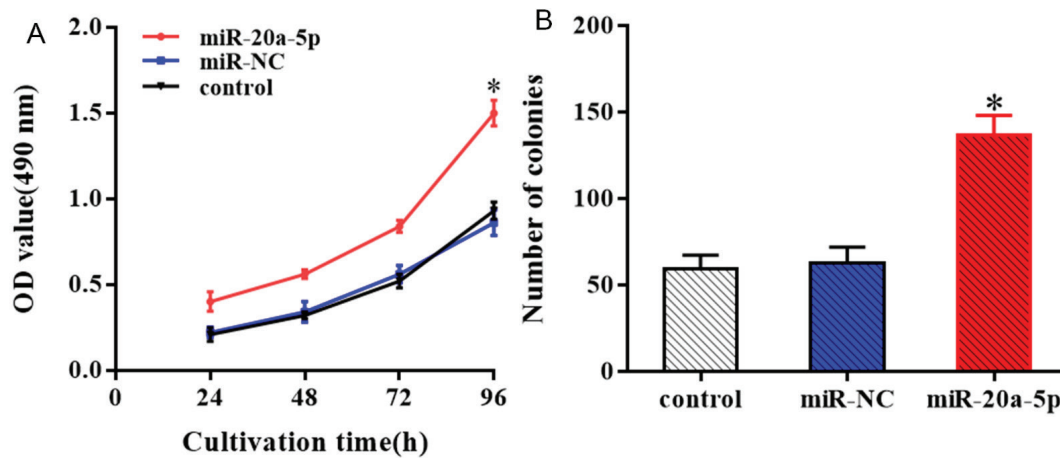


Fig. 3. MTT assay (A) and cell cloning (B) were used to detect the cell proliferation ability (compared with miR-NC group, *: $p < 0.05$).

statistical differences with the TNM stage, lymph node metastasis, infiltration depth, and differentiation degree between the high-expression group and the low-expression group of miR-20a-5p.

Results of cell proliferation detected by MTT assay and cell cloning

The results of the MTT assay (Fig. 3A) showed that at 24h, 48h, 72h and 96h, the OD value of the miR-20a-5p group was significantly higher than that of the control and miR-NC groups ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in OD between the control group and the miR-NC group ($p > 0.05$). The monoclonal formation experiment (Fig. 3B) showed that at 48h, compared with the control and miR-NC groups, the number of cell monoclonal formation in the miR-20a-5p group was significantly higher than that in the control and miR-NC groups, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in the number of cell clones between control group and miR-NC group ($p > 0.05$).

Results of cell apoptosis detected by flow cytometry

The results of flow cytometry (Fig. 4) showed that compared with control group

and miR-NC group, the apoptosis rate of miR-20a-5p group decreased significantly ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in apoptosis between control group and miR-NC group ($p > 0.05$).

Results of CyclinD1, Bcl-2 and caspase-3 expressions detected by Western blotting.

The Western blot results (Fig. 5) showed that compared with the control and miR-NC groups, the expression levels of CyclinD1 and Bcl-2 in the miR-20a-5p group were significantly increased, and the expression levels of caspase-3 were significantly decreased ($p < 0.05$).

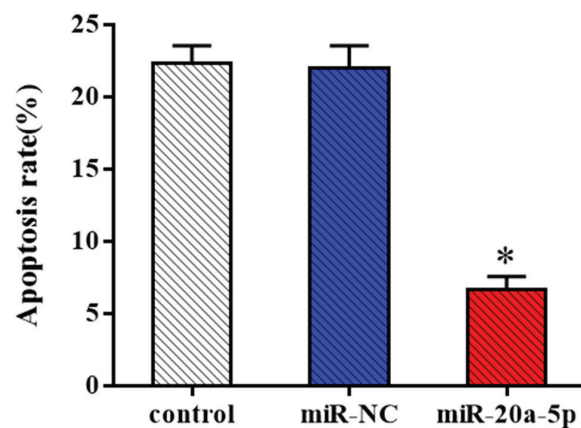


Fig. 4. Flow cytometry was used to detect apoptosis (compared with miR-NC group, *: $p < 0.05$).

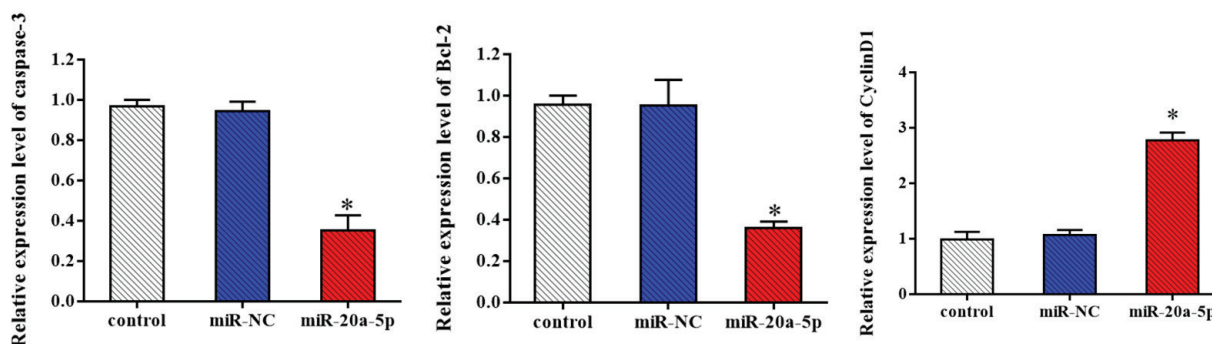


Fig. 5. The expression levels of CyclinD1, Bcl-2 and caspase-3 were detected by protein blotting (compared with miR-NC group, *: $p < 0.05$).

Mechanism of miR-20a-5p affecting malignant phenotype of colon cancer cells

By detecting the levels of miR-20a-5p and BRMS1L in colon cancer tissues and cells, we found that the expression of miR-20a-5p in colon cancer tissues and cells was up-regulated, while that of BRMS1L was down-regulated, and the level of miR-20a-5p was significantly correlated with the TNM stage, lymph node metastasis, invasion depth and differentiation degree of patients. miR-20a-5 played the role of an oncogene, and BRMS1L played the role of tumor suppressor. It indicated that miR-20a-5 and BRMS1L were related to the progression of colon cancer. To further observe the effect of miR-20a-5p on the malignant behavior of colon cancer cells, we tested the proliferation and apoptosis of cancer cells, and found that overexpression of miR-20a-5p promoted cell proliferation and inhibited cell apoptosis. At the same time, miR-20a-5p could increase the protein levels of CyclinD1 and Bcl-2 and decrease the expression of caspase-3. Therefore, we concluded that miR-20a-5p could promote the proliferation of colon cancer cells and inhibit the apoptosis of colon cancer cells by targeted regulation of BRMS1L (Fig. 6).

DISCUSSION

MiRNA can regulate the expression of target genes, and participate in the prolifer-

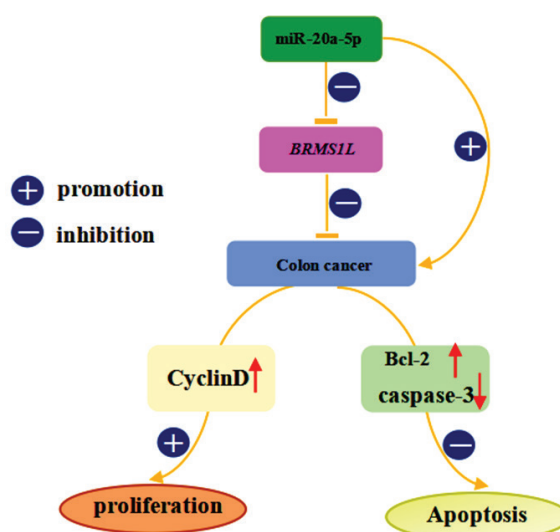


Fig. 6. Mechanism of action of miR-20a-5p on malignant phenotype of colon cancer cells.

eration, migration, invasion and apoptosis of tumor cells as oncogenes or tumor suppressor genes ^{8,9}.

Many studies have shown that miR-20a-5p has the function of oncogene. The research of Wang Xiaojing *et al.* ¹⁰ showed that miR-20a-5p could alleviate the endothelial cell injury induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) by targeting and regulating cardiac myosin-related transcription factor A(MRTFA). Zheng Hui e *et al.* ¹¹ found that acupuncture can down-regulate the expression of miR-20a-5p, thus promoting

cell proliferation and inhibiting cell apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury.

Bai *et al.*¹² found that miR-20a-5p was highly expressed in triple-negative breast cancer, and promoted the growth of tumor cells by targeting human-related transcription factor 3 (RUNX3).

However, Yu *et al.*¹³ found that miR-20a-5p showed low expression in neuroblastoma, which inhibited the proliferation of tumor cells through targeted regulation of autophagy related gene 7(ATG7). It was suggested that miR-20a-5p had different regulatory effects on the occurrence and development of tumors. The results showed that the expression of miR-20a-5p in colon cancer was significantly higher than that in adjacent tissues. MiR-20a-5p was significantly correlated with the TNM stage, lymph node metastasis, invasion depth and differentiation degree, and the higher the expression of miR-20a-5p, the more serious the TNM stage and invasion depth, and the easier it was for lymph nodes to metastasize ($p < 0.05$). The cell experiment showed that after miR-20a-5p mimic was transfected, the proliferation ability of SW480 cells was obviously enhanced, but the apoptosis ability was obviously weakened, which indicated that miR-20a-5p played a cancer-promoting role in colon cancer.

BRMS1L is the homologous gene of BRMS1, which can promote the deacetylation of histone deacetylase and combine with specific transcription factors, so as to regulate the expression of related genes and inhibit the proliferation and metastasis of various tumor cells. Cao *et al.*¹⁴ found that BRMS1L inhibited the invasion and metastasis of ovarian cancer cells by inhibiting β -catenin-wnt signaling pathway. Lv *et al.*¹⁵ found that BRMS1L inhibited the invasion of tumors of the nervous system and played an anti-cancer gene role in these tumors. Wang Jihong *et al.*¹⁶ found that miR-17-5p could promote the proliferation,

invasion, migration and apoptosis of CNE2 cells of nasopharyngeal carcinoma by down-regulating the expression of BRMS1L. Chen Jie¹⁷ found that miR-20a-5p targeted and regulated the expression of BRMS1L, inhibited the proliferation of the human colorectal cancer cell line SW480 and promoted its apoptosis. In this study, the online database of TargetScanHuman was used to predict that miR-20a-5p has a binding site with BRMS1L, and the double luciferase gene reporting experiment verified that miR-20a-5p can effectively target the negative regulation of BRMS1L.

The growth of a tumor is closely related to cell proliferation and apoptosis. When the expression of proliferation and apoptosis genes that affect tumor growth changes, the progress of cancer will also change accordingly¹⁸. CyclinD1 is a proliferation-promoting gene, which is involved in the regulation of cell cycle. Its coded products can bind to the corresponding kinases, thus promoting the development of cell cycle and enhancing cell vitality¹⁹. Bcl-2 is an apoptosis-inhibiting gene, which plays a role by antagonizing the apoptosis-promoting gene Bax²⁰. Caspase-3 is a pro-apoptosis gene, which is activated by the mitochondrial and death receptor pathways, and then causes cell apoptosis²¹. In this study, the expression of CyclinD1, Bcl-2 and caspase-3 in miR-20a-5p group were significantly increased, which indicated that miR-20a-5p induced the proliferation of cancer cells and inhibited their apoptosis by regulating the expression of CyclinD1, Bcl-2 and caspase-3.

To sum up, the expression of miR-20a-5p in colon cancer tissues and cells increased, and the expression of its target gene BRMS1L in colon cancer tissues and cells increased. Over-expression of miR-20a-5p could enhance the proliferation of colon cancer cells and inhibit their apoptosis, which provided a theoretical and experimental basis for the treatment of colon cancer by inhibiting the expression of miR-20a-5p.

Funding

None.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest to report regarding the present study.

Author's ORCID numbers

- Xingkui Tang: 0009-0002-9418-3364
- Yukun Lin: 0009-0002-9261-3682
- Yaqiong Wang: 0009-0000-9568-1731
- Jialin He: 0009-0000-6708-0306
- Xijun Luo: 0009-0005-6134-4290
- Jun Jie Liang: 0009-0009-1589-3482
- Xianjun Zhu: 0009-0008-8618-4213

Author contributions

XT and YL performed the experiments and wrote the article. YW, JH, XL, JL and XZ performed the experiments.

REFERENCES

1. **Fang Z, Xu S, Xie Y, Yan W.** Identification of a prognostic gene signature of colon cancer using integrated bioinformatics analysis. *World J Surg Oncol* 2021; 19: 13. doi:10.1186/s12957-020-02116-y
2. **Sampath SS, Venkatabalasubramanian S, Ramalingam S.** Role of MicroRNAs in the progression and metastasis of colon cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2021; 21: 35-46. doi:10.2174/1871530320666200825184924.
3. **Jiang X, Cao G, Gao G, Wang W, Zhao J, Gao C.** Triptolide decreases tumor-associated macrophages infiltration and M2 polarization to remodel colon cancer immune microenvironment via inhibiting tumor-derived CXCL12. *J Cell Physiol* 2021; 236: 193-204. doi: 10.1002/jcp.29833.
4. **Hill M, Tran N.** miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Dis Model Mech* 2021;14: dmm047662. doi: 10.1242/dmm.047662.
5. **Mishra S, Yadav T, Rani V.** Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 98: 12-23. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.10.003.
6. **Luo HS, Yi WY, Tian X, Huang XD.** Expression and mechanism of miR-20a-5p in pancreatic cancer. *Chinese J Gastroen Hepatol* 2019; 28: 335-340. doi:CNKI:SUN:WC BX.0.2019-03-022.
7. **Liu XD, Liu XQ, Dang HW, Zhao L.** HAGLROS targets miR-20a-5p to regulate the proliferation and apoptosis of cardiomyocytes induced by high glucose. *J Guangxi Med Univ* 2020; 37: 2159-2165. doi:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2020.12.011.
8. **Shao T, Wang G, Chen H, Xie Y, Jin X, Bai J, Xu J, Li X, Huang J, Jin Y, Li Y.** Survey of miRNA-miRNA cooperative regulation principles across cancer types. *Brief Bioinform* 2019; 20: 1621-1638. doi: 10.1093/bib/bby038.
9. **Rupaimoole R, Slack FJ.** MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16: 203-222. doi: 10.1038/nrd.2016.246.
10. **Wang XJ, Zhang MX, Chen XL.** miR-20a-5p alleviates ox-LDL-induced endothelial cell injury by targeting MRTFA. *Chinese J Atherosclerosis* 2019; 27: 743-750. doi:10.3969/j.issn.1007-3949.2019.09.003
11. **Zheng HE, He HL, Chen XY, Tian HM, Chen CT.** Effects of acupuncture on miRNA expression and miR-20a-5p and miR-22-5p in ischemic hippocampus of CIRI rats. *J Tradit Chin Med Univ* 2020; 40: 1226-1231. doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020. 10.010.
12. **Bai X, Han G, Liu Y, Jiang H, He Q.** MiRNA-20a-5p promotes the growth of triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3. *Biomed Pharmacother* 2018; 103: 1482-1489. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.165.
13. **Yu Y, Zhang J, Jin Y, Yang Y, Shi J, Chen F, Han S, Chu P, Lu J, Wang H, Guo Y, Ni X.** MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma. *Cancer Cell Int* 2018; 18: 5. doi: 10.1186/s12935-017-0499-2.

14. Cao P, Zhao S, Sun Z, Jiang N, Shang Y, Wang Y, Gu J, Li S. BRMS1L suppresses ovarian cancer metastasis via inhibition of the β -catenin-wnt pathway. *Exp Cell Res* 2018; 371: 214-221. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.08.013.
15. Lv J, Yang H, Wang X, He R, Ding L, Sun X. Decreased BRMS1L expression is correlated with glioma grade and predicts poor survival in glioblastoma via an invasive phenotype. *Cancer Biomark* 2018; 22: 311-316. doi: 10.3233/CBM-171019.
16. Wang JH, Ma S, Xia XC, Zhang XY, Chen BQ. miR-17-5p regulates proliferation, invasion, migration and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells by down-regulating BRMS1L expression. *Chinese J cancer biother* 2019; 26: 1249-1255. doi: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.11.011
17. Chen J. Effect of miR-20a-5p on proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cell line SW480 and its mechanism. *Shandong Med* 2020; 60: 5-9. doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2020.12.002.
18. Xie Y, Wang F, Yu J, Zhang J, Liu Y, Li M, Qi J. Silencing of MBD2 and EZH2 inhibits the proliferation of colorectal carcinoma cells by rescuing the expression of SFRP. *Oncol Rep* 2021;46:250. doi: 10.3892/or.20 21.8201.
19. Duan PJ, Zhao JH, Xie LL. Cul4B promotes the progression of ovarian cancer by upregulating the expression of CDK2 and CyclinD1. *J Ovarian Res* 2020; 13: 76. doi: 10.1186/s13048-020-00677-z.
20. Lin Y, Li Z Liu M., Ye H, He J, Chen J. CD34 and Bcl-2 as predictors for the efficacy of neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2021; 304: 495-501. doi: 10.1007/s00404-020-05921-8.
21. Zhou M, Liu X, Li Z Huang Q, Li F, Li C. Y. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer* 2018; 143: 921-930. doi: 10.1002/ijc.31374.

Risk factors for the prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis and their predictive values.

Li Li¹, Jihui Zhang², Peng Yuan³, Jianjun Song³, Zhenhui Lu³ and Guozhong Zhao³

¹Department of Infectious Diseases, The First People's Hospital of Fuyang District, Hangzhou, Zhejiang Province, China.

²Department of Hepatobiliary Surgery, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, China.

³Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, China.

Keywords: decompensated hepatitis b cirrhosis; prognosis; risk factor; predictive value.

Abstract. We aimed to investigate the risk factors affecting the prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis and their predictive values. The clinical data of 149 patients with decompensated hepatitis B cirrhosis, treated from August 2015 to June 2019, were analyzed retrospectively. They were divided into death and survival groups during a one-year follow-up. Their baseline data were compared, and the risk factors affecting death, correlations among risk factors, and predictive values of these factors for death were analyzed. Survival analysis was conducted. During a one-year follow-up, 103 patients survived, and 46 died. High neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), red cell distribution width (RDW), the model for end-stage liver disease (MELD) score, the Child-Turcotte-Pugh (CTP) score, and low serum sodium were independent risk factors for death in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis. NLR correlated positively with CTP and MELD scores ($r=0.346$, $p=0.0001$, $r=0.243$, $p=0.0003$, respectively). Likewise, the RDW had positive correlations with CTP and MELD scores ($r=0.417$, $p=0.0001$, $r=0.413$, $p=0.0003$, respectively). Serum sodium was negatively correlated with CTP and MELD scores ($r=-0.484$, $p=0.0001$, $r=-0.476$, $p=0.0001$, respectively). The survival rate was high in patients with $NLR < 7.38$, $RDW < 16.15\%$, serum sodium > 146.31 mmol/L, CTP score < 10.26 points, and MELD score < 11.31 points ($p=0.0001$). NLR, RDW, serum sodium, MELD, and CTP scores had high death predictive values. NLR, RDW, serum sodium, CTP score, and MELD score can be considered as critical indices for evaluating and predicting the prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis.

Factores de riesgo para el pronóstico de pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada y sus valores predictivos.

Invest Clin 2023; 64 (2): 196 – 205

Palabras clave: cirrosis por hepatitis b descompensada; pronóstico; factor de riesgo; valor predictivo.

Resumen. Nuestro objetivo fue investigar los factores de riesgo que afectan el pronóstico de los pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada y sus valores predictivos. Se analizaron retrospectivamente los datos clínicos de 149 pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada tratados desde agosto de 2015 hasta junio de 2019. Estos pacientes se dividieron en grupos de muerte y supervivencia, durante un año de seguimiento. Se compararon sus datos basales de referencia y se analizaron los factores de riesgo que afectan la muerte, las correlaciones entre los factores de riesgo y los valores predictivos de muerte de estos factores. El análisis de supervivencia durante un año de seguimiento, demostró que sobrevivieron 103 pacientes y fallecieron 46. La alta proporción de neutrófilos-linfocitos (NLR), el ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW), el modelo para la puntuación de enfermedad hepática en etapa terminal (MELD), la puntuación de Child-Turcotte-Pugh (CTP) y el bajo nivel de sodio sérico fueron factores de riesgo independientes para la muerte en pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada. NLR tuvo correlaciones positivas con la puntuación CTP y la puntuación MELD ($r = 0,346$, $p = 0,0001$, $r = 0,243$, $p = 0,0003$, respectivamente). RDW tuvo correlaciones positivas con la puntuación CTP y la puntuación MELD ($r = 0,417$, $p = 0,0001$, $r = 0,413$, $p = 0,0003$, respectivamente). El sodio sérico se correlacionó negativamente con las puntuaciones CTP y MELD ($r = -0,484$, $p = 0,0001$, $r = -0,476$, $p = 0,0001$, respectivamente). La tasa de supervivencia fue alta en pacientes con $NLR < 7,38$, $RDW < 16,15\%$, $\text{sodio sérico} > 146,31$ mmol/L, $\text{puntuación CTP} < 10,26$ puntos y $\text{puntuación MELD} < 11,31$ puntos ($p = 0,0001$). NLR, RDW, sodio sérico, puntaje MELD y puntaje CTP tuvieron altos valores predictivos de muerte. NLR, RDW, sodio sérico, puntaje CTP y puntaje MELD pueden considerarse índices importantes para evaluar y predecir el pronóstico de pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada.

Received: 08-07-2022 Accepted: 17-12-2022

INTRODUCTION

Liver cirrhosis is a chronic progressive liver disease that involves histopathological changes such as hepatocyte necrosis, regenerative nodules, diffuse liver fibrosis and formation of pseudolobules due to multiple causes¹. Hepatitis B is one of the common causes of liver cirrhosis². The decompen-

sated stage is the end stage of liver cirrhosis, manifested as portal hypertension and liver damage in clinical practice³. Additionally, abdominal organ injury can induce various complications such as ascites, hemorrhages due to varicose vein rupture, hepatic encephalopathy and secondary infections, which seriously affect the prognosis of patients and cause a high mortality rate. The

five-year mortality rate of patients with decompensated cirrhosis who have not undergone liver transplantation is up to 85%, of which the one-year mortality rate of those complicated with gastrointestinal bleeding and ascites as well as renal failure and infection is 57%, 20% and 67%, respectively ⁴. Hence, it is of great significance to understand comprehensively the causes of death and risk factors in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis⁵.

In this study, the risk factors affecting the prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis and the predictive value of these factors for the prognosis were analyzed, aiming to provide reliable bases for early clinical identification, disease judgment and prognostic evaluation.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The clinical data of 149 patients with decompensated hepatitis B cirrhosis treated in our hospital from August 2015 to June 2019 were collected and retrospectively analyzed. According to the *Diagnostic Criteria for Chronic Hepatitis B* in 2015 ⁶, the diagnostic criteria included: a) clear evidence for etiology of hepatitis B virus (HBV) infection, and no other common causes of liver cirrhosis, b) confirmed evidence of liver cirrhosis through histology, clinical manifestations, and imaging: morphology showing liver fibrosis, regenerative nodules and pseudolobules, clinical manifestations exhibiting portal hypertension, liver insufficiency, and B-ultrasound, computed tomography, magnetic resonance, and radionuclide imaging indicating signs of liver cirrhosis; and c) complications such as hepatic encephalopathy, hemorrhages caused by rupture of esophageal and gastric varices, and ascites. The inclusion criteria were set as follows: a) patients who met the above diagnostic criteria, b) those with no recent active infection, c) those with complete clinical

data, and d) those who and whose family members signed the informed consent and could cooperate to complete the follow-up. The exclusion criteria involved: a) patients with acute liver failure, b) those who were complicated with severe heart, lung, or kidney diseases, c) those who were complicated with primary liver cancer or other malignant tumors, d) those who were complicated with history of brain diseases, metabolic encephalopathy or toxic encephalopathy, e) those who received glucocorticoid or immunosuppressive therapy, or f) cases undergoing liver transplantation. This study was approved by the Medical Ethics Committee of our hospital. The number of samples included in factor analysis is about 5-10 times that of variable factors. There were 20 variable factors in this study, so the number of included samples should have been >100. Finally, 149 cases were included (Fig. 1).

Data collection and scoring

The medical records were reviewed to collect the gender, age and physical examination results of every patient. After admission, the patient's first laboratory examination data were recorded, including routine blood tests, coagulation function, liver function, and kidney function. Child-Turcotte-Pugh (CTP) score ⁷: ascites, hepatic encephalopathy, serum total bilirubin (TBil), albumin (Alb), and prothrombin time (PT) were scored according to the severity of the disease, namely 1, 2 and 3 points, respectively. The score of 5 items was added, and 5-6 points were Grade A, indicating liver function compensation; 7-9 points were Grade B, indicating liver function decompensation; and 10-15 points were Grade C, indicating severe decompensation of liver function. The Model for end-stage liver disease (MELD) was utilized to assess the patients' liver function ⁸. The MELD score was calculated with the formula: $3.8 \times \ln [\text{bilirubin (mg/dL)}] + 11.2 \times \ln [\text{prothrombin international normalized ratio (INR)}] + 9.6 \times \ln [\text{creatinine (mg/dL)}] + 6.4$.

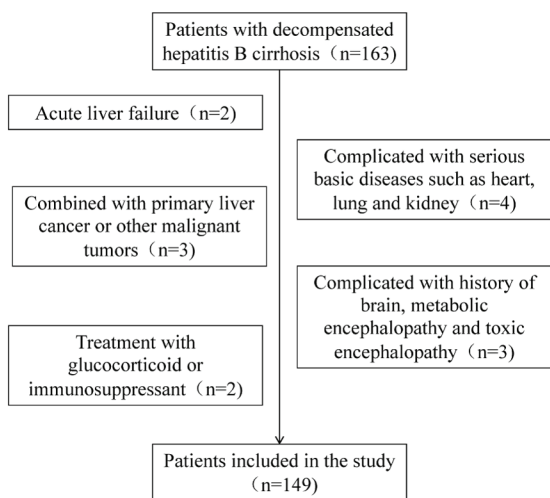


Fig. 1. Study enrollment flowchart.

Follow-up and grouping

The date of patients admitted to the hospital with a confirmed diagnosis of decompensated hepatitis B cirrhosis for the first time was regarded as the start of follow-up. The last follow-up or death was set as the end event. The follow-up period was not less than one year. During the one-year follow-up period, the dead patients were selected as the death group, while the surviving patients were enrolled as the survival group.

Statistical analysis

The SPSS 16.0 software was used for statistical analysis. The measurement data conforming to normal distribution were expressed as means \pm standard deviations, and the independent *t*-test was used for comparison between groups. If the data did not conform to the normal distribution, they were expressed as medians (lower quartiles and higher quartiles) [M (P25, P75)], and the rank sum test was used for comparison between the groups. The numerical data were expressed as percentages (%), and the χ^2 test was used for comparison between groups. The Multivariate COX regression analysis was utilized to explore the risk factors for the death of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis, and the correlations among indices were analyzed by the Spearman correlation test. The Long-rank χ^2 test was

used to analyze the death of patients, and the Kaplan-Meier method was adopted to draw the survival curve. The positive and negative predictive values of these factors for the death of patients were analyzed by the receiver operating characteristic (ROC) curve, and the area under the curve (AUC) was calculated. The inspection level was $\alpha=0.05$. $p<0.05$ indicated that the difference was statistically significant.

RESULTS

Among the 149 patients with decompensated hepatitis B cirrhosis, there were 86 males and 63 females, aged 46-70 years old, with an average of 56.42 ± 6.45 . During the one-year follow-up, 103 patients survived (69.13%), and 46 died (30.87%).

No statistically significant differences were found in gender, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and platelet (PLT) between the two groups ($p>0.05$). The age, total bilirubin (TBil), white blood cell count (WBC), neutrophils (N), neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), red cell distribution width (RDW), serum creatinine (Scr), PT, INR, CTP score, and MELD score were higher. Body mass index (BMI), Alb, lymphocyte (L), and serum sodium were lower in the death group than those in the survival group, suggesting statistically significant differences ($p<0.05$) (Table 1).

Among the variables with statistically significant differences between the survival and death groups, TBil, Alb, PT, INR, Scr, N, and L displayed multiple linear relationships with the CTP, MELD, and NLR scores, so they were excluded from the multivariate COX regression analysis. Finally, the multivariate COX regression analysis included age, BMI, WBC, NLR, RDW, serum sodium, MELD, and CTP scores. The results exhibited that high NLR, RDW, MELD score and CTP score, and low serum sodium were independent risk factors for death in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis (Table 2).

Table 1
Baseline data of survival and death groups.

| Index | Survival group (n=103) | Death group (n=46) | $\chi^2/Z/t$ | p |
|--|------------------------|---------------------|--------------|--------|
| Gender (male/female, case) | 69/34 | 28/18 | 0.524 | 0.469 |
| Age (year, $\bar{x}\pm SD$) | 54.06 \pm 5.40 | 61.72 \pm 5.41 | 7.995 | 0.0001 |
| BMI (kg/m ² , $\bar{x}\pm SD$) | 22.03 \pm 1.09 | 19.44 \pm 1.00 | 13.736 | 0.0001 |
| AST (U/L, $\bar{x}\pm SD$) | 47.86 \pm 5.42 | 49.23 \pm 5.51 | 1.418 | 0.158 |
| ALT (U/L, $\bar{x}\pm SD$) | 52.45 \pm 7.39 | 53.82 \pm 7.44 | 1.043 | 0.299 |
| ALP (U/L, $\bar{x}\pm SD$) | 146.72 \pm 15.83 | 147.61 \pm 16.09 | 0.315 | 0.753 |
| TBil (μ mol/L, [M(P25,P75)]) | 28.95(21.36~42.07) | 64.52(25.48~113.65) | 26.596 | 0.0001 |
| Alb (g/L, $\bar{x}\pm SD$) | 32.75 \pm 4.61 | 25.13 \pm 3.48 | 10.003 | 0.0001 |
| WBC (10 ⁹ /L, $\bar{x}\pm SD$) | 6.34 \pm 0.75 | 7.49 \pm 0.94 | 7.978 | 0.0001 |
| N (10 ⁹ /L, [M(P25,P75)]) | 6.27(3.65~8.49) | 8.13(5.08~10.97) | 7.328 | 0.0001 |
| L (10 ⁹ /L, $\bar{x}\pm SD$) | 1.48(0.72~2.13) | 0.75(0.49~1.06) | 5.267 | 0.0001 |
| NLR ($\bar{x}\pm SD$) | 5.78(1.71~11.79) | 11.38(4.79~14.63) | 13.586 | 0.0001 |
| RDW (% [M(P25,P75)]) | 15.68(14.05~17.26) | 17.29(14.97~19.38) | 6.419 | 0.0001 |
| PLT (10 ⁹ /L, $\bar{x}\pm SD$) | 76.85 \pm 23.19 | 75.37 \pm 22.68 | 0.362 | 0.718 |
| Ser (mg/L, $\bar{x}\pm SD$) | 0.76 \pm 0.25 | 1.64 \pm 0.82 | 9.941 | 0.0001 |
| Serum sodium (mmol/L, $\bar{x}\pm SD$) | 139.29 \pm 7.79 | 126.27 \pm 7.35 | 9.587 | 0.0001 |
| PT (s, [M(P25,P75)]) | 15.14(12.96~17.03) | 18.73(15.42~20.91) | 8.693 | 0.0001 |
| INR ($\bar{x}\pm SD$) | 1.41 \pm 0.35 | 1.98 \pm 0.62 | 7.140 | 0.0001 |
| CTP score (point, $\bar{x}\pm SD$) | 9.53 \pm 0.85 | 12.54 \pm 0.97 | 19.104 | 0.0001 |
| MELD score (point, $\bar{x}\pm SD$) | 9.34 \pm 2.51 | 17.54 \pm 3.31 | 16.636 | 0.0001 |

Body mass index (BMI), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), serum total bilirubin (TBil), albumin (Alb), white blood cell count (WBC), neutrophils (N), lymphocyte (L), neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), red cell distribution width (RDW), platelet (PLT), serum creatinine (Ser), prothrombin time (PT) international standard ratio (INR).

Table 2
Risk factors for death in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis.

| Factor | β | SE | Wald | p | OR | 95%CI |
|--------------|---------|-------|-------|--------|-------|-------------|
| Age | 0.975 | 0.826 | 1.257 | 0.482 | 0.893 | 0.568~1.347 |
| BMI | -0.824 | 0.672 | 1.438 | 0.519 | 1.275 | 0.641~1.852 |
| WBC | 1.356 | 1.198 | 2.065 | 0.237 | 1.684 | 0.753~2.469 |
| NLR | 2.249 | 1.863 | 3.521 | 0.0001 | 3.536 | 2.384~4.728 |
| RDW | 0.832 | 0.754 | 1.849 | 0.021 | 2.048 | 1.276~3.514 |
| Serum sodium | -0.765 | 0.627 | 1.232 | 0.035 | 1.952 | 1.597~3.863 |
| CTP score | 2.493 | 2.182 | 4.574 | 0.009 | 4.376 | 3.458~5.692 |
| MELD score | 2.608 | 2.379 | 4.683 | 0.004 | 4.715 | 3.629~5.847 |

The independent variables were assigned values with the median as the cut-off point: age: >57 years old=1, <57 years old=0, BMI: >21.2 kg/m²=1, <21.2 kg/m²=0, WBC: >6.65 \times 10⁹/L=1, <6.65 \times 10⁹/L=0, NLR: >7.38=1, <7.38=0, RDW: >16.15%=1, <16.15%=0, serum sodium: >135.39 mmol/L=1, <135.39 mmol/L=0, CTP score: >10.26 points=1, <10.26 points=0, MELD score: >11.31 points=1, <11.31 points=0.

NLR had positive correlations with the CTP score and MELD score ($r=0.346$, $p=0.0001$, $r=0.243$, $p=0.0003$). RDW had positive relations to CTP score and MELD score ($r=0.417$, $p=0.0001$, $r=0.413$, $p=0.0003$). Serum sodium was negatively associated with CTP score and MELD score ($r=-0.484$, $p=0.0001$, $r=-0.476$, $p=0.0001$) (Fig. 2).

According to the independent risk factors obtained in the multivariate COX regression analysis, the indices were categorized into more than the median group and less than the median group. The survival rate was 89.47% in NLR<7.38 group and 47.95% in NLR>7.38 group, suggesting a statistically significant difference ($\chi^2=30.090$, $p=0.0001$). It was 82.89% in the RDW<16.15% group and 54.79% in the RDW>16.15% group, suggesting a statistically significant difference ($\chi^2=13.777$,

$p=0.0001$). It was 94.59% in the serum sodium>146.31 mmol/L group and 44.00% in the serum sodium<146.31 mmol/L group, suggesting a statistically significant difference ($\chi^2=44.678$, $p=0.0001$). Besides, the survival rate was 86.67% in the CTP score <10.26 points group and 51.35% in the CTP score >10.26 points group, suggesting a statistically significant difference ($\chi^2=21.768$, $p=0.0001$). It was 90.67% in the MELD score<11.31 points group and 47.30% in the MELD score>11.31 points group, suggesting a statistically significant difference ($\chi^2=32.829$, $p=0.0001$) (Fig. 3).

In predicting the death of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis, the area under the NLR curve was 0.836, the 95% confidence interval (CI) was 0.770-0.903, the optimal cut-off value was 7.49, the sensitivity was 81.1%, the specificity was 86.7%, and the

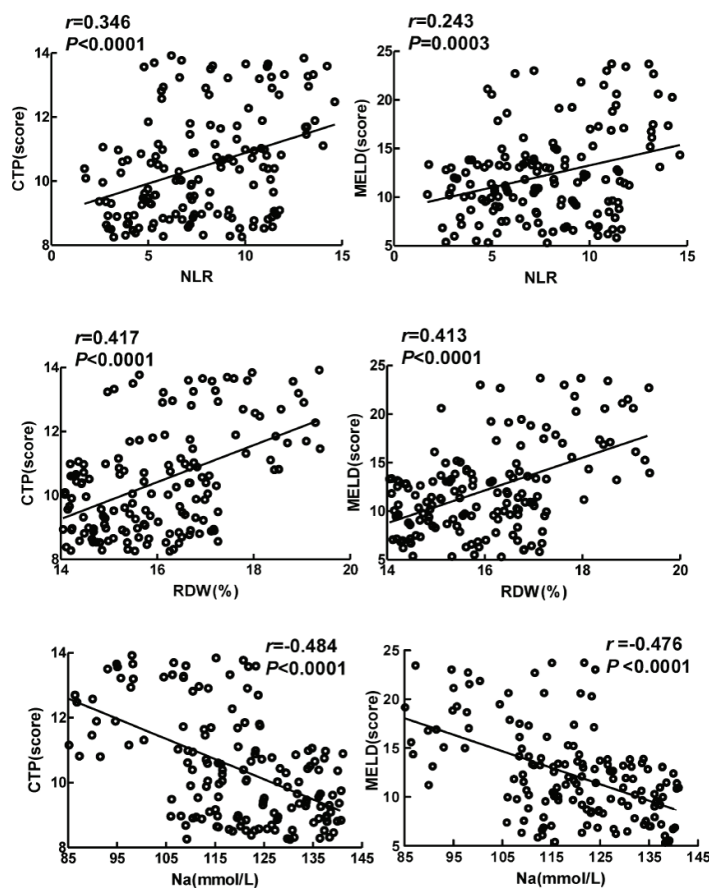


Fig. 2. Correlations of NLR, RDW, and serum sodium with CTP score and MELD score.

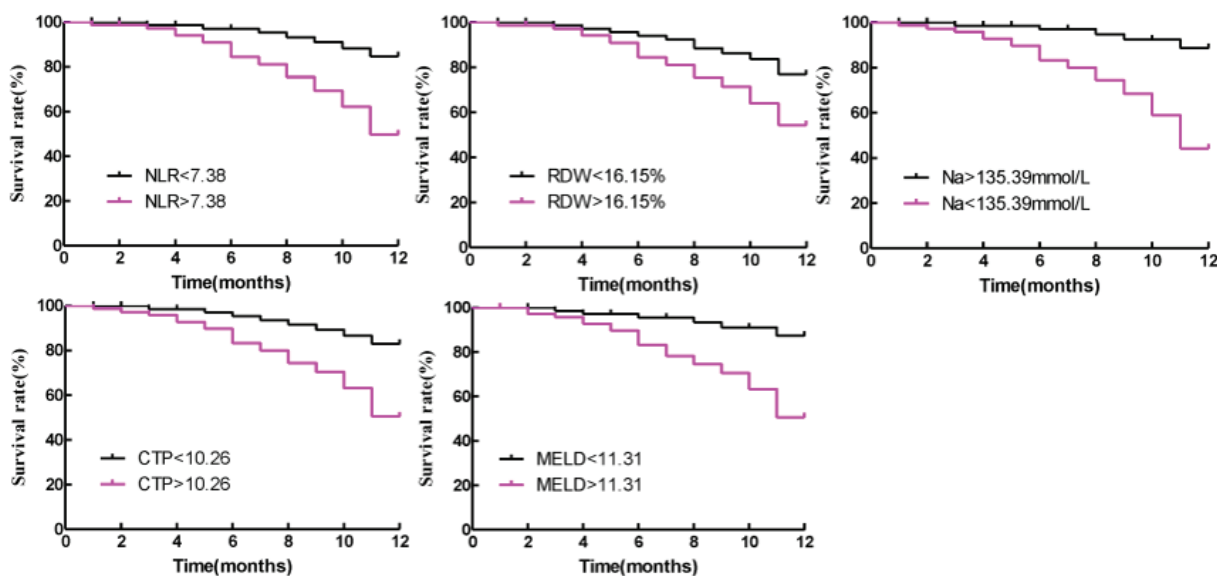


Fig. 3. Independent risk factors for survival of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis.

Youden's index was 0.678. The area under the RDW curve was 0.752, the 95% CI was 0.670-0.834, the optimal cut-off value was 16.22%, the sensitivity was 78.4%, the specificity was 78.7%, and the Youden's index was 0.571. The area under the serum sodium curve was 0.774, 95% CI was 0.695-0.853, the optimal cut-off value was 120.95 mmol/L, the sensitivity was 75.7%, the specificity was 85.3%, and the Youden index was 0.610. Besides, the area under the CTP score curve was 0.883, 95% CI was 0.823-0.942, the optimal cut-off value was 10.34 points, the sensitivity was 86.5%, the specificity was 90.7%, and the Youden's index was 0.772. The area under the MELD score curve was 0.894, the 95% CI was 0.839-0.948, the optimal cut-off value was 11.35 points, the sensitivity was 87.8%, the specificity was 88.0%, and the Youden's index was 0.758 (Fig. 4 and Table 3).

DISCUSSION

Patients with decompensated cirrhosis are prone to malnutrition, with an incidence rate of up to 60-100% in the advanced stage⁹. Verma *et al.* reported that the nutritional indices, BMI and Alb, significantly de-

clined in the patients with poor prognosis, so both of them can be used to predict the prognosis of patients with decompensated cirrhosis¹⁰. Likewise, we herein found that the BMI and Alb of the death group were significantly lower than those of the survival group. Probably, lipids and proteins are abnormally synthesized due to liver damage, which induces malnutrition, especially in patients with decompensated cirrhosis. As a result, the synthesis and decomposition of apolipoproteins and blood lipids are affected¹¹.

WBC count is usually employed to evaluate the inflammatory response. Generally, the count increases when the inflammatory response is enhanced¹². Consistently, this study exhibited that the count of WBC was significantly higher in the death group. Zhang *et al.* reported that NLR had a high predictive value for the occurrence of hepatitis B-related liver failure¹³. Additionally, Kalra *et al.* reported that NLR was an independent predictor for the 30-day death of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis¹⁴. The above conclusions are consistent with the results of this study. During the progression of chronic liver disease into the end

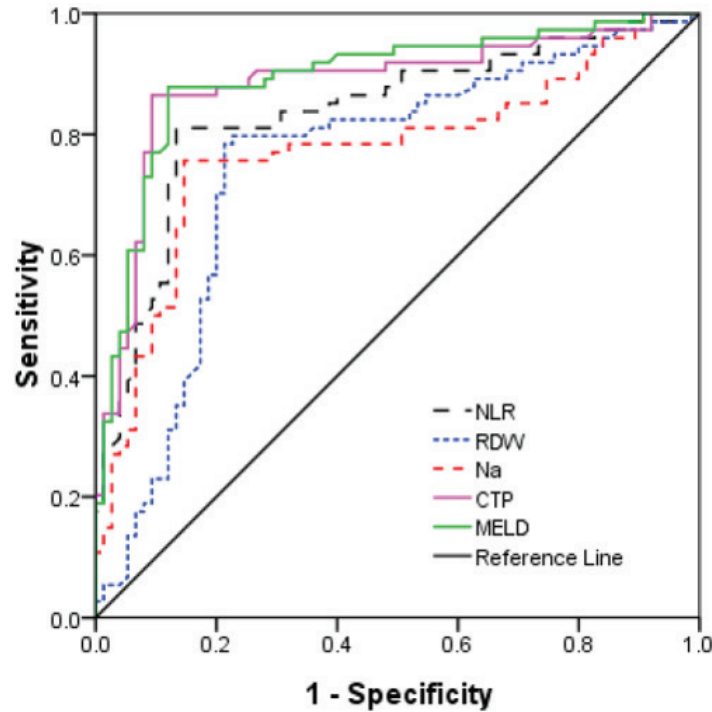


Fig. 4. Predictive values of independent risk factors for death of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis.

Table 3
Parameters of predictive efficiency.

| Parameter | NLR | RDW | Serum sodium | CTP score | MELD score |
|---------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------|--------------|
| Sensitivity | 81.1% | 78.4% | 75.7% | 86.5% | 87.8% |
| Specificity | 86.7% | 78.7% | 85.3% | 90.7% | 88.0% |
| Positive predictive value | 0.801 | 0.725 | 0.773 | 0.826 | 0.891 |
| Negative predictive value | 0.592 | 0.556 | 0.557 | 0.613 | 0.650 |
| Youden's index | 0.678 | 0.571 | 0.610 | 0.772 | 0.758 |
| AUC | 0.836 | 0.752 | 0.774 | 0.883 | 0.894 |
| 95%CI | 0.770~0.903 | 0.670~0.834 | 0.695~0.853 | 0.823~0.942 | 0.839~0.948 |
| Optimal cut-off value | 7.49 | 16.22% | 120.95 mmol/L | 10.34 points | 11.35 points |

stage, the excessive immune response stimulates the activation of T and B-lymphocytes to release a large number of inflammatory mediators to induce inflammation, oxidative stress, and chemotaxis. As a result, neutrophils stored in the liver sinusoids are largely released into the blood, then increasing the neutrophil count in the peripheral blood¹⁵. In addition, the long-term malnutrition of patients with chronic liver disease not only

hinders lymphocyte synthesis but also promotes lymphocyte apoptosis, thus reducing the lymphocyte count and ultimately increasing NLR¹⁶.

Zhang *et al.* reported that RDW was positively associated with decompensated hepatitis B cirrhosis and gastrointestinal bleeding as an independent factor¹⁷. Besides, Ferdous *et al.* reported that RDW was significantly increased in patients with hepatitis B and

positively related to the disease severity¹⁸. Moreover, Wang *et al.* reported that RDW was closely correlated with the mortality rate of patients with hepatitis C cirrhosis¹⁹, which is consistent with the results of this study. RDW increases due to nutrient (such as folic acid, vitamin B12, and iron) deficiencies, aggravated erythrocyte destruction, inflammation, and bone marrow suppression. These conditions usually exist in patients with chronic liver disease, especially in those with decompensated hepatitis B cirrhosis²⁰. The incidence rate of complications increases in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis complicated by hyponatremia. Decreased serum sodium levels shorten the average survival time, and the mortality rate is elevated²¹. The decreased level of serum sodium is an independent risk factor leading to poor prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis²². This study further confirmed the above results. On the one hand, the damaged liver attenuates the inactivation of antidiuretic hormone, which facilitates the reabsorption of water by renal tubules, leading to water retention. On the other hand, the energy-rich phosphate linkage is reduced due to liver function decline. The sodium pump activity decreases, thereby inhibiting the activity of Na⁺-K⁺-ATPase, and resulting in the difficulties of K⁺ entering cells and Na⁺ releasing from cells. Additionally, plasma colloid osmotic pressure is reduced by hypoproteinemia, which causes fluid extravasation and dilutional hyponatremia²³.

CTP and MELD scores are commonly utilized to evaluate the liver reserve function, disease severity, and prognosis of patients with cirrhosis in clinical practice. Fernández Carrillo *et al.* found that the CTP and MELD scores of patients with decompensated cirrhosis were significantly higher in the death group than those in the survival group and could be considered as independent risk factors for death and predictors for prognosis²⁴. Similar to our study, Qiang *et al.* reported that CTP and MELD scores were positively related to NLR and RDW

and negatively associated with serum sodium²⁵. Notably, there are also differences between the results of this study and those mentioned above, which may be ascribed to the differences between individuals, detection reagents, determination criteria, and sample size.

Regardless, this study has some limitations. This is a retrospective single-center study with a small sample size, and the indicator levels of patients with different complications were not analyzed. Further prospective multicenter studies with larger sample sizes are ongoing in our group. More detailed data can be obtained through grouping based on different complications of patients to provide reliable guidance for clinical practice.

In conclusion, NLR, RDW, serum sodium, CTP score, and MELD score can be considered as critical indices to evaluate and predict the prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis.

Funding

This study was not financially supported.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author's ORCID numbers

- Li Li: 0000-0002-8278-638X
- Jihui Zhang: 0000-0001-9251-7047
- Peng Yuan: 0000-0002-4305-6499
- Jianjun Song: 0000-0003-0401-3936
- Zhenhui Lu: 0000-0002-8983-7901
- Guozhong Zhao: 0000-0001-6218-0973

The authors' contributions are listed below

LL: Study design and drafting of this manuscript. JZ: Study design and performance. PY: Study performance and data collection. JS: Study performance and data

analysis. ZL: Study design and significant revision of this manuscript. GZ: Study design and significant revision of this manuscript. All coauthors have approved the submission and publication of this manuscript.

REFERENCES

1. Yoshiji H, Nagoshi S, Akahane T, Asaoka Y, Ueno Y, Ogawa K, Kawaguchi T, Kurosaki M, Sakaida I, Shimizu M, Taniai M. Evidence-based clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2020. *J Gastroenterol* 2021; 56(7): 593-619. <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01788-x>.
2. Surial B, Wyser D, Béguelin C, Ramírez-Mena A, Rauch A, Wandeler G. Prevalence of liver cirrhosis in individuals with hepatitis B virus infection in sub-Saharan Africa: Systematic review and meta-analysis. *Liver Int* 2021; 41(4): 710-719. <https://doi.org/10.1111/liv.14744>.
3. Lapointe-Shaw L, Georgie F, Carlone D, Cerocchi O, Chung H, Dewit Y, Feld JJ, Holder L, Kwong JC, Sander B, Flemming JA. Identifying cirrhosis, decompensated cirrhosis and hepatocellular carcinoma in health administrative data: a validation study. *PLoS One* 2018; 13(8): e0201120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201120>.
4. Xie Y, He C, Wang W. A potential novel inflammation biomarker for predicting the prognosis of decompensated liver cirrhosis. *Ann Med* 2022; 54(1): 3201-3210. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2142277>.
5. Higgins DC, Kuncio DE, Johnson CC, Viner KM. Influence of birth origin and risk factor profile on hepatitis B mortality: Philadelphia, PA 2003–2013. *Ann Epidemiol* 2018; 28: 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.12.006>.
6. Chinese Society of Hepatology, Infectious Diseases Branch of Chinese Medical Association. [Diagnostic Criteria for Chronic Hepatitis B (2015)]. *Chin J Integr Tradit Western Med Liver Dis* 2015; 25: 384.
7. Akarapatima K, Chang A, Prateepchai-boon T, Pungpipattrakul N, Songjamrat A, Pakdeejit S, Rattanasupar A, Piratvisuth T. Predictive outcomes using child-turcotte-pugh and albumin-bilirubin scores in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *J Gastrointest Cancer* 2022; 53(4): 1006-1013. <https://doi.org/10.1007/s12029-021-00743-6>.
8. Kim KM, Shim SG, Sinn DH, Song JE, Kim BS, Kim HG. Child-Pugh, MELD, MELD-Na, and ALBI scores: which liver function models best predicts prognosis for HCC patient with ascites? *Scand J Gastroenterol* 2020; 55(8): 951-957. <https://doi.org/10.1080/00365521.2020.1788139>.
9. Rachakonda V, Borhani AA, Dunn MA, Andrzejewski M, Martin K, Behari J. Serum leptin is a biomarker of malnutrition in decompensated cirrhosis. *PLoS One* 2016; 11: e0159142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159142>.
10. Verma N, Kaur A, Sharma R, Bhalla A, Sharma N, De A, Singh V. Outcomes after multiple courses of granulocyte colony-stimulating factor and growth hormone in decompensated cirrhosis: a randomized trial. *Hepatology* 2018; 68: 1559-1573. <https://doi.org/10.1002/hep.29763>.
11. Privitera G, Spadaro L, Marchisello S, Fede G, Purrello F. Abnormalities of lipoprotein levels in liver cirrhosis: clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2018; 63(1): 16-26. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4862-x>.
12. Zhang J, Qiu Y, He X, Mao W, Han Z. Platelet-to-white blood cell ratio: a novel and promising prognostic marker for HBV-associated decompensated cirrhosis. *J Clin Lab Anal* 2020; 34(12): e23556. <https://doi.org/10.1002/jcla.23556>.
13. Zhang Y, Zhao R, Shi D, Sun S, Ren H, Zhao H, Wu W, Jin L, Sheng J, Shi Y. Characterization of the circulating microbiome in acute-on-chronic liver failure associated with hepatitis B. *Liver Int* 2019; 39: 1207-1216. <https://doi.org/10.1111/liv.14097>.
14. Kalra A, Wedd JP, Bambha KM, Gralla J, Golden-Mason L, Collins C, Rosen HR, Biggins SW. Neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with proinflammatory neutrophils and predicts death in low model for end-stage liver disease patients with cirrhosis. *Liver Transplant* 2017; 23: 155-165. <https://doi.org/10.1002/lt.24702>.

15. Liu K, Wang FS, Xu R. Neutrophils in liver diseases: pathogenesis and therapeutic targets. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(1): 38-44. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00560-0>.
16. Mustika S, Waafi AK. Platelet-lymphocyte ratio and neutrophil-lymphocyte ratio as early mortality predictors for patients with end-stage chronic liver disease. *Indones J Gastroenterol Hepatol Dig Endosc* 2022; 23(2): 123-132. <https://doi.org/10.24871/2322022223-232>.
17. Zhang M, Chen S, Zhu X, Huang A, Lan F, Chen H, Li S, Qin X. Value of red cell distribution width in assessing the severity of hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *Clin Lab* 2017; 63: 1467-1474. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.170331>.
18. Ferdous A, Ahmed AN, Rahman SA, Hasan T, Mahzabeen L. Role of red cell distribution width to platelet ratio in predicting hepatic fibrosis in chronic hepatitis B. *Myensingh Med J* 2018; 27: 550-560.
19. Wang J, Huang R, Yan X, Li M, Chen Y, Xia J, Liu Y, Jia B, Zhu L, Zhang Z, Zhu C. Red blood cell distribution width: A promising index for evaluating the severity and long-term prognosis of hepatitis B virus-related diseases. *Digest Liver Dis* 2020; 52: 440-446. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.12.144>.
20. Owoicho O, Tapela K, Olwal CO, Djomkam Zune AL, Nganyewo NN, Quaye O. Red blood cell distribution width as a prognostic biomarker for viral infections: prospects and challenges. *Biomark Med* 2022; 16(1): 41-50. <https://doi.org/10.2217/bmm-2021-0364>.
21. Patel R, Poddar P, Choksi D, Pandey V, Ingle M, Khairnar H, Sawant P. Predictors of 1-month and 3-months hospital readmissions in decompensated cirrhosis: a prospective study in a large Asian cohort. *Ann Hepatol* 2019; 18(1): 30-39. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7859>.
22. Barakat AA, Metwaly AA, Nasr FM, El-Ghannam M, El-Talkawy MD. Impact of hyponatremia on frequency of complications in patients with decompensated liver cirrhosis. *Electron Physician* 2015; 7: 1349-1358. <https://doi.org/10.14661/1349>.
23. Liamis G, Filippatos TD, Lontos A, Elisaf MS. Hyponatremia in patients with liver diseases: not just a cirrhosis-induced hemodynamic compromise. *Hepatol Int* 2016; 10: 762-772. <https://doi.org/10.1007/s12072-016-9746-1>.
24. Fernández Carrillo C, Lens S, Llop E, Pascasio JM, Crespo J, Arenas J, Fernández I, Baliellas C, Carrión JA, de la Mata M, Buti M. Treatment of hepatitis C virus infection in patients with cirrhosis and predictive value of MELD: Analysis of data from the Hepa-C registry. *Hepatology* 2017; 65: 1810-1822. <https://doi.org/10.1002/hep.29097>.
25. Qiang L, Qin J, Sun C, Sheng Y, Chen W, Qiu B, Chen X, Chen Y, Liu F, Wu G. A novel predictive model based on inflammatory markers to assess the prognosis of patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol* 2020; 20(1): 301. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01437-2>.

Mucormicosis asociada a la COVID-19 en Venezuela: consideraciones en torno a un caso y revisión de la literatura.

Cristina Royero-León^{1,2,3}, Mayira Sojo-Milano^{4,5}, Ligia Pérez-Castro⁶, Dionelys Barazarte-Sánchez⁷, José B Golaszewski⁷, Rubén Muñoz-Gelvez⁷ y Fernando Gómez-Daza⁸

¹Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina. Departamento Clínico Integral del Sur.

²Hospital Metropolitano del Norte -Centro Científico- Naguanagua.

³Hospital “Dr. Miguel Malpica”, Guacara, estado Carabobo, Venezuela.

⁴MILANO Asesores-Consultores C.A., Maracay, Venezuela.

⁵Ministerio del Poder Popular para la Salud de Venezuela - Dirección General de Salud Ambiental - Dirección de Vigilancia Epidemiológica Ambiental, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

⁶Universidad del Zulia. Facultad de Odontología, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

⁷Hospital Universitario “Dr. Ángel Larralde”, Servicio de Cirugía Maxilofacial “Dr. Atilio Perdomo”. Naguanagua, estado Carabobo, Venezuela.

⁸Laboratorio de Micología y Enfermedades Tropicales. Centro Diagnóstico La Alegría, Urb. La Alegría, Valencia, estado Carabobo, Venezuela.

Palabras clave: anfotericina B; CAM; COVID-19; diabetes; mucormicosis; reporte de caso.

Resumen. La mucormicosis es una micosis emergente, oportunista, invasiva y severa, de distribución mundial, baja frecuencia y elevada morbi-mortalidad, asociada a estados de inmunodeficiencia. Su incremento como mucormicosis asociada a la COVID-19 (CAM o *COVID-19 associated mucormycosis*) se registra en la India y en varios países de las Américas. Se describe la presentación y manejo de un caso CAM y se valora la importancia clínica y de salud pública de sus características respecto a casos CAM y no-CAM reportados en la literatura médica. Se exponen, sobre una línea de tiempo, aspectos de diagnóstico epidemiológico, clínico, microbiológico, histopatológico, imagenológico y de su manejo multidisciplinario. Se trató de un paciente masculino de 64 años, procedente del centro-norte de Venezuela, con diabetes mellitus y antecedente de COVID-19 moderada, tratada en forma ambulatoria, quien presentó cuadro de mucormicosis rino-sinusal-orbitaria unilateral izquierda, con extensión dentomaxilar. Había iniciado con sinusitis, lesiones palatinas, dolor en región maxilar y movilidad dentaria, 19 días después del diagnóstico de la COVID-19. El diagnóstico micológico basado en histopatología, examen directo y cultivo, señaló *Rhizopus* spp. El caso se trató exitosamente

con anfotericina B, cirugía con abordaje endoscópico y control metabólico. Se discuten la posible influencia de la COVID-19 y su manejo en el desarrollo de la CAM y la importancia del acceso a la salud en esta situación. La mucormicosis debe considerarse entre las complicaciones potenciales en pacientes diabéticos con la COVID-19. La atención integral y el seguimiento de la salud del paciente con la COVID-19 deben mantenerse en todas sus fases.

COVID-19 associated mucormycosis in Venezuela: case report and literature review.

Invest Clin 2023; 64 (2): 206 – 225

Keywords: amphotericin B; CAM; COVID-19; diabetes; mucormycosis; case report.

Abstract. Mucormycosis is an emerging, severe, opportunistic, invasive mycosis with a worldwide distribution, low frequency, and high morbidity and mortality linked to immunodeficiency conditions. A significant increase in COVID-19-associated mucormycosis (CAM) has occurred in countries such as India and several countries of the Americas. We describe the presentation and management of a CAM case and discuss the clinical and public health significance of its characteristics concerning CAM and non-CAM cases reported in the literature. Using a timeline, epidemiological, clinical, microbiological, histopathological, imaging features, and multidisciplinary interventions in this CAM case are presented. A 64-year-old male patient from the north center of Venezuela, with a history of diabetes mellitus and a home-cared moderate COVID-19 episode treated on an outpatient basis, presented with left unilateral rhino-sinus-orbital mucormycosis with dentomaxillary extension. His first symptoms and signs were sinusitis, palatal changes, maxillary region pain, and loosening of teeth 19 days after the COVID-19 diagnosis. Mycological diagnosis supported by histopathology, direct examination, and culture indicated a *Rhizopus* spp. infection. The patient was successfully treated with amphotericin B, surgery with an endoscopic approach, and metabolic control. We discuss the influence of COVID-19 and its management regarding CAM development, as well as the importance of access to healthcare in this situation. Mucormycosis should be considered among potential complications in diabetic patients with COVID-19. Therefore, comprehensive care and monitoring must be provided in all phases of the COVID-19 clinical picture.

Received: 17-06-2022 *Accepted:* 09-12-2022

INTRODUCCIÓN

Mucormicosis es un término que abarca un amplio espectro de infecciones oportunistas severas, causadas por hongos mucorales¹. De distribución mundial, las mucormicosis se encuentran asociadas a condiciones de inmunodeficiencia y describen un curso agresivo por efecto angio-invasivo que ocasiona necrosis y mucho daño tisular. Los hongos del orden Mucorales son cosmopolitas, ubicuos en el medioambiente, donde crecen rápidamente y liberan al aire gran cantidad de esporas, a las cuales los humanos se encuentran ampliamente expuestos^{2,3}. Aunque la morbilidad por mucormicosis no ha podido medirse con exactitud, por falta de estudios poblacionales, la evidencia señala su carácter emergente, con un rápido incremento de su incidencia a nivel global en los últimos quince años, así como su importante concurrencia en casos de diabetes mellitus^{4,5}. Su elevada tasa de mortalidad puede variar entre 40% y 80% y depende primeramente de la forma clínica que adopte, la condición basal del paciente o comorbilidad y el tipo de hongo².

En medio del segundo año de la pandemia por COVID-19, emerge la mucormicosis asociada a esta virosis, señalada como CAM o *COVID-19 associated mucormycosis*, lo cual introduce cambios importantes en su frecuencia de reporte a nivel mundial, donde destaca la India⁶⁻⁸. En América del Sur se había registrado un incremento paulatino de mucormicosis antes del tiempo de la pandemia por COVID-19⁹. Los casos de CAM se han reconocido como un evento importante en Estados Unidos, México, Brasil^{8, 10, 11} Chile^{10, 11}, Honduras, Uruguay, Paraguay¹⁰ y Argentina¹².

Considerando los términos de la lista de verificación CARE (Case Report Guidelines), se describe la presentación clínica y manejo de un caso de mucormicosis rino-sinusal-orbitaria asociado a un episodio de la COVID-19 en un paciente con diabetes mellitus tipo 2, procedente de la región centro-norte de Venezuela. Se revisa el significado de sus

características respecto al conocimiento actual sobre casos CAM (mucormicosis asociada a la COVID-19, según literatura del año 2019 a mayo de 2022) y no-CAM (mucormicosis no relacionada con COVID-19) y se discuten, en términos del acceso y cobertura sanitarias universales, las implicaciones de su ocurrencia. Mediante un desarrollo narrativo sobre la línea de tiempo, se describen aspectos de diagnóstico epidemiológico, clínico, de laboratorio e imagenológico, así como del manejo y tratamiento multidisciplinarios de este caso CAM.

PRESENTACIÓN Y MANEJO DEL CASO

Se trata de un paciente masculino de 64 años de edad, natural y procedente de la región centro-norte de Venezuela, quien se presenta a la consulta de Medicina Interna e Infectología del Hospital Metropolitano del Norte (HMN), centro de salud privado (CSP) del estado Carabobo, con 79,500 kg de peso; 1,82 m de talla; índice de masa corporal 24 kg/m²; tensión arterial 120/80 mmHg; de ocupación funcionario de aduana en ambiente de oficina, Graffar VVI. Diabetes mellitus tipo 2 de 15 años de evolución, insulino-requiriente desde tiempo anterior a sus motivos de consulta, en tratamiento con insulina NPH 30u más glimepirida (4 mg/día). Antecedentes de vigilancia de enfermedad periodontal; hábito tabáquico hasta hace 25 años y práctica ocasional de cocinar con leña; hábito alcohólico ocasional, llegando a embriaguez; antecedentes quirúrgicos entre los años 2006 y 2018, sin complicaciones, donde incluye la reducción de una fractura abierta de la muñeca izquierda, postraumática.

El día 20/03/2021 presenta escalofríos, disnea progresiva, fiebre y tos y solo un día expectoración marrón. Un Médico Internista (en CSP), realiza el diagnóstico de la COVID-19 (diagnóstico clínico inicial sin pruebas de laboratorio) y prescribe tratamiento ambulatorio con levofloxacina, polivitaminas, aspirina infantil; también, dexametasona 4 mg cada 8 horas por tres días y adi-

cionalmente metilprednisolona cada 8 horas por dos días, posterior a lo cual hace estado hiperglicémico (500 mg/mL), sin cetosis, que se controló después de 10 días. Recibe oxígeno húmedo con bigote nasal durante una semana, administrado con agua envasada en botellón, mismo medio empleado en la nebulización (budesonida, alternativamente con solución 0,9%). Los síntomas de la COVID-19 cedieron al cabo de 15 días, con prueba antigénica tardía negativa y serología positiva para inmunoglobulina G. La TAC (Tomografía Axial Computarizada) de tórax del 02/04/2021 presentó focos neumónicos con signo de halo invertido, signos de vidrio esmerilado bibasales a predominio derecho y de fibrosis pulmonar (Fig.1A). La evidencia combinada, clínica, radiológica y de laboratorio, en ese momento epidemiológico, se consideró consistente con la COVID-19.

Acude a Odontología General (CSP) el 08/04/2021, donde se realiza drenaje de abscesos en la región vestibular maxilar izquierda y se instaura tratamiento con clindamicina, amoxicilina/clavulánico y pregabalina. Se ordena realizar ortopantomografía. También consulta a Otorrinolaringología (CSP), donde se le diagnostica sinusitis. La TAC de cráneo (10/04/2021) describe imagen hiperdensa del seno maxilar izquierdo extendida a celdillas etmoidales izquierdas, cornetes nasales superior, medio e inferior izquierdo y seno esfenoidal izquierdo (Fig.1B).

El día 15/05/2021 el paciente nota aumento de volumen con lesión eritematosa blanda en el paladar duro, así como aumento de volumen en la región maxilar posterior izquierda, con dolor local, movilidad de estructuras dentarias en la arcada superior, parestesias en el labio superior con acentuación del dolor e irradiación hacia el globo ocular ipsilateral.

Sin presentar mejoría, el 20/05/2021 consulta al Servicio de Cirugía Bucal y Maxilofacial del Hospital Universitario "Dr. Ángel Larralde" - Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (HUAL-IVSS), donde los es-

pecialistas describen aumento de volumen de la hemicara izquierda, con dolor pulsátil irradiado al ojo izquierdo. Al proceder a la odontectomía de las estructuras móviles 25, 26 y 27, junto con ellas se desprende espontáneamente un fragmento del hueso maxilar (tabla vestibular y palatina). Bajo la impresión diagnóstica de seno maxilar ocupado (la ortopantomografía mostraba velamiento del seno maxilar izquierdo) y osteonecrosis maxilar, se toma la biopsia para estudio histopatológico. El Laboratorio de Patología Bucal y Maxilofacial (laboratorio independiente, sector privado) describe al examen microscópico (20/05/2021): extensa necrosis, tanto de tejido blando y como de tejido óseo, severo infiltrado inflamatorio mixto a predominio mononuclear y presencia de hifas grandes, abundantes, prominentes, no tabicadas y ramificadas, diagnósticas de mucormicosis (Fig.1C).

El día 25/05/2021, en consulta con Medicina Interna/Infectología del HMN (referido por el HUAL-IVSS), el paciente se presenta en buenas condiciones generales, con dolor a la digitopresión sobre la región malar izquierda y con un soplo grado II/IV en el foco aórtico, como todo dato positivo al examen físico. Al no observarse lesiones sugestivas de mucormicosis, según los criterios clásicos de Smith y Krichner citados⁸, en las áreas intervenidas en la cavidad oral o adyacentes (Fig.1D), se ordena repetir el estudio micológico y el 26/05/2021, el Laboratorio de Micología y Enfermedades Tropicales (laboratorio independiente, sector privado) realiza examen directo y cultivo en muestras del área de las odontectomías, del maxilar y de la fosa nasal izquierdos, dando como resultado mucormicosis en tejido del seno maxilar izquierdo.

El reporte del Laboratorio Micológico detalla: a) Sobre la muestra del tejido maxilar, bajo microscopía directa con KOH se observaron moderadas hifas, hialinas, cenocíticas (no tabicadas), gruesas, tortuosas, algunas acintadas, ramificadas en ángulo recto (Fig.1E). Igual imagen se apreció en

el extendido con tinción de Giemsa, donde además se reportaron escasos polimorfonucleares neutrófilos, escasos linfocitos, escasos macrófagos, escasa microbiota bacteriana de morfología mixta y no se observaron formas micóticas intracitoplasmáticas. Al examen directo con tinta china (tinción al negativo) no se observaron formas micóticas capsuladas. El cultivo de la muestra reveló desarrollo repetitivo del hongo con aspecto filamentoso, *Rhizopus* spp. Y b) Sobre la muestra del tejido de fosa nasal izquierda, al examen directo con KOH y con tinta china, no se observaron formas micóticas; en el extendido con Giemsa se observaron escasas células (polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, macrófagos), sin presencia de formas micóticas. Luego de cinco días de incubación, no hubo desarrollo de hongos en el cultivo.

El Servicio de Neurocirugía (HUAL-IVSS) no observó lesión del tejido cerebral en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con gadolinio del día 27/05/2021. Bajo supervisión continua del equipo integrado por el Internista Infectólogo y los Cirujanos Buco-Maxilofaciales, el 07/06/2021 el paciente se hospitaliza para iniciar tratamiento con anfotericina B (AmB), ciprofloxacina y meropenem, con una evolución favorable. Se programa la cirugía para el día 16/06/2021, planteándose realizar hemimaxilectomía de inframeoestructura izquierda y limpieza quirúrgica, con preservación del globo ocular ipsilateral.

Durante su estancia hospitalaria de 44 días en el HUAL-IVSS, el paciente recibió anfotericina B desoxicolato (AmB-D), a razón de 0,5 a 1 mg/kg/peso y durante una ventana de tres días, desde el 15/06/2021, anfotericina B liposomal (AmB-L) a razón de 3 mg/Kg/peso, por vía parenteral. La dosis acumulada antes de la cirugía, al día 15/06/2021 era de 875 mg, siendo de 1605 mg para el día 20/06/2021, para totalizar 2500 mg al momento del alta. Adicionalmente, recibió irrigación del seno maxilar izquierdo con solución de AmB desde el primer día de hospitalización. El paciente presentó leves

alteraciones de la función hepática y renal, así como de niveles del potasio, que se normalizaron.

El 09/06/2021, el paciente manifiesta mejoría de su cuadro, niega dolor, solo refiere obstrucción nasal. Es evaluado por Oftalmología (CSP, especializado en retina y vítreo), donde se valoran antecedentes quirúrgicos, agudeza visual, reflejos pupilares, campimetría por confrontación, tensión ocular y biomicroscopía. El fondo de ojo describe nervio óptico indemne, ovalado, de bordes bien definidos con emergencia y trayectos vasculares normales, área macular sin signos de patología, no se observan signos de retinopatía diabética; adelgazamiento arteriolar generalizado y algunos cruces arteriovenosos patológicos. En ojo izquierdo, lente intraocular y escleromalasia nasal en zona de cirugía previa de pterigion; en el área inferotemporal a la mácula se apreció área de exudación blanda en retina, posible vasculitis retinal en resolución.

El 10/06/2021 la evaluación espirométrica describe patrón ventilatorio restrictivo leve, sin respuesta significativa al broncodilatador inhalado, con buena colaboración al ejercicio y 97% de saturación por oximetría de pulso.

El 12/06/2021 se repite la TAC de cráneo donde se observa reducción de la lesión del seno paranasal y la comunicación oroantral izquierda, pero siguen tomadas áreas (Fig.1F) del maxilar, etmoides y esfenoides, además del septo -desviación mixta-, con compromiso del piso de la órbita.

El 14/06/2021, el paciente se encuentra estable, euglicémico, sin signos de flogosis ni necrosis en sitio de la boca, ni en las fosas nasales. Conserva dispositivos tipo dren en la región maxilar izquierda, para los lavados del seno maxilar, previos al acto quirúrgico (solución de 20 mg de AmB diluidos en 20 cc de agua destilada). Para esta fecha, completaba siete días bajo tratamiento antifúngico sistémico.

El 16/06/2021 se realiza la cirugía en el HUAL-IVSS, mediante abordaje intrabucaal

aplicando la técnica de *degloving* maxilar. Se hizo hemimaxilectomía de inframeoestructura, turbinectomía izquierda, hemietmoidectomía izquierda y desfuncionalización del seno esfenoidal. Hubo que realizar curetaje sobre la pared medial y piso de la órbita, con adelgazamiento de estos segmentos, pero preservando el hueso. El globo ocular nunca estuvo comprometido, por lo cual se trató de una mucormicosis rino-sinusal-obitatoria con limitado compromiso de la órbita e indemnidad anatómica y funcional del globo ocular; no presentó síndrome de fisura orbitaria. Durante la operación, el paciente se mantuvo con una infusión continua de AmB y, por último, sobre al área intervenida, se colocaron apósitos impregnados con AmB durante diez minutos, realizando lavados con solución de AmB antes y después de ello. El tiempo del acto quirúrgico fue de aproximadamente dos horas.

El estudio microscópico sobre las muestras obtenidas en el momento quirúrgico resultó negativo al estudio micológico, tanto al examen directo como en cultivo, mientras el estudio histopatológico detectó todavía el hongo en el tejido examinado (Fig.1G). Los exámenes micológicos y de histopatología fueron realizados por los mismos observadores y laboratorios que efectuaron el diagnóstico inicial y participaban del seguimiento del caso. Los detalles fueron los siguientes: A) Estudio micológico sobre cinco muestras distinguidas como: No. 1 Tejido óseo de región etmoidal, No. 2 Tejido blando de región esfenoidal, No. 3 Tejido blando de pared medial de la órbita izquierda, No. 4 Cornete superior, No. 5 Tubo endotraqueal, al examen directo con KOH y con tinta china (tinción al negativo): no se observaron formas micóticas. El cultivo a 28°C y 37°C de cada una de estas muestras, programadas para observarse a los 5 y a los 30 días de incubación, no presentó desarrollo de hongos de desarrollo lento. B) El estudio histopatológico, sobre biopsia excisional, maxilar izquierdo, describió características macroscópicas y microscópicas de ocho muestras de tejidos, distingui-

das como sigue (observaciones resaltantes): No.1 Hemimaxilar izquierdo y pterigoides: Inflamación crónica severa; No. 2 Piso de la órbita izquierda: Inflamación mixta severa; No. 3 Cornete inferior: Inflamación crónica severa; No. 4 Seno esfenoidal: Mucormicosis (áreas en forma de granulomas, con escasas hifas y esporangiosporas en su área central). –Las esporangiosporas, estructuras que se encuentran en el interior del esporangio de los hongos del orden Mucorales, se observan aisladas en el tejido cuando el esporangio se rompe–. No.5 Etmoidal óseo: Mucormicosis (ocasionales hifas); No. 6 Etmoidal blando: Mucormicosis (esporangiosporas); No. 7 Pared antero-medial del seno maxilar izquierdo: Mucormicosis (esporangiosporas); No.8 Pared medial de la órbita: Inflamación crónica severa (trabéculas de tejido óseo maduro vital).

En el postoperatorio mediano y tardío, el paciente mantuvo controles médicos integrales (HUAL-IVSS y HMN) a ritmo de tres, seis y doce meses, con una evolución favorable (Fig.1H). Se destaca: i) Al finalizar el tratamiento con anfotericina B, inició voriconazol a razón de 400 mg cada 12 horas como dosis de impregnación y luego 200 mg cada 12 horas, de mantenimiento, durante 1 mes. ii) Seis semanas después de la cirugía, en fase de rehabilitación, se le colocó una prótesis obturadora removible sujeta a sucesivos ajustes. iii) El 24/02/2022, sobre hisopado de las fosas nasales y del seno maxilar, el estudio micológico informó la no presencia de hongos al examen directo con KOH, examen directo con tinción de Kane negativo para bacterias y cultivo micológico a 28°C sin desarrollo de hongos, hasta los 30 días de incubación. iv) El 18/04/2022 se realiza RMN de control, la cual reporta reducción del tamaño del antro maxilar izquierdo, así como ausencia de cornetes izquierdos y de la arcada dentaria del maxilar izquierdo, en correlación con antecedente quirúrgico. Paredes orbitarias indemnes, con aspecto irregular del piso de la órbita izquierda; sin evidencia de lesiones de los globos oculares.

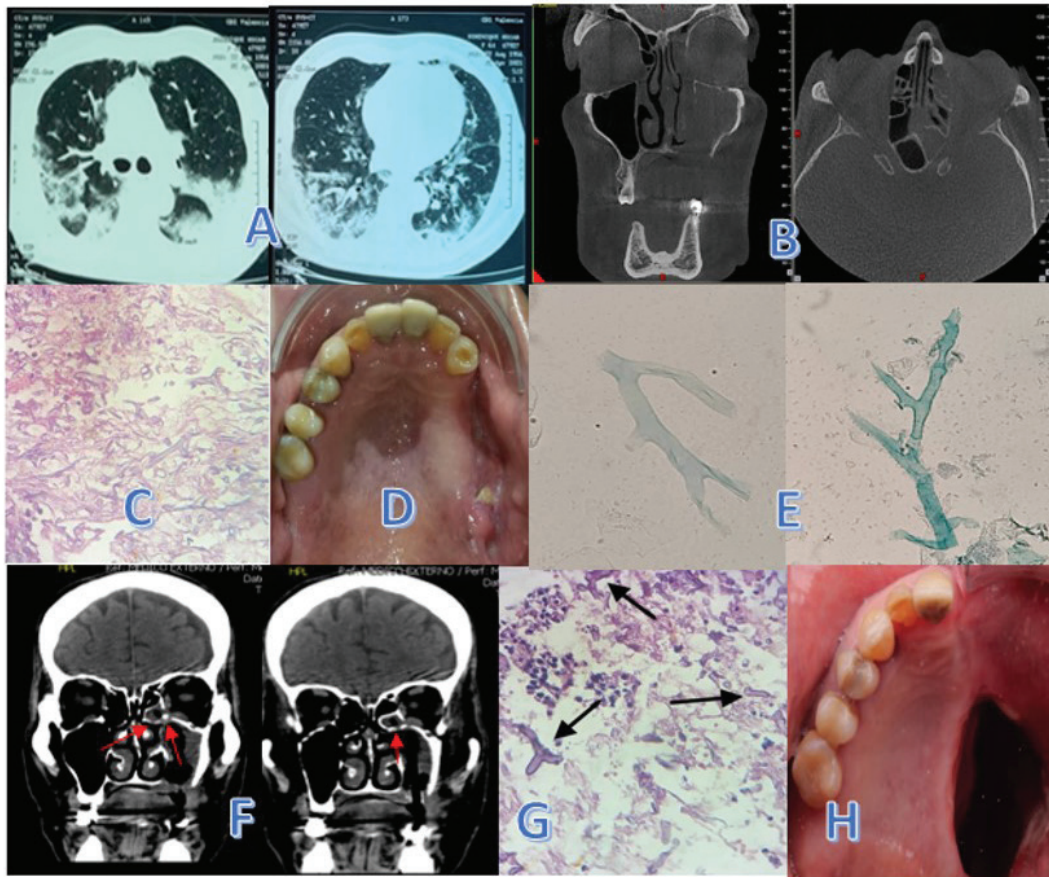


Fig. 1. (A) 02/04/2021. TAC de tórax, focos neumónicos con signo de halo invertido, signos de vidrio esmerilado bibasales a predominio derecho, engrosamiento intersticial sugestivo de fibrosis pulmonar. (B) 10/04/2021. TAC craneal, imagen hiperdensa en seno maxilar izquierdo extendida a celdillas etmoidales izquierdas, cornetes nasales superior, medio e inferior izquierdo y seno esfenoidal izquierdo. (C) 20/05/2021. Estudio histopatológico, extensa necrosis de tejido blando y óseo, severo infiltrado inflamatorio mixto y presencia de hifas grandes, abundantes, prominentes, no tabicadas y ramificadas, diagnósticas de mucormicosis. Tinción: Hematoxilina y eosina (HE), 20X. (D) 22/05/2021. Cavidad oral posterior a: odontectomías, debridamiento quirúrgico, cierre de la comunicación bucosinusal y estudio histopatológico (E) 26/05/2021. Microscopía directa con KOH: hifas hialinas, no tabicadas, gruesas, tortuosas, algunas acintadas, ramificadas en ángulo recto. (F) 12/06/2021). TAC craneal, reducción de la lesión del seno paranasal y de la comunicación oroantral izquierda; compromiso de: maxilar, etmoides y esfenoides, septo y piso de la órbita. Del tiempo postoperatorio: (G). 16/06/2021. Estudio histopatológico sobre muestra obtenida en el momento quirúrgico: hifas grandes, algunas acintadas, no segmentadas, ramificadas. Tinción: HE, 40X. (H) 18/09/2021. Cavidad oral tres meses después del momento quirúrgico.

Se planifica la reconstrucción del área intervenida y se prepara al paciente para realizar el cierre de la comunicación oroantral empleando un colgajo del músculo temporal y la reconstrucción maxilar con implantes cigomáticos, lo cual se programa para el mes de octubre de 2022.

DISCUSIÓN

La mucormicosis es una infección rara, aun entre los pacientes de alto riesgo¹³. Si bien se le considera una enfermedad esporádica y a los Mucorales, un grupo de agentes saprófitos, comunes en el medioambiente

natural y presentes en el doméstico y nosocomial¹⁴⁻¹⁶, su ocurrencia asociada a la COVID-19 en un paciente diabético refleja efectos de la interacción de diversos factores sobre la indemnidad del sistema inmunitario o la capacidad del organismo de combatir la infección. Junto a sus propias características, deben considerarse: A) la patogenia de la COVID-19 *per se*, B) el manejo de la COVID-19 respecto al uso de: i) los corticoesteroides, ii) los antibióticos, iii) dispositivos y materiales que alcanzan mucosas y vías respiratorias, C) la diabetes como comorbilidad inmunosupresora que subsidia los recursos patogénicos de un germen oportunista y D) el acceso a la salud, como canal para el diagnóstico temprano y el tratamiento específico, oportuno y precoz de esta micosis. Estos factores y su balance en el manejo del paciente con la COVID-19, marcan la diferencia en la evolución de la mucormicosis y en la sobrevida del paciente. Enfocamos así, como grandes aspectos discutibles en este caso: 1) sus características, frente a elementos que explican la asociación de la mucormicosis a la COVID-19 y 2) los determinantes del acceso a la salud reflejados en la atención del cuadro de mucormicosis.

Mucormicosis asociada a la COVID-19

El cuadro de la COVID-19 y su manejo suman elementos que favorecen la coinfección y el desarrollo de mucormicosis. El virus SARS-CoV-2 causa daño endotelial, deprime la actividad fagocítica de los glóbulos blancos (también los corticoesteroides, la comorbilidad), al tiempo que cuadros de hiperglicemia junto al aumento de interleucina-6 y acidosis, favorecen el incremento del hierro libre. Este medio ácido, hipóxico, con altos niveles de glucosa y hierro, favorece el desarrollo del hongo^{2,8}. También se han señalado los mecanismos por los cuales la acción del SARS-CoV-2 altera la función pancreática e induce o agrava la diabetes mellitus^{17,18}.

Por su parte, la patogenia de la mucormicosis explica su importante frecuencia en pacientes con diabetes y COVID-19, en

lo que algunos autores describen como una relación intrincada y compleja¹⁴. Las hifas del hongo crecen dentro y alrededor de los vasos sanguíneos², por lo cual entre los factores de virulencia de los hongos Mucorales se destaca su capacidad para invadir las células endoteliales, causando daño vascular, trombosis y necrosis, lo que facilita su diseminación y la extensión de las lesiones. El mecanismo de angioinvasión depende de la Proteína 78-Regulada por Glucosa (GRP-78) y es por ende favorecido por niveles altos de glucosa que inducen la expresión de dicha proteína¹⁹. A esto se suma que el grosor de las hifas dificulta su fagocitosis y las esporangiosporas secretan proteasas y toxinas que además de lesionar el endotelio, producen metabolitos antifúngicos capaces de disminuir la reacción inmunitaria ante ellos, evadiéndola. También, los Mucorales, son capaces de sobrevivir dentro del macrófago, lo cual se supone facilita la diseminación. El modo de acción de los Mucorales incluye diversos mecanismos que han sido descritos en detalle, en forma amplia y muy didáctica en la literatura^{2,14,19}.

Rasgos epidemiológicos básicos, como edad y sexo, cuentan para la evolución del cuadro de CAM. Sus casos se han descrito con mayor frecuencia (78,9%) en el sexo masculino^{6,8,11,20} y en las décadas de 50 y 60 años de edad^{11,21}, reportándose que en mayores de 54 años la CAM se asocia a alto riesgo de muerte⁶.

El periodo de incubación para la mucormicosis rino-cerebral no se ha establecido con claridad¹³ y un análisis sobre casos CAM ocurridos entre enero y mayo de 2021 reporta que puede ser muy variable¹¹. Una rigurosa revisión y metaanálisis sobre estudios de prevalencia fusionados, principalmente realizados en la India, con cohortes de pacientes hospitalizados, señala el inicio de la mucormicosis $14,59 \pm 6,88$ días después del diagnóstico de la COVID-19⁵. En nuestro caso, entre el inicio de la COVID-19 y el inicio de la semiología en cavidad oral y la sinusitis transcurrieron aproximadamente

19 días, lo cual también se refleja en el valor promedio de $18,9 \pm 9,1$ días encontrado en un estudio de casos y controles con 152 casos CAM²¹. Igualmente, correspondería a CAM tardía⁶, definida como la mucormicosis que ocurre a los ocho o más días de inicio de la COVID-19. Estos autores observaron cetoacidosis más frecuente en la CAM temprana que en la tardía (28% versus 5%) y que tanto la hipoxemia por COVID-19 como la administración inapropiada de glucocorticoides se asociaban con CAM tardía⁶. También en la India, en la notable serie de 2826 casos, la mucormicosis se manifestó mayormente entre los días 10 y 15 siguientes al inicio de la COVID-19, siendo que 56% inició antes del día 14 y 44% después de 14 días del diagnóstico de la COVID-19. En esta serie, 25 casos (25/2826 o 0,88%) ocurrieron hacia el día 19⁷. La revisión sistemática sobre 101 casos CAM (ocurridos hasta mediados de mayo de 2021 (81% procedentes de la India), también reportó mucormicosis más frecuente en pacientes con COVID-19 activa (40,6%) que en recuperación⁸.

Diabetes mellitus, mucormicosis y COVID-19

A nivel mundial, la diabetes mellitus compensada o descompensada, es la primera enfermedad subyacente en casos de mucormicosis^{4,11,14,22}, especialmente en países de bajo y mediano ingreso, donde se proyecta que los incrementos esperados en la prevalencia de diabetes acompañen los de la frecuencia de la mucormicosis^{3,4}. Reconocidos los mecanismos por los cuales la diabetes incrementa la morbimortalidad por COVID-19, ya sean pacientes infectados o recuperados, también se señala que los pacientes diabéticos son más propensos a adquirir COVID-19 acompañada de mucormicosis².

En casos no-CAM descritos en América del Sur, la mortalidad por mucormicosis asociada a diabetes, se incrementó de 45% a 58%, cuando el paciente recibió esteroides⁹. Aunque ya se conocía la mucormicosis entre las complicaciones de la diabetes me-

llitus, en el nuevo contexto de la pandemia por COVID-19, el uso de corticoesteroides y la diabetes (controlada o descompensada) destacan como los principales factores predisponentes en el desarrollo de la CAM^{14,23}, con frecuencias, respectivamente, de 78,7% y 60,4%⁶, 87% y 78%⁷ o de 76,3% y 80%⁸. También se describe la concurrencia de diabetes descompensada y la forma severa de la COVID-19 como una oportunidad al desarrollo de la mucormicosis²⁴, aunque ha ocurrido la CAM donde la COVID-19 es la única enfermedad subyacente, hasta en un tercio de los casos⁶. Al describir la CAM en ausencia de factores de riesgo considerados tradicionales, se ha atribuido el cuadro al uso de corticoesteroides, recomendándose su uso criterioso como acción preventiva²⁵.

Como parte del tratamiento para la COVID-19, el caso que se describe recibió corticoesteroides durante cinco días, presentando hiperglicemia sin cetosis. Sin embargo, se ha señalado un efecto acumulativo para los corticoesteroides y que aun cursos cortos (uso por 5-14 días) pueden asociarse a mucormicosis, especialmente en el paciente diabético⁸. En resumen, se ha señalado que el uso de esteroides y antibióticos en efecto dispara el inicio de la mucormicosis, especialmente en pacientes con enfermedades subyacentes².

Signos, síntomas y formas clínicas

La sinusitis en el paciente diabético debe hacer pensar en mucormicosis, según se ha señalado en casos no-CAM^{16,26}. Para casos CAM, ante la diabetes, es fundamental identificar signos de alarma y aplicar algoritmos para el diagnóstico y tratamiento inmediato de la mucormicosis rino-orbitaria-cerebral^{6,14}. En estos casos, como primeras señales de advertencia se tienen: dolor facial, bloqueo o congestión nasal, secreción sanguinolenta/marrón/negra con o sin dolor o sensibilidad local, lo cual puede ir asociado con fiebre, náuseas y cefalea. Son frecuentes las úlceras nasales o costras que se tornan negras más tarde.

También, los pacientes pueden desarrollar entumecimiento o edema cuando se afectan los senos paranasales maxilares, frontales o etmoidales. La afectación palatina puede observarse como una úlcera sobre el paladar superior que evoluciona a una necrosis oscura. También puede presentarse como dolor dentario y/o aflojamiento de piezas dentales maxilares y restricción del movimiento de la mandíbula ^{6,14}.

La evidencia global sobre 110 casos CAM destaca entre las características clínicas la afectación unilateral en 90%, así como la localización orbitaria, sinusal y palatina en 74%, 72% y 1,9%, respectivamente. La tasa de mortalidad en pacientes con compromiso bilateral resulta mayor (66,7%) que la de aquellos con manifestaciones unilaterales (44,3%) ¹¹.

Siendo la mucormicosis rino-orbitaria-cerebral la más común de las formas clínicas, se distingue una semiología oftálmica y no oftálmica. Entre los síntomas no oftálmicos más frecuentes se describen, en este orden: fiebre (26 - 44%), cefalea, edema facial (27 - 34%), dolor facial (3 - 22%), rinorrea, epistaxis, sinusitis (1 - 26%), hemiplejía, ulceración nasal, escara palatina (5 - 14%), odontalgia (0,5 - 3,5%), osteonecrosis y alteración de la conciencia (2 - 22%). La infección puede alcanzar al cerebro desde el área sino-nasal o desde la región retro-orbitaria, al extenderse a través de los senos etmoidales y esfenoidales ⁴.

En el caso que se describe, mientras el diagnóstico de sinusitis fue aparentemente menos llamativo que las lesiones en boca, resulta cuestionable el significado de la expectoración marrón referida como evento aislado durante la fase aguda de la COVID-19. Cabría considerar si el paciente ya cursaba con sinusitis en esta etapa, dados los factores que pudieron favorecer la implantación del hongo. En pacientes con la COVID-19, la mucormicosis afecta principalmente el ojo, la región oral y el cerebro ², observación que otorga importancia a las características del presente caso.

En un lapso de quince días, anteriores al inicio del tratamiento antifúngico, el cortejo sintomático del caso incluyó: en paladar duro, aumento de volumen y lesión eritematosa en mucosa, aumento de volumen del maxilar izquierdo (y de la hemicara), abscesos en la región vestibular, dolor local pulsátil en región malar irradiado al globo ocular, movilidad de estructuras dentarias, parestesias en labio superior y obstrucción nasal. Esta serie de signos y síntomas se refleja irregularmente en la frecuencia de 33% asignada al edema facial como signo y de 21% como síntoma, 23% para dolor facial/orbitario, 9% para obstrucción nasal, 0,6% para lesión oral o palatina tipo úlcera/escara y 0,1% para estructuras dentarias flojas, descritas en la India en más de dos mil casos CAM ⁷. El dolor y la movilidad dentaria, junto con evidencia radiológica de compromiso maxilar han sido observados en muchos casos CAM, mas no en casos no-CAM ⁶. En la serie de 55 casos no-CAM con afectación oral descritos en México hasta el año 2019, el signo más frecuente fue la ulceración palatina y mandibular con 92,7% y necrosis gingival (5,4%), en un grupo donde todos los pacientes presentaron inicialmente cefalea, edema facial, fiebre y dolor ²⁷. En general, los senos faciales son los lugares más comunes de infección, con 39% de frecuencia ²⁸, lo cual orientaría la situación que se describe. Respecto a la fiebre, aunque su forma prolongada se registra en la mayoría de los pacientes con mucormicosis, algunos pueden no presentarla ²³, como ocurrió en este caso.

Las formas clínicas de la mucormicosis generalmente señalan la puerta de entrada del hongo y se han clasificado comúnmente en número de seis, a saber: rino-orbitaria-cerebral (la forma más común de todas), pulmonar, cutánea, gastrointestinal, diseminada y un grupo misceláneo, con localizaciones poco frecuentes ², aunque otros autores enumeran siete, añadiendo la forma renal a las mencionadas ⁴. Las formas rino-orbitaria y rino-orbitaria-cerebral asocian significativamente alta mortalidad ⁶. La infección

rino-orbitaria-cerebral usualmente se origina en los senos paranasales, ocurriendo destrucción ósea y subsecuente invasión de la órbita, el ojo y el cerebro²³, lo cual valora el riesgo en el presente caso. Por otro lado, siguiendo la progresión anatómica y la severidad de la infección en cada segmento, se ha ponderado la mortalidad que acarrearán²² y en función de lo mismo, se ha propuesto un sistema de grados o estadios para facilitar la clasificación de los pacientes y personalizar su atención²⁹. Según estos autores, el presente caso se ubicaría en Estadio 3A o 3B²⁹ pues hubo limitado compromiso de la estructura ósea de la órbita, sin afectación de partes blandas alrededor del globo ocular, de movimientos oculares, ni de la visión.

El análisis de 851 reportes de casos no-CAM mostró asociación significativa entre la mucormicosis rino-orbitaria-cerebral y la diabetes mellitus²². La forma rino-orbitaria se considera típica entre los pacientes diabéticos²³ y se ha registrado en la India en 187 casos CAM con frecuencia de 62,6% frente a 23,5% de la forma rino-orbitaria-cerebral⁶ mientras esta se ha considerado la forma más frecuente (aproximadamente 50% a 80%) en pacientes no-CAM con diabetes⁴. Otros autores, sobre 101 casos CAM, posicionan la forma rino-sinusal como la más frecuente (88,9%) seguida de la rino-orbitaria (56,7%) y la rino-orbitaria-cerebral (22,2%). Finalmente, estos autores señalan que el término “mucormicosis rino-orbitaria-cerebral” se refiere a todo un espectro que va desde una enfermedad limitada rino-sinusal (con invasión de tejido rino-sinusal) que pasa por una enfermedad limitada rino-orbitaria (con progresión a órbita) hasta la enfermedad rino-orbitaria-cerebral (extendida al sistema nervioso central)⁸.

En el presente caso, la extensión dentomaxilar de la mucormicosis y las lesiones palatinas, se reflejan en la Mucormicosis con Afectación Oral (MAO o OIM, por *Oral Involvement Mucormicosis*) descrita en México, en 55 casos no-CAM registrados en un lapso de 34 años (1985-2019). La mayoría

de estos casos desarrolló compromiso palatino y mandibular; en 14,5% (8/55) la mucosa oral fue el sitio primario, tratándose de úlceras palatinas y lesiones gingivales. Esos casos evolucionaron rápidamente a la forma cerebral, lo cual llevó a los autores a señalar la MAO como primera manifestación de la mucormicosis rino-cerebral, de mal pronóstico²⁷. Por otro lado, en una importante revisión concentrada en la mucormicosis asociada a la atención en salud (también casos no-CAM), los autores describieron que la extracción dental (5 casos) y la anestesia local asociada (1 caso) podían causar mucormicosis durante el procedimiento, resumiendo que, de 5 casos observados con este antecedente, tres presentaron la forma rino-cerebral (dos de ellos con diabetes mellitus) y dos, osteomielitis del maxilar, siendo pacientes ambulatorios. En cinco de estos seis casos no se identificó el germen¹⁶.

Apoyo ventilatorio

Se ha reconocido la necesidad de administrar oxígeno bajo estrictas medidas de asepsia y uso de agua estéril, para prevenir la CAM²⁹. En una serie de 187 casos CAM, 17,6% manejó COVID-19 en su residencia, antes de desarrollar mucormicosis⁶, mientras en otra serie de casos CAM, 26% de los pacientes COVID-19 sintomáticos fue atendido en casa y 57% requirió soporte con oxígeno⁷. En el presente caso, el episodio de la COVID-19 moderada se manejó en forma ambulatoria y prácticas precarias relacionadas con la terapia con oxígeno y nebulización pudieron favorecer la entrada y desarrollo del hongo por vía inhalatoria. Si fuera el caso, se trataría de una “infección asociada a la atención de salud domiciliaria”³⁰, dado que el uso de agua no estéril se ha confirmado como una de las dos razones principales de contaminación de equipos humidificadores, con impacto en la salud de personas inmunodeficientes³¹. Las máscaras y mangueras de dispositivos nebulizadores y humidificadores de oxígeno pueden ser colonizadas por bacterias y hongos³². En nuestro contexto, el uso de agua envasada (en

botellón) para la administración de oxígeno y nebulizaciones, expuso al paciente a una fuente potencial de infección ²⁹, desplegando la importancia de los determinantes sociales y ambientales de la salud, en calidad de riesgos y peligros ambientales. Es importante señalar que la mayoría de las mucormicosis se adquiere en la comunidad ¹. Adicionalmente, el uso prolongado de mascarillas (respecto a no usarlas), así como hisopados nasofaríngeos repetidos, se han asociado al riesgo de desarrollar la CAM ²¹, dos aspectos a investigar en estos casos.

Diagnóstico

En el caso que se describe, transcurrieron unos 12 días desde el momento en que se habla de sinusitis (aproxima el inicio de la mucormicosis) hasta la fecha que registra el diagnóstico por la histopatología. Este valor se aproxima a la mediana de 10 días (variación 5 a 17 días) observados en 199 de 851 casos no-CAM ²².

El nivel diferencial de evidencia que aportan las técnicas diagnósticas ante la mucormicosis se puede apreciar en el caso venezolano. En general, el diagnóstico clínico, pese a su baja sensibilidad y especificidad, ayuda a activar la sospecha ²⁹ y orienta realizar precozmente pruebas de laboratorio. La microscopía directa, la histopatología y el cultivo representan los métodos esenciales de diagnóstico de esta micosis ^{3,14}; la primera posee una sensibilidad alrededor de 90%, la segunda aporta información diagnóstica en 80% de los casos y solo en 50% de cultivos se observa crecimiento del hongo ^{6,29}. Otros autores asignan 97% a la contribución de la histopatología ²², que en el presente caso, describió el aspecto grueso y acintado de la hifa, considerado un rasgo más distintivo que el aspecto tabicado y las ramificaciones en ángulo recto ²³. Adicionalmente, la imagenología (TAC) mostró opacidad del seno paranasal y osteólisis del seno, signos indicativos de enfermedad avanzada ²⁹.

Grupos de expertos recomiendan confirmar el diagnóstico de mucormicosis con

el cultivo y técnicas moleculares ²³. Sin embargo, dada su ubicuidad, los Mucorales podrían contaminar los cultivos micológicos, por lo que se considera que su observación al microscopio en las biopsias de los tejidos infectados (hifas anchas, sin tabiques o poco tabicadas y ramificadas en ángulo recto) tiene un valor diagnóstico mucho mayor que su aislamiento en el cultivo, aunque este debe realizarse ^{1, 22}. Debido a la estructura de la pared celular de los Mucorales, no se dispone de biomarcadores que sí se emplean en otras infecciones fúngicas invasivas ¹. Aunque los caracteres morfológicos al microscopio permiten la identificación presuntiva, las técnicas moleculares aumentan la precisión diagnóstica ⁴. Las técnicas moleculares mediante PCR tienen alto potencial diagnóstico, dadas las altas concentraciones de ácidos nucleicos que se detectan en pacientes con mucormicosis ¹. Durante la última década, iniciativas mundiales han insistido en el desarrollo de diversas técnicas moleculares que permitan fortalecer la estrategia de diagnóstico en mucormicosis, mismas que esperan por su estandarización y evaluación clínica ^{19,33} y cuyo uso ha ido en aumento ²², aunque su disponibilidad se encuentra limitada para muchos países ³⁴.

La mayoría de las infecciones fúngicas están definidas por el género de la especie causal. La evidencia actual señala que la mucormicosis en seres humanos es causada por 38 especies diferentes, ubicadas dentro de 11 géneros ³⁵. Estos hongos presentan mecanismos complejos en su patogenicidad, que pueden ser especie-específicos y asocian una variabilidad genética importante, que complica la comprensión de la patogenicidad y vincula además cuadros de resistencia a los antifúngicos, ante los cuales la anfotericina B se mantiene como una excepción ¹⁹. En todo caso, cualquier especie patógena del orden Mucorales puede producir cualquier forma clínica de mucormicosis ¹⁶.

El género *Rhizopus* destaca como el agente causal de mucormicosis más importante en el mundo ³⁵ y siendo el de más

frecuente registro ^{4, 14, 22, 23} es también el principal género asociado a la forma rino-orbitaria-cerebral ^{2, 22, 35}. Se ha señalado que la especie del hongo determina diferencias en el cuadro clínico y su identificación resulta de extrema importancia para comprender mejor la epidemiología de la mucormicosis ²³. En los 55 casos no-CAM con afectación oral precitados, se aisló *Rhizopus arrhizus* con 67,2% de frecuencia ²⁷, mientras en otros 143 casos no-CAM descritos para América del Sur, la frecuencia por *R. arrhizus* describió una letalidad de 65%, misma que varió entre 87,5% solo para Brasil y 50% para otros países, entre los cuales Venezuela aportaba siete casos de la serie ⁹. Igualmente, en la India, *R. arrhizus* encabezó la lista de agentes, en una serie de casos CAM donde los autores no encontraron asociación entre la especie micótica y la ubicación anatómica de las lesiones ⁶.

Tratamiento de elección y duración del tratamiento

El tratamiento efectivo de la mucormicosis impone combinar la administración sistémica de antifúngicos, el debridamiento quirúrgico ^{23, 34}, el control de factores de riesgo ²⁹ y de enfermedades de base. El tratamiento médico-quirúrgico precoz, oportuno y preciso mejora la sobrevida del paciente ^{6, 34}.

La mortalidad se reduce significativamente si el paciente recibe antifúngicos, siendo mayor la sobrevida cuando se administra anfotericina B en formulación lipídica (AmB-L) comparada con desoxicolato (AmB-D) ⁹, dado el mejor índice terapéutico de la primera ¹, que la convierte en el fármaco de elección ^{36, 37}. Es así como para todas las formas clínicas de la mucormicosis, la más alta recomendación terapéutica con antifúngicos corresponde al uso de AmB-L a razón de 5 a 10 mg/kg/día, y si no hay compromiso del sistema nervioso central, se recomienda usar 5 mg/kg ²³. La sobrevida se incrementa significativamente al combinar AmB-L con la cirugía ²⁶. En pacientes que no reciben

tratamiento, la mortalidad puede ser mayor de 90% ⁹.

Por otra parte, la duración óptima del tratamiento farmacológico de la mucormicosis no se ha establecido, resultando en una decisión que se personaliza y adapta a la evolución de cada caso. Sin embargo, hay consenso en que la remisión de los signos y síntomas de infección y una mejoría radiológica concurrente sustancial y completa son fundamentales, al tiempo que la respuesta clínica y la tolerancia a la terapéutica antifúngica deben sopesarse ^{23, 25}.

Lo que plantea la mucormicosis

La ocurrencia de una infección rara y agresiva como la mucormicosis en un paciente que lució competente para superar la COVID-19, señala la importancia de estrechar la vigilancia y seguimiento sobre la salud de los pacientes, en cualquier momento de la evolución de la COVID-19, con especial atención sobre condiciones de riesgo como la diabetes, los efectos del uso de corticosteroides y la aparición de signos y síntomas de alarma propios de la micosis ^{6, 29}. Es necesario considerar, no solo cómo las comorbilidades pueden cambiar el curso de un cuadro de COVID-19, sino cómo los propios efectos de la COVID-19 y de su manejo pueden ampliar la vulnerabilidad del medio interno y barreras naturales, potenciando factores predisponentes que facilitan el desarrollo de complicaciones como la mucormicosis.

Dondequiera que la mucormicosis ocurra durante el tiempo pandémico, su frecuencia se incrementa al asociarse a la COVID-19. La incorporación de la sigla CAM (*COVID-19-associated mucormycosis*) al argot científico denota la carga sanitaria por esta coinfección en el marco de la pandemia por la COVID-19.

El acceso a la salud: Atención del paciente y determinantes estructurales

La ocurrencia de un caso de mucormicosis desafía las condiciones del sistema

de salud, devela su modelo de atención y la capacidad de respuesta institucional, probablemente agravando lo que ya ha hecho al respecto la pandemia por la COVID-19. Un caso de mucormicosis, sospechoso o confirmado, representa una emergencia médica y exige acciones sanitarias inmediatas^{10,23}. La notificación obligatoria de la COVID-19 implica que los problemas asociados también sean de notificación obligatoria¹², vinculando el derecho a la información y el derecho a la salud. Ciertamente, por tratarse de una enfermedad rara, la mucormicosis no ha sido de notificación obligatoria en gran cantidad de países. La India, solo tras el incremento extraordinario de su incidencia, principalmente en su forma CAM, la declaró notificable a mediados de mayo de 2021⁵. Además de este aspecto básico de la vigilancia, se ha propuesto que el enfoque terapéutico de la COVID-19 incluya guías para el manejo de mucormicosis, con algoritmos, alternativas terapéuticas y protocolos de investigación^{13,23}.

Importante insistir en que el diagnóstico y tratamiento precoces son cruciales para la cura y supervivencia del paciente con mucormicosis^{2,3,23,36}, dada la rápida diseminación de la infección. Infrecuente y de diagnóstico difícil^{3,23}, las manifestaciones inespecíficas pueden distraer y desestimar su identificación, por lo cual sentar la sospecha clínica en la comunidad general y en el equipo de salud requiere la comunicación del evento y la discusión de la experiencia de su manejo, como ha sido el objetivo del presente trabajo. Es estratégico promover el conocimiento sobre los factores de riesgo y signos de alarma^{3,14,25,29}, tanto como el trabajo multidisciplinar en red, que brinde un manejo integral, integrado y particularmente oportuno para el paciente. Advertir especialmente al paciente diabético, de alta por la COVID-19, sobre estos signos de alarma, es importante¹⁴.

La CAM o mucormicosis asociada a la COVID-19, además de reconocerse como una epidemia dentro de la pandemia en curso²⁰, se considera un fenómeno sindémico^{21,38} porque

expresa interacciones biológicas y sociales. Un caso CAM pone de manifiesto los aspectos fundamentales de la cobertura universal en salud como concepto aplicado, a saber: i) el acceso a la salud (servicios de promoción, prevención, tratamiento y rehabilitación, bajo el enfoque determinantes de la salud) que conduce a una buena salud y ii) protección financiera, donde se remedia el problema de salud sin acarrear pobreza³⁹. En el lapso de un mes, solamente hasta el momento quirúrgico, el paciente tuvo contacto con al menos diez especialistas en distintas disciplinas de la salud, en su ruta de acceso al diagnóstico de mucormicosis oportuno y de calidad, que se concretó casi exclusivamente en el ámbito del sector privado del sistema de salud, generando gastos financieros totalmente por el paciente. Por otra parte, transcurrieron dieciocho días entre el diagnóstico micológico y la instauración del tratamiento antifúngico, también sufragado mayormente por el paciente. Su estancia hospitalaria, de 44 días, en un centro de salud público, la inicia para recibirlo junto al tratamiento quirúrgico. No recibir tratamiento antifúngico variaría la mortalidad por mucormicosis entre 89,5% y 100%⁹. Esto ilustra el nivel de oferta, en términos de seguridad humana, que un caso de mucormicosis demanda del sistema de salud y cómo su desenlace cambiaría sustancialmente, en función del acceso a la salud y la protección financiera.

La prevención de la CAM se basa principalmente en la sospecha temprana del cuadro¹⁴, en el control de factores de riesgo relativos a enfermedades de base³⁴ y en el manejo criterioso de medicamentos que afectan la inmunidad, todo lo cual puede ocurrir antes, durante y después el episodio de la COVID-19. Se enfatiza que debe sospecharse CAM en cualquier paciente diabético con infección presente o pasada por SARS-CoV-2 que haya recibido corticoesteroides¹⁴.

Si ya la COVID-19 *per se* impone atención diferenciada de los pacientes con comorbilidad, el caso aquí descrito marca la importancia de su seguimiento, recomendado especialmente durante al menos un mes

siguiente a la recuperación de la COVID-19, para el paciente diabético³⁴. Se debe considerar la importancia de valorar riesgos potenciales para un determinado paciente, su educación, la exhaustividad del interrogatorio y del examen físico, así como la sostenibilidad de pautas medicamentosas y no medicamentosas. Otros autores concuerdan en ello, tanto para efectos del paciente, su familia y su comunidad, como del personal asistencial y de tomadores de decisiones en salud⁹. La vigilancia en salud es una herramienta preventiva, siempre que medie una comunicación efectiva y educación entre todos los actores involucrados y competentes, rindiendo la capacidad de identificar precozmente cualquier cambio desfavorable en la salud, que modifique los resultados. Como punto de partida fundamental, la consideración y comunicación de su ocurrencia, así como de factores predisponentes y condicionantes colocará a la mucormicosis en el ojo vigilante del personal de salud y de la comunidad general.

Fortalezas y limitaciones

Este reporte coloca a Venezuela en el mapamundi de la CAM^{2,11,34}, actualiza su propio registro de mucormicosis y hace un llamado de atención sobre la importancia de comunicar e investigar este evento.

Como limitaciones en la descripción de este caso mencionaremos el no disponer de la RT-PCR sobre el diagnóstico del cuadro antecedente de la COVID-19. El caso presentado reúne criterios como caso probable de COVID-19, según las orientaciones provisionales de la Organización Mundial de la Salud (cumple criterios clínicos, criterios epidemiológicos al estar vinculado a transmisión comunitaria y describe signos indicativos de la COVID-19 en la TAC de tórax)^{40,41}, nivel de clasificación validado por otros autores al identificar casos de CAM^{7,21}. Por su lado, el diagnóstico micológico no incluyó técnicas de base molecular, por cuestiones de disponibilidad, limitación reconocida para varios contextos^{19,34}. Sin embargo, en el caso de la

mucormicosis, la confirmación diagnóstica se basa fundamentalmente en la microbiología, bien sea microscopía directa y/o cultivo o la histopatología, acompañando elementos semiológicos y radiológicos⁷.

COMENTARIOS FINALES

Hemos descrito un caso confirmado de mucormicosis asociada a la COVID-19, de localización rino-sinusal-orbitaria en un paciente masculino con diabetes mellitus compensada, tratado con antifúngicos, cirugía y control metabólico. Su evolución favorable y atípica (ubicada en el 10% de mucormicosis intracraneal no fatal), la consideramos consecuencia tanto de las buenas condiciones del paciente como de su acceso al diagnóstico y tratamiento específicos.

Este reporte hace un llamado de atención sobre los alcances del manejo de la COVID-19 y la importancia del seguimiento de la salud del paciente, particularmente si cursa con comorbilidades como inmunodeficiencia/trastorno metabólico, tipo diabetes mellitus, que puedan favorecer la instalación de infecciones oportunistas, probabilidad afianzada por el manejo de glucocorticoides y antibióticos. Enfatizar el apego a las buenas prácticas de atención y asistencia en salud, para ampliar todo lo posible la seguridad del paciente con la COVID-19 en cualquier etapa, representa una estrategia preventiva, tanto como lo es promover el conocimiento sobre los factores de riesgo para mucormicosis. Igualmente, advierte sobre la importancia del correcto acondicionamiento de dispositivos de terapia ventilatoria, para evitar que su manejo inadecuado contribuya a su desarrollo.

La amenaza sanitaria que representa una infección agresiva como la mucormicosis exige las mejores condiciones gestoras del sistema de salud, de modo que satisfacer los dos aspectos fundamentales de la cobertura sanitaria universal (acceso y protección financiera en salud), refleje la estructura del rol protector del Estado y traduzca una aten-

ción óptima, para su detección, diagnóstico y tratamiento precoces. Estimamos que investigaciones futuras deben valorar el significado de la ocupación del paciente y de la naturaleza de su entorno habitual, así como considerar la pertinencia de estudiar aspectos relativos al uso de mascarillas, ya que se ha demostrado su contaminación por hongos Mucorales, incluido *Rhizopus* spp⁴².

Dado el carácter emergente de la mucormicosis en su novedosa y severa asociación a la COVID-19, es aconsejable someter a discusión y contextualizar con los equipos de salud de todo nivel –administrativo-político, técnico, gerencial, académico y asistencial–, las mejores guías disponibles para ello^{1, 13, 23, 29} y materiales ejemplares¹⁴, que detallan su epidemiología y manifestaciones clínicas^{2, 4, 22}. Esto ampliará las competencias del equipo de salud, las capacidades básicas de detección y notificación del evento y apoyará la reorganización de las áreas de actuación sanitaria, de las redes profesionales del clínico, el epidemiólogo y el tomador de decisiones, para generar la respuesta rápida y efectiva de salud pública que requieren las personas.

Consideraciones éticas

El reporte de este caso para la comunidad científica se elaboró una vez obtenido por escrito el consentimiento informado del propio paciente y de su familia (07/06/2021), autorizando su publicación, reproducción y divulgación en soporte papel y en formato de libre acceso en internet. Se ha respetado el protocolo ético que media en el acceso a la información clínica y de laboratorio del paciente, en los centros de salud donde fue atendido. Respecto a la investigación con personas, el trabajo de reporte se condujo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 1975, revisada en 2013), la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la UNESCO (2005), y el Código de Ética para la Vida según el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela (2012).

AGRADECIMIENTO

Expresamos gratitud hacia nuestro paciente, por su atenta colaboración. A las expertas en Imagenología, Dra. Flor Ramos, del Instituto Diagnóstico de Caracas y Dra. Sandra Delpino, del Hospital Vargas de Caracas, por su valiosa guía en la selección del material. Igualmente, a las colegas Dra. María Judith Arteaga y Dra. Margory Sojo-Milano, por su atenta revisión y observaciones sobre el texto.

Financiamiento

Este trabajo no recibió aporte financiero de entes públicos ni privados.

Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Números ORCID de los autores

- Cristina Royero-León (CRL):
0000-0002-4621-8705
- Mayira Sojo-Milano (MSM):
0000-0001-8302-6924
- Ligia Pérez-Castro (LPC):
0000-0003-3451-0490
- Dionelys Barazarte-Sánchez (DBS):
0000-0001-9851-9748
- José B Golaszewski (JBG):
0000-0002-8948-8625
- Rubén Muñoz-Gelvez (RMG):
0000-0003-1505-4282
- Fernando Gómez-Daza (FGD):
0000-0003-2677-2589

Contribución de autoría

Todos los autores asumen la responsabilidad por la integridad y exactitud de los contenidos.

- Recopilación y resumen de la información: CRL/MSM/LPC/DBS/FGD/RMG/JBG.
- Concepto y diseño del trabajo: MSM/CRL.
- Revisión y preparación del borrador del manuscrito: MSM/LPC.
- Imágenes y Figura: LPC/DBS/CRL/MSM/JBG/RMG/FGD.
- Coordinación y revisión crítica de versiones sucesivas del manuscrito: MSM/LPC/RMG/CRL.
- Revisión y aprobación de la versión final: Todos los autores.

REFERENCIAS

1. Martín MT, Salavert M. Mucormicosis: perspectiva de manejo actual y de futuro. *Rev Iberoam Micol* 2021; 38: 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.003>
2. Mahalaxmi I, Jayaramayya K, Venkatesan D, Subramaniam MD, Renu K, Vijayakumar P, Narayanasamy A, Gopalakrishnan AV, Kumar NS, Sivaprakash P, Sambasiva KRS, Vellingiri B. Mucormycosis: An opportunistic pathogen during COVID-19. *Environ Res* 2021; 201: 111643. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111643>
3. Skiada A, Pavleas I, Droğari-Apiranthitou M. Epidemiology and diagnosis of Mucormycosis: An update. *J Fungi* 2020; 6(4): 265. DOI: 10.3390/jof6040265. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147877/>
4. Prakash H, Chakrabarti A. Global epidemiology of mucormycosis. *J Fungi* 2019; 5(1): 26. DOI: 10.3390/jof5010026.
5. Hussain S, Riad A, Singh A, Klugarová J, Antony B, Banna H, Klugar M. Global prevalence of COVID-19-Associated Mucormycosis (CAM): Living systematic review and meta-Analysis. *J Fungi* 2021; 7(11):985. <https://doi.org/10.3390/jof7110985>
6. Patel A, Agarwal R, Rudramurthy SM, Shevkani M, Xess I, Sharma R, Savio J, Sethuraman N, Madan S, Shastri P, Thangaraju D, Marak R, Tadepalli K, Savaj P, Sunavala A, Gupta N, Singhal T, Muthu V, Chakrabarti A, Mucocovi Network. Multicenter epidemiologic study of Coronavirus Disease–Associated Mucormycosis, India. *CDC. Early release. Emerg Infect Dis*. 2021; 27(9):2349-2359. DOI: 10.3201/eid2709.210934. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34087089/>
7. Sen M, Honavar SG, Bansal R, Sengupta S, Rao R, Kim U, Sharma M, Sachdev M, Grover AK, Surve A, Budharapu A, Ramadhin AK, Tripathi AK, Gupta A, Bhargava A, Sahu A, Khairnar A, Kochar A, Madhavani A, Shrivastava AK, Desai AK, Paul A, Ayyar A, Bhatnagar A, Singhal A, Nikose AS, Bhargava A, Tenagi AL, Kamble A, Nariani A, Patel B, Kashyap B, Dhawan B, Vohra B, Mandke C, Thrishulamurthy C, Sambare C, Sarkar D, Mankad DS, Maheshwari D, Lalwani D, Kanani D, Patel D, Manjandavida FP, Godhani F, Agarwal GA, Ravulaparathi G, Shilpa GV, Deshpande G, Thakkar H, Shah H, Ojha HR, Jani H, Gontia J, Mishrikotkar JP, Likhari K, Prajapati K, Porwal K, Koka K, Dharawat KS, Ramamurthy LB, Bhattacharyya M, Saini M, Christy MC, Das M, Hada M, Panchal M, Pandharpurkar M, Ali MO, Porwal M, Gangashetappa N, Mehrotra N, Bijlani N, Gajendragadkar N, Nagarkar NM, Modi P, Rewri P, Sao P, Patil PS, Giri P, Kapadia P, Yadav P, Bhagat P, Parekh R, Dyaberi R, Chauhan RS, Kaur R, Duvesh RK, Murthy R, Dandu RV, Kathiara R, Beri R, Pandit R, Rani RH, Gupta R, Pherwani R, Sapkal R, Mehta R, Tadepalli S, Fatima S, Karmarkar S, Patil SS, Shah S, Shah S, Shah S, Dubey S, Gandhi S, Kanakpur S, Mohan S, Bhomaj S, Kerkar S, Jariwala S, Sahu S, Tara S, Maru SK, Jhavar S, Sharma S, Gupta S, Kumari S, Das S, Menon S, Burkule S, Nisar SP, Kaliaperumal S, Rao S, Pakrasi S, Rathod S, Biradar SG, Kumar S, Dutt S, Bansal S, Ravani SA, Lohiya S, Ali Rizvi SW, Gokhale T, Lahane TP, Vukkadala T, Grover T, Bhesaniya T, Chawla U, Singh U, Une VL, Nandedkar V, Subramaniam V, Eswaran V, Chaudhry VN, Rangarajan V, Dehane V, Sahasrabudhe VM, Sowjanya Y, Tupkary Y, Phadke Y; members of the Collaborative OPAI-IJO Study on Mucormycosis in COVID-19 (COSMIC) Study Group. Epidemiology, clinical profile, management,

- and outcome of COVID-19-associated rhino-orbital-cerebral mucormycosis in 2826 patients in India – Collaborative OPAI-IJO Study on Mucormycosis in COVID-19 (COSMIC), Report 1. *Indian J Ophthalmol* 2021; 69 (7):1670-92. DOI: 10.4103/ijo.IJO_1565_21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8137376/>
8. Singh AK, Singh R, Joshi SR, Misra A. Mucormycosis in COVID-19: A systematic review of cases reported worldwide and in India. *Diabetes Metab Syndr* 2021; 15(4):102146. DOI: 10.1016/j.dsx.2021.05.019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8137376/>
 9. Nucci M, Engelhardt M, Hamed K. Mucormycosis in South America: A review of 143 reported cases. *Mycoses* 2019; 62(9):730-738. DOI: 10.1111/myc.12958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6852100/>
 10. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Alerta Epidemiológica: Mucormicosis asociada a COVID-19. 11 de junio de 2021, Washington, D.C. OPS/OMS. 2021. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54284>
 11. Riad A, Shabaan AA, Issa J, Ibrahim S, Amer H, Mansy Y, Kassem I, Kassem AB, Howaldt HP, Klugar M, Attia S. COVID-19-Associated Mucormycosis (CAM): Case-series and global analysis of mortality risk factors. *J Fungi* 2021; 7(10): 837. DOI: 10.3390/jof7100837. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34682258/>
 12. Asociación Argentina de Micología. Subcomisión de Micología Clínica. [Página en internet]. Micosis en tiempos de COVID19. Emitido 22 junio 2021; Consultada 7 de septiembre 2021. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/vermas-noticias.php?n=627>
 13. Hartnett KP, Jackson BR, Perkins KM, Glowicz J, Kerins JL, Black SR, Lockhart SR, Christensen BE, Beer KD. A guide to investigating suspected outbreaks of mucormycosis in healthcare. *J Fungi* 2019; 5(3): 69. DOI: 10.3390/jof5030069. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6787571/>
 14. Rudramurthy SM, Hoenigl M, Meis JF, Cornely OA, Muthu V, Gangneux JP, Perfect J, Chakrabarti A, ECMM, ISHAM. ECMM/ISHAM recommendations for clinical management of COVID-19 associated mucormycosis in low-and middle-income countries. *Mycoses*. 2021; 64(9):1028–1037. <https://doi.org/10.1111/myc.13335>
 15. Biswal M, Gupta P, Kanaujia R, Kaur K, Kaur H, Vyas A, Hallur V, Behera B, Padaki P, Savio J, Nagaraj S, Chunchanur SK, Shwetha JV, Ambica R, Nagdeo N, Khurajam R, Priyolakshmi N, Patel K, Thamke D, Dash L, Jadhav D, Bharmal R, Bhattacharya S, Rudramurthy SM, Chakrabarti A. Evaluation of hospital environment for presence of Mucorales during COVID-19-associated mucormycosis outbreak in India e a multi-centre study. *J Hosp Infect* 2022; 122:173 - 179. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.01.016>
 16. Rammaert B, Lanternier F, Zahar J-R, Dannaoui E, Bougnoux M-E, Lecuit M, Lortholary O. Healthcare-associated mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012; 54 (S1):S44–54. <https://doi.org/10.1093/cid/cir867>.
 17. Accili D. Can COVID-19 cause diabetes? *Nat Metab* 2021; 3:123–125. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00339-7>
 18. Müller JA, Groß R, Conzelmann C, Krüger J, Merle U, Steinhart J, Weil T, Koepke L, Prelli Bozzo C, Read C, Fois G, Eiseler T, Gehrman J, van Vuuren J, Wessbecher IM, Frick M, Costa IG, Breunig M, Grüner B, Peters L, Schuster M, Liebau S, Seufferlein T, Stenger S, Stenzinger A, MacDonald PE, Kirchhoff F, Sparrer KMJ, Walther P, Lickert H, Barth TFE, Wagner M, Münch J, Heller S, Kleger A. SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nat Metab* 2021; 3(2):149-165. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00347-1>
 19. Garre V. Recent advances and future directions in the understanding of mucormycosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12:850581. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.850581/full>
 20. Kulkarni R, Pujari S, Gupta D, Advani S, Soni A, Duberkar D, Dhonde P, Batra D, Bilala S, Agrawal P, Aurangabadkar K, Jain N, Shetty K, Dhamne M, Bolegave V, Patidar Y, More A, Nirhale S, Rao P, Pande A, Doshi S, Chauvhan A, Palasdeokar N, Val-

- zade, Jagtap S, Deshpande R, Patwardhan S, Purandare B, Prayag P, MAN collaborative study group. Rhino-orbito-cerebral mycosis and COVID-19: From bad to worse? *Ann Indian Acad Neurol* 2022; 25 (1): 68-75. DOI: 10.4103/aian.aian_463_21
21. Arora U, Priyadarshi M, Katiyar V, Soneja M, Garg P, Gupta I, Bharadiya V, Berry P, Ghosh T, Patel L, Sarda R, Garg S, Agarwal S, Arora V, Ramprasad A, Kumar A, Garg RK, Kodan P, Nischal N, Singh G, Jorwal P, Kumar A, Baitha U, Meena VP, Ray A, Sethi P, Xess I, Vikram N, Sinha S, Biswas A, Thakar A, Bhatnagar S, Trikha A, Wig N. Risk factors for Coronavirus disease-associated mucormycosis. *J Infect* 2022; 84 (3): 383-390. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.039>
 22. Jeong W, Keighley C, Wolfe R, LeeWL, Slavin MA, Kong DCM, Chen SC-A. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25 (1):26-34. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.011>.
 23. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, Hoenigl M, Jensen HE, Lagrou K, Lewis RE, Mellinshoff SC, Mer M, Pana ZD, Seidel D, Sheppard DC, Wahba R, Akova M, Alanio A, Al-Hatmi AMS, Arikan-Akdagli S, Badali H, Ben-Ami R, Bonifaz A, Bretagne S, Castagnola E, Chayakulkeeree M, Colombo AL, Corzo-León DE, Dróna L, Groll AH, Guinea J, Heussel CP, Ibrahim AS, Kanj SS, Klimko N, Lackner M, Lamoth F, Lanternier F, Lass-Floerl C, Lee DG, Lehrnbecher T, Lmimouni BE, Mares M, Maschmeyer G, Meis JF, Meletiadis J, Morrissey CO, Nucci M, Oladele R, Pagano L, Pasqualotto A, Patel A, Raci Z, Richardson M, Roilides E, Ruhnke M, Seyedmousavi S, Sidharthan N, Singh N, Sinko J, Skiada A, Slavin M, Soman R, Spellberg B, Steinbach W, Tan BH, Ullmann AJ, Vehreschild JJ, Vehreschild MJGT, Walsh TJ, White PL, Wiederhold NP, Zaoutis T, Chakrabarti A; Mucormycosis ECMM MSG Global Guideline Writing Group. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis* 2019; 19(12):e405-e421. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30312-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30312-3).
 24. John TM, Jacob CN, Kontoyiannis DP. When uncontrolled diabetes mellitus and severe COVID-19 converge: the perfect storm for mucormycosis. *J Fungi* 2021; 7(4): 298. <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/4/298>
 25. Garg D, Muthu V, Sehgal IS, Ramachandran R, Kaur H, Bhalla A, Puri GD, Chakrabarti A, Agarwal R. Coronavirus Disease (COVID-19) Associated mucormycosis (CAM): Case report and systematic review of literature. *Mycopathologia*. 2021; 186(2):289-298. DOI: 10.1007/s11046-021-00528-2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33544266/>
 26. Corzo-León D, Chora-Hernández L, Rodríguez-Zulueta A, Walsh T. Diabetes mellitus as the major risk factor for mucormycosis in Mexico: Epidemiology, diagnosis, and outcomes of reported cases. *Medical Mycology* 2018; 56(1): 29-43, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx017>
 27. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Paredes-Farrera F, Moreno-Moreno J, Araiza J, González G. Oral involvement in mucormycosis. A retrospective study of 55 cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2020; 39(10): 506-509. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.09.003>
 28. Reid G, Lynch III JP, Fishbein MC, Clark NM. Mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2020; 41(1): 99-114. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3401992>.
 29. Honavar SG. Code Mucor: Guidelines for the diagnosis, staging and management of rhino-orbito-cerebral mucormycosis in the setting of COVID-19. *Indian J Ophthalmol* 2021; 69 (6):1361-1365. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34011699/>
 30. Acosta-Gnass SI. Manual de control de infecciones y epidemiología hospitalaria. Organización Panamericana de la Salud 2010; p 3 <https://bit.ly/399zle7>
 31. Nakipoglu Y, Erturan Z, Buyukbaba-Boral O, Aksozek A, Aydin S, and Derbentli S. Evaluation of the contaminant organisms of humidifier reservoir water and investi-

- gation of the source of contamination in a university hospital in Turkey. *Am J Infect Control* 2005; 33 (1):62-63. <https://bit.ly/3AgNq5u>
32. **Jadhav S, Sahasrabudhe T, Kalley V, Gandham N.** The microbial colonization profile of respiratory devices and the significance of the role of disinfection: A blinded study. *J Clin Diagnostic Res.* 2013; 7(6):1021-1026. DOI: 10.7860/JCDR/2013/5681.3086. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23905094/>
 33. **Millon L, Scherer E, Rocchi S, Bellanger AP.** Molecular strategies to diagnose mucormycosis. *J Fungi* 2019; 5 (1):24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463105/>
 34. **Hoenigl M, Seidel D, Carvalho A, Rudramurthy SM, Arastehfar A, Gangneux J-P, Nasir N, Bonifaz A, Araiza J, Klimko N, Serris A, Lagrou K, Meis JF, Cornely OA, Perfect JR, White L, Chakrabarti A, on behalf of ECMM and ISHAM collaborators.** The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: a review of cases from 18 countries. *Lancet Microbe* 2022; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8789240/> [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00237-8)
 35. **Walther G, Wagner L, Kurzai O.** Updates on the taxonomy of mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *J Fungi* 2019; 5(4):106. <https://doi.org/10.3390/jof5040106>
 36. **Pemán J, Quindós G.** Anfotericina B liposomal: treinta años de una herramienta muy eficaz para el tratamiento de las micosis invasoras. *Rev Iberoam Micol* 2021; 38 (2): 39–41. DOI: 10.1016/j.riam.2021.04.007. <https://bit.ly/3AfbBBh>
 37. **Suberviola B.** Seguridad clínica de la anfotericina B liposomal. *Rev Iberoam Micol* 2021; 38(2): 56–60. <https://bit.ly/3AjlRZ6>
 38. **Horton R.** Offline: COVID-19 is not a pandemic. *Lancet* 2020; 396 (10255): 874. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32000-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32000-6)
 39. **Organización Mundial de la Salud.** No solo la ausencia de enfermedad. Duodécimo Programa General de Trabajo, 2014–2019. 2014; p 27, 29 <https://bit.ly/3lx1ph8>
 40. **Organización Mundial de la Salud.** Vigilancia de salud pública en relación con la COVID-19: orientaciones provisionales, 7 de agosto de 2020. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334000>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 41. **Organización Mundial de la Salud.** Vigilancia de salud pública en relación con la COVID-19: orientaciones provisionales, 14 de febrero de 2022. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/352396>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 42. **Keri VC, Kumar A, Singh G, Mandal A, Ali H, Ranjan P, Wig N.** Pilot study on burden of fungal contamination in face masks: need for better mask hygiene in the COVID-19 era. *Infez Med* 2021; 4: 557-561. doi: 10.53854/liim-2904-8.

Hallazgo intraoperatorio de hernia de Amyand: reporte de caso y revisión de literatura.

Delia Buitrago^{1,2}, *Susan Rojas-Rivas*^{2,3}, *Aguasanta González-Delatorre*⁴
y *Guillermo Terán-Ángel*⁴

¹ Servicio de Cirugía General Hospital Sor Juana Inés de La Cruz, Mérida, Venezuela.

² Centro Médico Quirúrgico Sinergia, Mérida, Venezuela.

³ Servicio de Cirugía General Hospital II San José de Tovar, Tovar, Venezuela.

⁴ Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Palabras clave: hernia de Amyand; hernioplastia; apendicectomía; hernia inguinal; caso clínico.

Resumen. La hernia de Amyand es la hernia inguinal que contiene el apéndice cecal en su interior. Es una entidad poco frecuente y de hallazgo operatorio. En este reporte se describe el caso de un adulto mayor con tumoración blanda, aumento de volumen progresivo en región inguinal derecha y dolor reductible en el reposo. En el acto quirúrgico se encontró saco herniario y, en su interior, apéndice cecal aumentado de tamaño, con signos de inflamación. Se realizó apendicectomía. Se reintrodujo el saco herniario y se reparó la pared posterior del conducto inguinal (técnica mixta de Lichtenstein con Bassini). La evolución postoperatoria fue satisfactoria.

Intraoperative finding of Amyand's hernia: case report and literature review.

Invest Clin 2023; 64 (2): 226 – 232

Keywords: Amyand's hernia; hernioplasty; appendectomy; inguinal hernia; case report.

Abstract. Amyand's hernia is an inguinal hernia that contains the cecal appendix inside. It is a rare entity and its discovery is generally made intraoperatively. We present the case of a older male adult, with a soft tumor, with progressive increase in volume, in the right inguinal region accompanied by local pain, reducible at rest. During surgery, a hernial sac was found with an enlarged cecal appendix inside it, with signs of inflammation. An appendectomy was performed. The hernia sac was reintroduced and the posterior wall of the inguinal canal was repaired (Lichtenstein and Bassini mixed technique). Postoperative evolution was satisfactory.

Recibido: 28-11-2022

Aceptado: 14-01-2023

INTRODUCCIÓN

La hernia de Amyand es el hallazgo del apéndice cecal dentro de una hernia inguinal¹. Su incidencia es baja, entre 0,2 y 2%, y su hallazgo ocurre por lo general en la etapa intraoperatoria y con mayor frecuencia en hombres². La incidencia de complicaciones como perforaciones o abscesos es aún menor, alrededor del 0,1%, pueden ser causadas por el aumento de la presión intraabdominal y la consecuente compresión del apéndice, provocando isquemia y aumento de la replicación bacteriana³.

El diagnóstico preoperatorio de esta entidad es difícil, pues no cursa con signos o síntomas específicos, presentándose generalmente como una hernia inguinal derecha irreductible. En aquellos casos en que se asocia a apendicitis aguda, puede cursar con distensión y dolor abdominal, náuseas y vómitos³. El manejo quirúrgico es variable en función del tipo de hernia. La clasificación de Losanoff-Basson⁴ que toma en cuenta el estado inflamatorio del apéndice, sugiere procedimientos que van desde la simple

reducción de la hernia, en los casos en que el apéndice esté normal, hasta apendicectomía con laparotomía exploratoria en casos de apendicitis aguda asociada a sepsis abdominal⁵.

En Venezuela son escasos los reportes de hernia de Amyand, encontrándose solo 6 casos publicados^{3,6-8}, por lo que los hallazgos de esta patología son de gran interés. Se presenta el caso de un paciente masculino de 61 años de edad, con hallazgo intraoperatorio de hernia de Amyand tipo I, realizado en el Centro Médico Sinergia, Mérida, Venezuela.

Presentación de caso

Caso clínico: paciente masculino de 61 años de edad, con enfermedad actual de año y medio de evolución, caracterizado por aumento de volumen en región inguinal derecha, acompañado de dolor de leve intensidad al esfuerzo físico, reductible a la sedestación. Al examen físico no se evidenciaron signos de flogosis. El paciente no cursó con signos de obstrucción intestinal.

Antecedentes personales: hipertensión arterial, controlado con valsartán 160 mg

OD + hidroclorotiazida 12,5 mg OD. Niega diabetes mellitus y asma. Refiere alergia a la penicilina. Niega intervenciones quirúrgicas y patologías oncológicas.

Paraclínicos preoperatorios: hemoglobina 16,1 g/dL, hematocrito 44%, leucocitos 7.600 / μ L, hemáties 5.360/ μ L, neutrófilos 63,1%, linfocitos 30%, plaquetas 244.000/ μ L, TP 13,5 s (control: 12,6 s), TPT 33,4 s (control: 32,4 s), glicemia basal 98,1 mg/dL, urea 20,5 mg/dL, creatinina 0,81 mg/dL.

Hallazgos imagenológicos: el ultrasonido de piel y partes blandas reportó protrusión de asa intestinal a través del anillo inguinal superficial derecho, posterior a maniobras de Valsalva (Fig. 1).

Es conducido a cirugía en septiembre de 2022, bajo diagnóstico preoperatorio de hernia inguinal indirecta derecha. Se realizó profilaxis antibiótica con cefalosporina de 1ra generación.

Transoperatorio: se procedió a la disección del contenido del conducto inguinal derecho, identificándose saco herniario, lipoma pre-herniario y cordón espermático. Se abrió el saco herniario observándose, en

primera instancia, el apéndice cecal (Fig. 2) aumentado de tamaño, con múltiples bandas formando adherencias sobre el saco herniario y el mesoapéndice, el cual se encontraba engrosado. El ciego se hallaba adherido a la pared del saco herniario; se liberaron las adherencias. Se realizó la apendicectomía ápico-basal + invaginación del muñón apendicular en zetaplastia. Se utilizó la maniobra de Chatle⁹. Se reintrodujo el saco herniario previa disección y se reparó la hernia con la pared posterior del conducto inguinal y el ligamento inguinal. Se efectuó una técnica mixta de Lichtenstein con Bassini¹⁰. Se realizaron controles médicos a los 8 y 15 días del procedimiento, evidenciándose un adecuado proceso de cicatrización sin complicaciones durante el posoperatorio mediato.

DISCUSIÓN

La hernia de Amyand es el hallazgo del apéndice cecal inflamado o no, dentro de una hernia inguinal. Es llamada así por Claudius Amyand, quien describió esta entidad en un niño de 11 años con una apendicitis perfo-

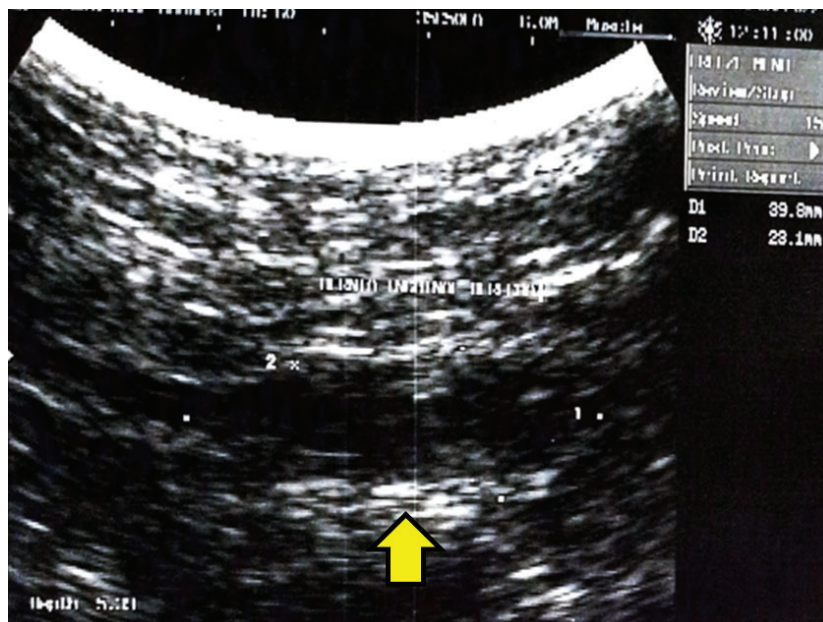


Fig. 1. Ultrasonido de piel y partes blandas de región inguinal derecha. Se utilizó un transductor de 6.0 Megahercios multifrecuencia. Se evidenció imagen hipocóica de 4,0 cm x 2,3 cm.

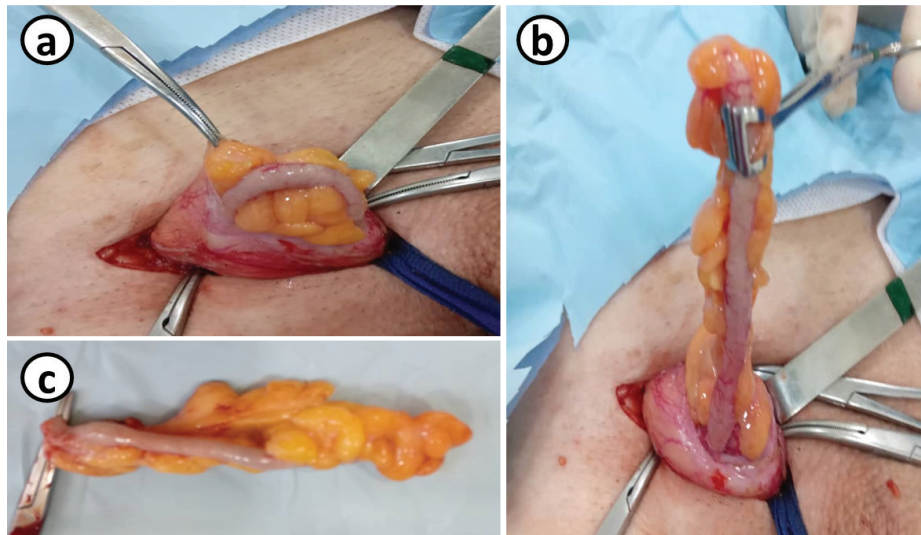


Fig. 2. Hernia de Amyand. a) Disección de saco herniario. b y c) Apéndice cecal.

rada dentro del saco de una hernia inguinal, realizando exitosamente, por primera vez, una apendicectomía a través del abordaje de la ingle ¹¹. El primer reporte de un apéndice cecal sin inflamación dentro de una hernia inguinal fue realizado por René-Jacques Croissant de Garengéot en 1731 ¹².

Hutchinson en 1993 ¹³, realizó una disertación sobre la conducta a tomar frente a una hernia de Amyand con un apéndice no inflamado. Los argumentos a favor de la apendicectomía “profiláctica o reglada” implican una disminución de la morbimortalidad y de costos, sin aumento del riesgo quirúrgico y anestésico; tampoco supone mayor complejidad quirúrgica la extirpación del apéndice a través del saco.

Además, debe considerarse que aunque el apéndice no revele signos macroscópicos de inflamación, no se pueden descartar signos microscópicos causados por la compresión e isquemia del cuello herniario⁷. Los argumentos en contra, plantean un incremento del riesgo de complicaciones sépticas dada la resección de un órgano con contenido fecal; riesgo derivado de convertir una cirugía limpia, como lo es la hernioplastia inguinal, en una cirugía limpia contaminada, como la apendicectomía ⁸. Hutchinson

también reportó casos que cursaron con apendicitis aguda postoperatoria, debido a la manipulación del apéndice asintomático durante la herniorrafia; por ello se puede plantear la apendicectomía como una alternativa favorable. No obstante, dicho abordaje y conducta continúa siendo un tema controversial en la actualidad y prácticamente queda bajo criterio de cada cirujano.

En 2018, se reportó un caso de hernia de Amyand tipo 1 en un paciente masculino de 80 años de edad, a quien se le realizó apendicectomía pese a no estar indicada según la clasificación de Losanoff y Basson; sin embargo, se planteó dicha conducta para reducir el riesgo de futura reintervención quirúrgica ¹⁴.

En Venezuela, la frecuencia de la hernia de Amyand es mayor en la edad adulta, en promedio a los 55 años (Tabla 1); sin embargo, en la literatura se reporta que es tres veces más probable el diagnóstico en niños que en adultos dada la permeabilidad del proceso peritoneo-vaginal ¹⁵. En la Tabla 1 también se muestra que la mayor incidencia ocurre en hombres (67%), como se describe ampliamente. Es llamativo que en Venezuela se realizó apendicectomía en el 83% de los casos.

Tabla 1
Casos de hernias de Amyand reportados en Venezuela.

| Autores | Edad | Sexo | Tipo | Apendicectomía | Técnica |
|------------------------------------|------|------|------|----------------|--------------------------------|
| López 2015 ⁷ | 56 | M | T2 | Sí | Lichtenstein |
| Lujan y col. 2016 ⁸ | 18 | M | T1 | Sí | Halsted I |
| | 55 | F | T1 | Sí | Lotheissen - Mc Vay |
| | 66 | F | T1 | No | Lotheissen - Mc Vay |
| Jaramillo y col. 2020 ³ | 65 | M | T3 | Sí | Cierre preperitoneal - Pouchet |
| Amato y col. 2021 ⁶ | 62 | M | T1 | Sí | Laparoscopia - Veress |

M = masculino, F = femenino.

El síntoma más común fue el aumento de volumen, generalmente acompañado de dolor en la región inguinal, tal como ocurrió en el paciente del presente caso. La literatura coincide en que, al examen físico, se pone en evidencia la irreductibilidad de la hernia; sin embargo, en este caso era reductible a la sedestación.

En relación a las complicaciones que pueden derivar de esta hernia, se han descrito apéndice perforado o absceso intraabdominal, fascitis necrosante de la región anterior de la pared abdominal, orquiepidimitis o absceso testicular, y rara vez, trombosis arterial in situ. Se reporta una mortalidad del 6-15% ².

El diagnóstico preoperatorio es difícil; por clínica, habitualmente se manifiesta como una hernia inguinal derecha irreductible y, en caso de asociarse apendicitis aguda, los síntomas típicos suelen estar ausentes. En relación a las técnicas de imagen, estas tampoco tienen buena sensibilidad ni especificidad para hacer el diagnóstico; sin embargo, hay escasos reportes de diagnóstico por imagen de manera incidental ¹⁶ aunque casi siempre se trata de un hallazgo intraoperatorio. Es importante tener en consideración los diagnósticos diferenciales tales como hernia encarcerada, estrangulada, hernia de Richter, adenitis inguinal, epididimitis aguda, orquiepidimitis, hidrocele agudo, torsión testicular, entre otros ⁸.

La clasificación de la hernia de Amyand fue propuesta por Losanoff y Basson, y modificada por Rikki (Tabla 2). Según esta clasificación, el abordaje quirúrgico depende del estado del apéndice evidenciado durante el transoperatorio. El caso en estudio se clasificó como una hernia tipo 1, dada la ausencia de apendicitis aguda. En cuyo caso el manejo más ampliamente descrito consiste en reducción de la hernia y reparación con malla; sin embargo, en pacientes jóvenes se recomienda la apendicectomía. No obstante, el manejo quirúrgico debe determinarse contextualizando al paciente y tomando en consideración, además del estado del apéndice, factores como las características de la hernia y presencia de comorbilidades. El paciente del caso presentado, fue un adulto mayor, hipertenso, en quien se procedió a realizar apendicectomía, dada la evidencia de cambios tróficos y signos de inflamación debidos a un proceso crónico de daño mecánico ejercido por el ciego que se hallaba adherido, formando parte del saco herniario.

Con base en lo anteriormente descrito, se puede concluir que la hernia de Amyand es una entidad poco frecuente e infradiagnosticada, hecho favorecido por la tendencia actual de reducir el contenido herniario sin apertura del saco. La forma de presentación clínica es similar a la de una hernia inguinal atascada, por lo que debe sospecharse siempre que se tenga una patología herniaria derecha con leucocitosis y neutrofilia.

Tabla 2Clasificación de Rikki de la hernia de Amyand a partir de la clasificación de Losanoff y Basson ^{4, 17, 18}.

| Clasificación | Descripción | Manejo quirúrgico |
|---------------|---|--|
| Tipo 1 | Apéndice normal dentro de una hernia inguinal | Reducción de hernia, reparación con malla, apendicectomía en pacientes jóvenes |
| Tipo 2 | Apendicitis aguda dentro de una hernia inguinal, sin sepsis abdominal | Apendicectomía por hernia, reparación primaria de hernia, sin malla |
| Tipo 3 | Apendicitis aguda dentro de una hernia inguinal, pared abdominal o sepsis peritoneal | Laparotomía, apendicectomía, reparación primaria de hernia, sin malla |
| Tipo 4 | Apendicitis aguda dentro de una hernia inguinal, patología abdominal relacionada o no | Manejar como hernia de los tipos 1 a 3, investigar o tratar la segunda patología según corresponda |
| Tipo - 5a | Apéndice normal dentro de una hernia incisional | Apendicectomía a través de hernia, reparación primaria de hernia incluyendo malla |
| Tipo - 5b | Apendicitis aguda dentro de una hernia incisional, sin sepsis abdominal | Apendicectomía por hernia, reparación primaria de hernia |
| Tipo - 5c | Apendicitis aguda dentro de una hernia incisional, pared abdominal o sepsis peritoneal o en relación con una cirugía previa | Manejar como hernia tipo 4 |

Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento de ningún ente público o privado.

Conflicto de competencia

Los autores de esta investigación no tienen ningún conflicto de interés o competencias.

Números ORCID de los autores

- Delia Buitrago:
0000-0001-8337-4080
- Susan Rojas-Rivas:
0000-0002-6544-2630
- Águasanta González-Delatorre:
0000-0003-3871-2014
- Guillermo Teran Angel:
0000-0002-2684-2308

Contribución de los autores

- DB: Manejo clínico quirúrgico, concepción y elaboración del caso clínico.
- SRR: Manejo clínico quirúrgico, concepción y revisión del caso clínico.
- AGD: Manejo clínico del caso, concepción y elaboración del manuscrito.
- GTA: Concepción, elaboración del manuscrito, revisión de literatura.
- Todos los autores participaron en la revisión crítica del artículo y en la aprobación de la versión final del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Manatakis DK, Tasis N, Antonopoulou MI, Anagnostopoulos P, Acheimastos V, Papa-georgiou D, Fradelos E, Zoulamoglou M, Agalianos C, Tsiaoussis J, Xynos E. Revisiting Amyand's Hernia: A 20-year systematic review. *World J Surg.* 2021;45(6):1763-70. DOI: 10.1007/s00268-021-05983-y

2. **Desai G, Suhani, Pande P, Thomas S.** Amyand's hernia: Our experience and review of literature. *Arq Bras Cir Dig* 2017;30(4):287-8. DOI: 10.1590/0102-6720201700040014.
3. **Jaramillo Y, Galíndez L, Morales A, Soto G, Guevara D, Yoris C.** Hernia de Amyand tipo 3. Reporte de caso. *Revista Venezolana de Cirugía* 2020;73(1):14-7. DOI: 10.48104/RVC.2020.73.1.1
4. **Losanoff JE, Basson MD.** Amyand hernia: a classification to improve management. *Hernia* 2008;12(3):325-6. DOI: 10.1007/s10029-008-0331-y
5. **Garagliano JM, Jaramillo JD, Kopecky KE, Knowlton LM.** Amyand hernia: considerations for operative approach and surgical repair. *Trauma Surg Acute Care Open* 2020;5(1):e000466. DOI: 10.1136/tsaco-2020-000466.
6. **Amato L, Evoli LP, Volpi G, Cesari M, Valeri M.** Amyand's hernia during laparoscopic hernioplasty. Case report: Appendix in a recurrent hernia sac. *Revista Venezolana de Cirugía* 2021;74(2). DOI: 10.48104/RVC.2021.74.2.9
7. **Lopez F.** Reporte de un paciente con Hernia de Amyand. *Correo Científico Médico de Holguín* 2015;19(1):153-159.
8. **Lujan R, Tamayo M.** Hernia de Amyand. Presentación de tres casos. *Clínica Popular Simón Bolívar. Mariara. Carabobo. Venezuela. Archivos del Hospital Universitario "General Calixto García"* 2016;4(1):56-65.
9. **Cheatle GL.** An operation for inguinal hernia. *Proc R Soc Med.* 1922;15(Surg Sect):13-14.
10. **Towfigh S.** Inguinal hernia: four open approaches. *Surg Clin North Am* 2018; 98(3):623-636. DOI: 10.1016/j.suc.2018.02.004.
11. **Hiatt J, Hiatt N.** Amyand's hernia. *N Engl J Med* 1988 318(21):1402. DOI: 10.1056/NEJM198805263182120.
12. **González-Alcolea N, Martínez-Arrieta F, Lucena JL, Jiménez-Cubedo E, Sánchez-Turrión V.** De Garengéot's hernia: Incarcerated femoral hernia containing the vermiform appendix. Report of two cases and literature review. *Cir Esp Mar* 2017 95(3):177-178. DOI: 10.1016/j.ciresp.2016.08.005.
13. **Hutchinson R.** Amyand's hernia. *J R Soc Med* 1993 86(2):104-105.
14. **Perrotti S, Bosco D, Miano D, Amico A, Latino R, Di Cataldo A.** Incarcerated Amyand's hernia: A case report. *Int J Surg Case Rep* 2018;51:265-267. DOI: 10.1016/j.ijscr.2018.08.064
15. **Ivanschuk G, Cesmebasi A, Sorenson EP, Blaak C, Loukas M, Tubbs SR.** Amyand's hernia: a review. *Med Sci Monit* 2014;20:140-146. DOI: 10.12659/MSM.889873.
16. **Moya-Sánchez E, Fernández-Navarro L, García-Espinosa J.** Hernia de Amyand: diagnóstico mediante radiología. *Cirugía Andaluza* 2017;28(4):286-287.
17. **Singal R, Gupta S.** "Amyand's Hernia" - Pathophysiology, role of investigations and treatment. *Maedica (Bucur)* 2011 Oct;6(4):321-327.
18. **Singal R, Mittal A, Gupta A, Gupta S, Sahu P, Sekhon MS.** An incarcerated appendix: report of three cases and a review of the literature. *Hernia* 2012;16(1):91-97. DOI: 10.1007/s10029-010-0715-7.

Papel del virus del papiloma humano en el desarrollo del cáncer del cuello uterino.

José Núñez-Troconis

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: virus del papiloma humano; fisiopatología del virus del papiloma humano; infección por el virus del papiloma humano; taxonomía de los virus del papiloma; genoma de los virus del papiloma; carcinogénesis.

Resumen. La presente revisión narrativa fue realizada con el objeto de investigar y recopilar información sobre la fisiopatología del Virus del Papiloma Humano (VPH) y los mecanismos virales para infectar a las células huéspedes, como sobrevive a los mecanismos inmunológicos innatos del huésped y los mecanismos para producir infecciones benignas y malignas del cuello uterino. La revisión de la literatura fue realizada electrónicamente en PubMed, Medline, ISI, DOAJ, Springer, Embase, Web of Knowledge, DOAJ, y Google Scholar, Hinari, JAMA Network, Oxford Academic y Research Life para los artículos escritos en inglés. Scielo, Lantidex, Imbiomed-L, Redalyc y Google Scholar fue revisados en búsqueda de artículos escritos en español. La búsqueda incluyó las palabras claves (MESH): fisiopatología del VPH, ciclo de vida del VPH, carcinogénesis del VPH, estructura genómica del VPH, mecanismo de infección del VPH, bases genéticas de la carcinogénesis del VPH, infección del VPH, taxonomía del VPH. Se buscaron, revisaron y analizaron las publicaciones desde enero de 1985 a agosto de 2021. Esta revisión narrativa nos permite entender como el VPH ocasiona la infección productiva y no productiva en las células de los epitelios escamosos estratificados del ser humano, en especial el del cuello uterino, nos explica cómo la infección por el virus puede producir lesiones benignas y lesiones malignas, y nos explica porque se clasifican en VPH-AR y VPH-BR, según su capacidad oncogénica. Estos procesos han permitido entender el comportamiento del virus y establecer tratamiento primario para el cáncer del cuello uterino.

Rol of the human papilloma virus in the development of cervical cancer.

Invest Clin 2023; 64 (2): 233 – 254

Keywords: human papillomavirus; physiopathology of human papillomavirus; infection by human papillomavirus; taxonomy of papillomavirus; genome of papillomavirus; carcinogenesis.

Abstract. The present narrative review was conducted to investigate and to compile information about the physiopathology of the Human Papilloma Virus (HPV) and the viral mechanisms of infection of the host's cells, as well as how the virus survives the host's innate immunological mechanisms and the mechanisms to produce cervical benign and malignant lesions. Literature searches were performed electronically in PubMed, Medline, ISI, DOAJ, Springer, Embase, Web of Knowledge, DOAJ, y Google Scholar, Hinari, JAMA Network, Oxford Academic and Research Life for original articles written in English and Scielo, Lantidex, Imbiomed-L, Redalyc, and Google Scholar for original articles written in Spanish. The searches included the keywords (MESH): physiopathology of HPV, HPV viral cycle, Carcinogenesis of HPV, HPV genomic structure, infection mechanism, and HPV taxonomy. Publications from January 1985 to August 2021 were reviewed. This narrative review allows us to understand how HPV produces productive and non-productive infection in the cells of the stratified squamous epithelium of the human being, especially that of the cervix, explains how infection by the virus can produce benign lesions and malignant lesions and explains why they are classified as HPV-HR and HPV-LR, according to their oncogenic capacity. These processes have made it possible to understand the behavior of the virus and establish primary treatment for the prevention of cervical cancer.

Recibido: 30-01-2022

Aceptado: 11-03-2023

INTRODUCCIÓN

Los virus del papiloma (VP) son virus muy antiguos que infectan a los vertebrados como los mamíferos, peces, reptiles, y aves capaces de infectar la piel y las mucosas tales como las del área anogenital, boca, y vías aéreas. En los humanos, los VP tienen preferencia por infectar epitelios escamosos diferenciados o estratificados, y la piel es uno de ellos ¹. Los VP se transmiten por contacto físico directo produciéndose un micro-trauma que permite la entrada del virus, sin pro-

ducir una enfermedad evidente ². Producen verrugas cutáneas planas o excrecentes y son capaces de causar cáncer ². Los VP fueron identificados por primera vez a principio del siglo XX en las verrugas presentes en la piel y se demostró que podían transmitirse de una persona a otra. En 1935, Francis Peyton Rous demostró que los VP causaban cáncer en la piel de los conejos; esa fue la primera vez que se demostró que un virus podía producir cáncer en mamíferos ³.

Los VP muestran una gran diversidad genotípica y una amplia variación en la pre-

sentación fenotípica de la infección ¹. Su clasificación ha sido algo complicada debido a varios factores. A diferencia de otros virus, los papilomavirus no generan una respuesta inmunitaria humoral adecuada y persistente, tanto en humanos o en otros mamíferos, por lo cual no ha sido posible desarrollar un sistema de clasificación por serotipos, a lo que se agrega la ausencia de modelos de infección celulares o de animales de laboratorio ^{3,4}. Para la clasificación de los papilomavirus se han tomado dos criterios básicos: a) el huésped, dado que estos virus son altamente específicos de especie y b) la secuencia genética, que permite la diferenciación entre los virus aislados; la secuencia más utilizada para la clasificación de los papilomavirus es la del gen L1. Se establece un nuevo tipo de VP cuando la secuencia del gen L1 varía en más de 10% respecto a tipos virales ya conocidos. Si la diferencia es de 2 a 10%, se les clasifica como subtipos virales y si la diferencia es menor a 2% se definen como variantes virales ⁵⁻⁷. En los primeros VP se empezó a utilizar la palabra tipo y un número, para denominar a los diferentes virus descubiertos, lo cual puede llevar a pensar que un tipo es equivalente a una especie de VP ^{5,8}.

Los virus de la familia *Papillomaviridae* fueron clasificados inicialmente como una subfamilia de los *Papovaviridae* en 1962, pero se reclasificaron en 2002 como una familia independiente. De acuerdo al International Committee on Taxonomy of Viruses en su actualización del 2020, la familia *Papillomaviridae* está dividida en 2 subfamilias: la *Firstpapillomavirinae* y la *Secondpapillomavirinae*. La subfamilia *Firstpapillomavirinae* tiene 53 géneros y 133 especies y la subfamilia *Secondpapillomavirinae* tiene 1 género ⁹⁻¹² (Tabla 1).

En relación a los VP que afectan al humano, Virus del Papiloma Humano (VPH), el Centro Internacional de Referencia del Virus del Papiloma Humano del Instituto Karolinska ha reportado hasta el 2023, la identificación de 229 diferentes tipos de VPH¹². Los géneros más evolucionados de la subfamilia

Firstpapillomavirinae son el Alpha, el Beta y el Gamma; estos virus han evolucionado con capacidad de infectar ciertos tipos de epitelios con estrategias específicas para sobrevivir. Muchos de los VPH pertenecientes a los géneros Beta y Gamma están asociados a infecciones asintomáticas o no visibles de la piel que se adquieren en la infancia, persistiendo a lo largo de la vida y produciendo partículas virales en pequeñas cantidades durante años o décadas ². Los VPH del género Mu infectan la piel de la palma de la mano y la planta de los pies produciendo verrugas profundas que generalmente desaparecen después de meses o años debido a una respuesta inmune de tipo celular. Los VPH del género *Alphapapillomavirus* afectan las mucosas orales y genito-anal de los humanos y los primates ¹; este género también incluye tipos que pueden sobrevivir sin producir ninguna patología. Este género ha sido dividido en dos grupos: los de bajo riesgo, que se asocian principalmente con verrugas genitales benignas y los de alto riesgo que se asocian por su alto potencial oncogénico como agentes etiológicos del cáncer del cuello uterino, vagina, vulva, pene y ano ^{4,5}.

Entre los VPH del género Alpha que son considerados de bajo riesgo se encuentran el 6, 7, 11, 30, 42, 43, 44, 45, 51, 54, 55, 61, 71, 72, 81 y cand90. Entre los VPH de alto riesgo o con capacidad oncogénica se encuentran: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 70 ^{2,11,13}.

Los VPH pueden llegar a afectar hasta 20% de la población en un momento dado; la incidencia de la infección varía dependiendo del tipo del virus, del grupo etario de la población y la predilección del virus por el tejido mucoso o el tejido cutáneo ²⁻⁴. Este tipo de infección afecta al 10,4% de la población femenina, alrededor del mundo ¹⁴.

La persistencia de los genotipos de los VPH de alto riesgo, mencionados anteriormente, es la causante del cáncer del cuello uterino (CaCu), en especial los de los tipos 16 y 18. EL VPH es transmitido por contacto sexual y los factores de riesgo para desa-

rollar el CaCu incluyen sexarquia a edades tempranas, número de compañeros sexuales, uso prolongado de anticonceptivos orales, paridad, hábito tabáquico, enfermedades de transmisión sexual asociadas en especial el HIV e inmunosupresión crónica, entre otras ¹⁵.

Sin embargo, a pesar que el VPH es el factor más importante en el origen del CaCu y su transmisión es fácil y silente, la infección por VPH es transitoria, en el 90% de los casos en un plazo entre meses a 2 ó 3 años, la persistencia de la infección por el virus, en especial si es de alto grado, es uno de los factores virales más importantes en el desarrollo de las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino ^{16,17}.

El objetivo de esta revisión narrativa es analizar la fisiopatología del virus que nos explica por qué algunas infecciones persisten y otras no y, como consecuencia sería la explicación del origen y evolución de las lesiones premalignas hacia el CaCu.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó la búsqueda bibliográfica en las páginas electrónicas de Pub Med, Google Scholar, Springer, Web of Knowledge, DOAJ, Hinari, Oxford Academic, JAMA Network, Embase, y Research Life en la literatura de habla inglesa y en Scielo, Latindex, Imbiomed-L, Redalyc y Google Scholar en la literatura de habla española. Se usaron y buscaron empleando los términos y/o palabras clave (MESH): fisiopatología del VPH, ciclo de vida del VPH, carcinogénesis del VPH, estructura genómica del VPH, mecanismo de infección y transformación del VPH, bases genéticas de la carcinogénesis del VPH, infección del VPH, taxonomía del VPH. La búsqueda se realizó usando palabras solas o usando la combinación de AND/Y u OR/O. Dentro de los criterios de inclusión se consideraron: a) artículos de fuentes primarias publicados en revistas indexadas con naturaleza de revisión,

artículos originales de investigación, estudios comparativos, estudios de evaluación, capítulos de libros y meta-análisis de acceso abierto; b) artículos en idioma inglés y español. Fueron excluidos de la revisión: cartas al editor, reportes de casos y estudios sin control. Igualmente, fueron excluidas las publicaciones que no tenían libre acceso. Si en más de una publicación se encontraba la misma población estudiada, se analizó la publicación más reciente o con mayor número de pacientes estudiados. Se revisaron los artículos publicados desde el año 1980 hasta agosto 2021.

Se encontraron 415 artículos durante la búsqueda primaria de la investigación. Se excluyeron 280 de ellos por no poseer acceso libre al texto completo o por no reunir otros criterios de inclusión para la revisión como se mencionó en el párrafo anterior. De los 135 artículos para la revisión y consulta del texto completo, 100 fueron elegidos para la revisión, los restantes 25 fueron excluidos por no reunir los criterios de inclusión, además 10 de ellos eran artículos repetidos.

Fisiopatología

Especificidad tisular

Los VP son virus con alto tropismo por el huésped y los tejidos, y muy rara vez se transmiten entre especies ¹⁸. Como mencionamos arriba, los VP tienen afinidad y preferencia por infectar epitelios escamosos diferenciados o estratificados, como la piel de los humanos y las mucosas tales como la genital, la anal, la bucal y la de las vías respiratorias ¹. Los VP se replican exclusivamente en las células de la capa basal de los tejidos o epitelios planos estratificados; estos epitelios tienen un proceso de maduración o diferenciación desde las capas basales hasta las capas superficiales. Este hecho es importante para la replicación de los VP. Estos virus penetran en estos epitelios a través de micro traumas y ganan las células basales las cuales son infectadas y así comienza el proceso de replicación del virus.

Unión, penetración, transcripción y replicación

Una vez que el virus gana la capa basal del epitelio plano estratificado, se produce una interacción entre la proteína L1 a nivel de su extremo carboxilo terminal y los azúcares sulfatados de la membrana de la célula huésped; de esa manera se produce la unión del virus a la membrana de la célula huésped¹⁹⁻²¹. Entonces, el virus es capaz de penetrar al interior de la célula o sea al citoplasma desde la membrana al interactuar con el receptor usando la vía α -6- β 4 integrina^{22,23}, proceso denominado endocitosis y es transportado a los endosomas²⁴⁻²⁶. Se han descrito dos sistemas de endocitosis para los VPH: el primero involucra un complejo proteico llamado clatrina²⁷, utilizado más que todo por los tipos 16 y 18; el segundo sistema consiste en un grupo de proteínas de las cuales la principal es la caveolina por lo que este sistema se denomina “endocitosis por caveolas” y es utilizado principalmente por el tipo 31²⁸. La proteína tardía L2 de la cápside rompe la membrana del endosoma a través de un péptido catiónico, la cápside experimenta un proceso de reducción química que daña los puentes disulfuros que estabilizan la cápside, originándose capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo, junto con fragmentos pequeños de ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm; con ello, el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones²⁹⁻³². Durante el proceso de infección, la transcripción se realiza y el ADN se divide en estadios o marcos de lectura abierta tempranos y tardíos (siglas en inglés: ORF E y L²⁵). La transcripción de los ORFs E y L se realiza en la misma cadena del ADN y en la misma dirección. El precursor del ARN mensajero (ARNm) experimenta un proceso postranscripcional, el cual incluye el taponamiento y poliadenilación de los terminales 5' y 3', respectivamente, así como también, el em-

palme o acoplamiento. El uso eficiente de la información genética codificada implica el empalme o acoplamiento diferencial de los ARN y la utilización de ORFs superpuestos. Los ARNm tempranos codifican las proteínas reguladoras que pueden tener o exhibir propiedades transactivadoras, estas propiedades incluyen las proteínas que son requeridas para la replicación del ADN. La expresión de estas proteínas produce la depresión o disminución de la acción de enzimas de la célula huésped y también puede estimular la síntesis del ADN de la célula huésped. Antes de comenzar los eventos tardíos, la replicación del ADN viral se inicia en el núcleo de la célula. El transporte de las transcripciones produce las proteínas estructurales que están involucradas en la formación de la cápside. Las modificaciones post-transcripcionales de algunas proteínas virales tempranas (E) y tardías (L) incluyen la fosforilación, la N-acetilación, la ADP ribosilación y otros eventos. Algunas de las proteínas virales poseen o contienen secuencias, denominadas señales de localización nuclear, las cuales facilitan el transporte de proteínas al núcleo de la célula huésped donde ocurre el ensamblaje y maduración de los viriones; estos son liberados por la lisis de la célula huésped producida por el virus^{11,33}.

El genoma de muchos de los miembros de la familia *Papillomaviridae* que han sido secuenciados, contiene de 9 a 10 ORFs, denominados desde E1 a E8 sucesivamente, y L1 y L2. Las proteínas producto de los genes de los VPs se pueden dividir en: 1.- proteínas centrales: E1, E2, L1 y L2; y 2.- proteínas accesorias: E4, E5, E6 y E7 (Tabla 2). Las proteínas centrales están involucradas directamente en la replicación del genoma viral (E1 y E2) y en el ensamblaje del virus (L1 y L2) y son constantes o conservadas entre todos los VPs. Estas proteínas se manifiestan cuando la transcripción se produce durante el ciclo de vida viral. Las proteínas accesorias muestran una mayor variabilidad tanto al momento de expresarse y como en sus características funcionales, asimismo,

Tabla 2
Funciones de las proteínas del VPH.

| Tipo de Proteína | Nombre | Funciones |
|------------------|--------|---|
| No Estructurales | E1 | Funciones de Helicasa. Esencial para la replicación y la transcripción |
| | E2 | Esencial para la replicación y la transcripción, segregación genómica y encapsidación |
| | E4 | Regula la expresión de los genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones |
| | E5 | Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular ocasionando aneuploidía e inestabilidad cromosómica |
| | E6 | Se une e induce la degradación de la p53, inhibiendo la apoptosis, interactúa con el sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus, activa la expresión de la Telomerasa |
| | E7 | Se une e induce la degradación de la pRB, incrementa la actividad de la actividad de la Cinasas dependiendo de Ciclinas, afecta la expresión de los genes en la fase S del ciclo celular por interacción directa con el Factor de transcripción E2F y las Histona Desacetilasa, contribuye a la evasión a la Respuesta Inmune |
| | L1 | Proteína principal de la capsida, reconoce receptores de la célula huésped, es altamente inmunogénica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes |
| Estructurales | L2 | Proteína secundaria de la capsida, participa en la unión, entrada y transporte al núcleo del virión a la célula, liberación de genoma viral y en el ensamble de los viriones |

los genes que codifican estas proteínas accesorias, modifican la célula infectada para facilitar la replicación del virus y permitir su supervivencia². Algunos de sus miembros no poseen la ORF E3 y la ORF E8. Las proteínas que codifican los ORFs E, con una posible excepción de la E4, son polipéptidos no estructurales que están involucrados en la transcripción, en la replicación del ADN y en la transformación, mientras que aquellas proteínas que son codificadas por las ORFs L, son proteínas estructurales. La replicación del genoma viral es iniciada en forma bidireccional por la unión específica de las proteínas E1 y E2^{11,33}.

Una vez que se produce la infección de la célula por el VPH, la expresión genómica del virus es controlada por múltiples promotores y un patrón complejo de empalme de ARNm que permite a diferentes produc-

tos genómicos virales que se expresan en diferentes etapas durante el ciclo de vida viral^{33,34}.

Propiedades antigénicas

Los VP no producen una respuesta inmunológica humoral en humanos y en otros mamíferos infectados, sin embargo, la proteína tardía L1 posee ciertos tipos de dominios y la proteína tardía L2 posee grupos específicos de epítopes, lo que ha permitido obtener las llamadas "Partículas parecidas al Virus" a base de las proteínas L1 o L1 y L2, las cuales generan una respuesta antigénica humoral¹¹.

Propiedades biológicas

Los VP son virus altamente específicos de la especie del huésped y de los tipos de tejido. Los VPH requieren la diferenciación

terminal de las células del epitelio infectado para lograr su replicación y formación o producción de los viriones. Como se ha mencionado anteriormente, la infección comienza principalmente vía de una microlesión o microtrauma en el epitelio que permite a los viriones o partículas virales penetrar en las células de la capa basal de los epitelios o mucosas por lo que la transmisión del virus ocurre por un contacto cercano y sucede por la liberación de los viriones desde la superficie de las verrugas y las lesiones papilomatosas, las cuales, poseen o contienen frecuentemente una gran cantidad de estas partículas dentro de las capas superficiales diferenciadas del epitelio afectado ¹¹.

Incidencia y transmisión

La incidencia de los VPH que afectan el área anogenital se eleva abruptamente en la población al iniciarse las relaciones sexuales (no necesariamente se necesita la penetración). La transmisión del virus se produce durante el acto sexual por el micro-trauma que se origina en el epitelio, el cual, permite la penetración del virus. Debido a que esta infección es generalmente asintomática, altamente transmisible y pasa desapercibida o sea no es notoria, se disemina rápidamente. La transmisión a través de fómites ha sido mencionada pero no es una vía importante ^{2,35}. Cualquier persona puede adquirir simultáneamente o secuencialmente, múltiples nuevas infecciones de diferentes tipos de VPH debido a que la respuesta inmune natural de cada persona a la infección es variable, débil, y específica a un tipo particular de VPH. Las infecciones concurrentes por diferentes tipos de VPH son raras contrario a lo que se piensa ³⁶, pero no se interfieren mutuamente ^{37,38}. Algunos estudios demuestran que la incidencia de la infección por VPH en nivel del cuello uterino, cae o disminuye con el aumento de la edad y la paridad. Se cree que es debido a un menor número de nuevos contactos sexuales y al desarrollo de una inmunidad natural contra el virus ^{39,40}.

El porcentaje del llamado “aclaramiento del virus” o la desaparición de la infección viral es inicialmente rápido, pero luego continua en forma lenta y gradual. Las infecciones persistentes que pasan de 2 a 3 años, son poco comunes y más del 90% desaparecen entre 2 y 7 años ^{2,37}. El virus, bien sea, completamente eliminado de los tejidos, o suprimido por los mecanismos de la inmunidad celular a niveles muy bajos que el ADN viral no es detectado por los métodos de biología molecular sensibles, en otras palabras, el virus entraría en un periodo de latencia ². Hoy en día no es posible distinguir con certeza entre latencia y aclaramiento del virus. Una prueba de ADN o ARN del VPH positiva posterior a una prueba negativa puede significar una nueva infección o una reactivación de una infección latente. En el cuello uterino, la proporción de reactivación de la infección en comparación con la adquisición de una nueva infección aumenta con la edad, la disminución del número de parejas sexuales y probablemente la disminución de los controles inmunológicos; estos hallazgos pudieran ayudar a explicar el aumento de la prevalencia del VPH en los pacientes de mayor edad, que ha sido observada en varios grupos poblacionales ^{2,41,42}.

Prevalencia y persistencia

La prevalencia del VPH se debe a 2 factores: a la incidencia y a la persistencia exagerada de la infección viral. Ha sido demostrado que la prevalencia de la infección del VPH es bastante variable dependiendo del área o región geográfica, de la edad, de la conducta sexual, del control inmunológico que posea el huésped contra el virus y los efectos que tenga el tratamiento de las lesiones producidas por el virus sobre todo en las regiones donde existan métodos de pesquisa adecuados ⁴³.

La infecciones latentes y reactivadas pueden contribuir en un pequeño porcentaje al cáncer cervical en mujeres de mayor edad ². Algunos estudios reportan que muchas de las lesiones precancerosas son precedidas por infecciones persistentes ^{2,44}. Diferentes autores

mencionan que hay 3 clases de cofactores que influyen la persistencia de la infección por VPH y que determinan si esa persistencia es suficientemente larga para permitir el desarrollo de la lesión precancerosa y del cáncer del cuello uterino ^{2,45}. Estos cofactores serían: 1.- factor viral; 2.- factor huésped; y 3.- factor estilo o conducta de vida sexual

1. El factor viral: se refiere a la capacidad oncogénica del tipo de VPH y la carga viral que infecte al huésped e influya en el desarrollo de lesiones precancerosas y cancerosas ^{2,45}.
2. El factor huésped: se refiere a la capacidad inmunológica natural que determina el futuro de la infección ^{2,45}.
3. El factor conducta: se refiere al hábito del cigarrillo, multiparidad, uso prolongado de pastillas anticonceptivas, inicio a edades tempranas de las relaciones sexuales, múltiples compañeros sexuales, deficiencias nutricionales ⁴⁶⁻⁴⁸. Se han mencionado otros factores como la coinfección con la *Chlamydia trachomatis*, el *Herpes Virus Simple Genital* tipo 2, y el virus de la inmunodeficiencia adquirida ⁴⁶⁻⁴⁸. La influencia del factor conducta es relativamente modesta, sin embargo, incrementa el riesgo relativo de desarrollar lesiones precancerosas en un 1,5 a 2 veces una vez adquirida la infección por VPH ^{9,49}.

Ciclo de vida viral

El desarrollo de la lesión viral por el VPH, bien sea la producida por un tipo de bajo o alto grado, requiere, como hemos mencionado, el acceso del virus a las células de la capa basal del epitelio y que esta barrera sea sobrepasada; a nivel del cuello uterino, esto ocurre en la zona de transformación donde las células están en permanente transformación. Una vez que el VPH está dentro de las células de la capa basal del epitelio, las cuales, están en constante división y diferenciación, condición necesaria de los VPH para infectar la célula y establecerse en el núcleo donde se replica; esto se con-

sidera como una infección no productiva de enfermedad y lo hace en un número bajo de copias episomales (de 20 a 30 copias por célula infectada); allí se replica usando la maquinaria de replicación del ADN de la célula huésped para sintetizar su ADN en un promedio de una copia por ciclo celular ^{3,50-53}. Para que la infección sea persistente se requieren cambios en el microambiente celular tales como el aumento de los niveles de diferentes factores de crecimiento que pudieran jugar un papel importante en el establecimiento o persistencia de un reservorio de la infección viral en las células de la capa basal del epitelio ⁵⁴⁻⁵⁷. La capacidad del VPH para infectar, replicarse, y conducir a la producción de una lesión cancerosa depende de la función de las proteínas virales, la posición de la célula en el epitelio donde se encuentran estas proteínas expresadas y si la expresión genómica viral está adecuadamente controlada en un sitio epitelial particular ². La célula basal infectada, se divide, madura y se convierte en una célula parabasal, intermedia y superficial, está sometida a un programa de expresión genómica que está unido al proceso de diferenciación.

La amplificación del genoma viral ocurre en las capas intermedias del epitelio mientras que el ensamblaje viral y su liberación ocurren en las capas superficiales ^{33,54,58}. La amplificación del genoma viral requiere de la acción combinada de múltiples genes virales tales como E6, E7, E2 y la helicasa E1, pero el mantenimiento de la replicación del virus en la capa basal del epitelio dependería de los factores replicativos de la célula huésped infectada ^{33,55,59}. Como se mencionó anteriormente, el virus en las capas superficiales cambia al modo de ADN circular de replicación y su amplificación aumenta en número de copias, sintetiza las proteínas de la cápside y se produce el ensamblaje viral ^{13,60}.

La diferenciación o maduración de la célula basal infectada está sometida a un programa de diferenciación que la convierte en la célula epitelial suprabasal, como mencionamos anteriormente, involucra cambios

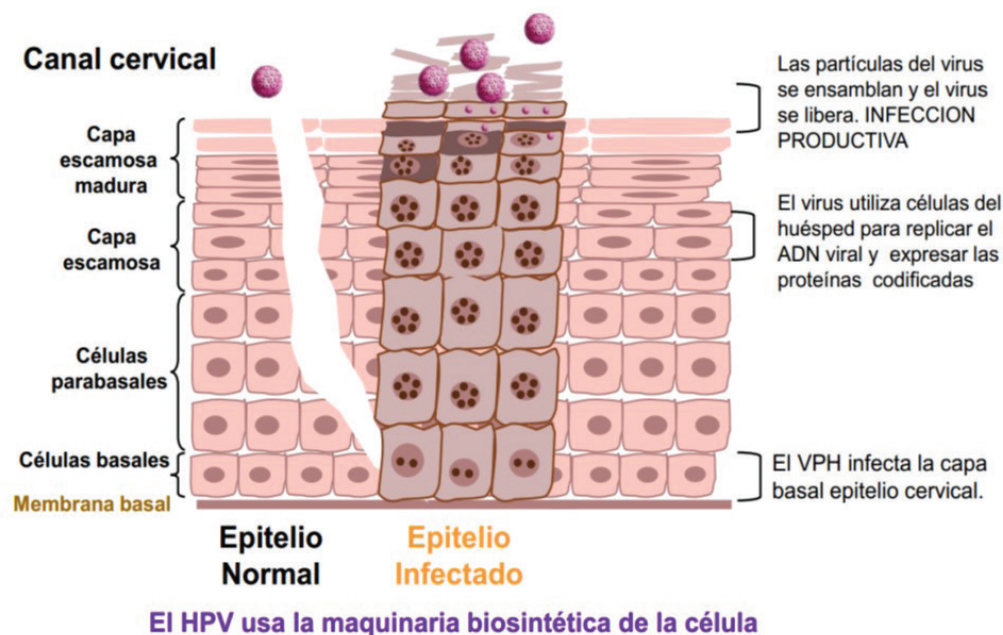
temporales en la actividad del promotor y en los patrones de empalme del ARNm que facilitan la producción de diferentes productos o proteínas génomicas en los diferentes estadios del proceso de diferenciación o maduración programada^{34,61-63}. La función de las proteínas virales es modulada por la modificación postraduccionales incluidas la fosforilación y la escisión proteolítica⁶¹.

Puesto que los VPH solo codifican de 8 a 10 proteínas, necesitan y emplean los factores de replicación de la célula huésped para regular la transcripción y la replicación viral. La replicación del VPH comienza con factores de la célula huésped los cuales interactúan con la región LCR del genoma viral y comienza la transcripción de los genes virales E6 y E7. Los productos de los genes E6 y E7 desregulan el ciclo de crecimiento de la célula huésped mediante la unión e inactivación de las proteínas supresoras de tumores, ciclinas celulares y dependientes de ciclina quinasas^{13,64}. La función de estos productos durante la infección productiva del VPH es subvertir las vías que regulan el ciclo de cre-

cimiento de la célula huésped y modificar el ambiente celular de manera de facilitar la replicación viral en una célula que está completamente diferenciada y ha salido o perdido su propio ciclo celular^{13,64} (Fig. 1).

El crecimiento celular está regulado por 2 proteínas celulares: la proteína supresora de tumor: p53 y la proteína retinoblastoma (pRB)⁶⁵. El producto o la proteína del gen VPH E6 se une a la p53 lo que origina una rápida degradación a través de una ubiquitina ligasa celular⁶⁵. Esta degradación tiene el mismo efecto que una mutación inactivadora⁶¹. Entre las actividades normales de p53 es controlar la fase G1 del ciclo celular; como consecuencia, se bloquean el arresto, la apoptosis y la reparación del ADN celular, de manera que la proteína E6 del VPH puede unirse y formar complejos con al menos otras 6 proteínas celulares¹³.

La proteína E6, constituida por 150 aminoácidos, se liga o se une al Zinc; gran parte de sus funciones biológicas depende de la integridad de 4 residuos de cisteína⁶⁶. Ella forma un complejo con p53 y la enzima ubi-



(Adaptado de Frazer IH. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:46-54)

Fig. 1. Ciclo de vida del HPV en el cérvix.

quitina ligasa produciendo la degradación de la p53, proceso que se desencadena frente a una carga viral elevada o ante mutaciones del ADN celular. El gen p53 se encuentra en el cromosoma 17 y su proteína p53 en condiciones basales o normales permite detener el ciclo celular en la fase G1, efecto mediado por la proteína p21^{cip}/WAF1, la cual inhibe las quinasas dependientes de ciclinas o activan el mecanismo de apoptosis mediante la activación del gen bax. De esta manera, la función protectora del genoma celular es alterada por la proteína E6. Otras funciones de esta proteína son: amplificar la actividad de la telomerasa, inducir la síntesis de ADN mutado y aumentar la integración del ADN viral al ADN de la célula huésped ⁶⁶.

La proteína del gene E7 del VPH está constituida por 100 aminoácidos que se unen al Zinc, se une a la forma hipofosforilada (ya que experimenta una fosforilación) de las proteínas de la familia RB a través de su extremo N-terminal; esta unión rompe el complejo formado entre la pRB y el factor de transcripción celular E2F-1, el cual permite la transcripción de los genes cuyos productos o proteínas son requeridas para que la célula entre en la fase S del ciclo celular. El gen de la proteína RB se localiza en el cromosoma 13. La interacción entre el factor de transcripción celular E2F-1 en la fase G1 del ciclo celular inhibe la expresión de los genes relacionados con la replicación del ADN celular y la proliferación celular⁶⁶; de esta forma, permite la expresión de la timidina quinasa, la c-myc, la polimerasa A, la PCNA, la Ki-67, la proteína mantenimiento de microcromosomas, la p16 y las ciclinas A y E ⁶⁷. La proteína E7 también se puede asociar o unirse a otras proteínas celulares mitóticamente interactivas como la ciclina ⁶⁴. Otras de las funciones de la E7 que han sido descritas son: 1.- La unión a la quinasa de la histona H1, lo que favorece la acción transformante de la célula ⁶⁶; 2.- La inhibición de la proteína p16^{ink4A} que en condiciones basales frena la multiplicación celular ⁶⁸; 3.- Efecto muta-

génico; 4.- Producir aneuploidías; 5.- Favorecer la integración del genoma viral al de la célula huésped ⁶⁶. De esta manera ambas proteínas, E6 y E7, favorecen la proliferación e inmortalización del virus en las células con mayor carga de ADN mutado.

La proteína E5 es sintetizada en el genoma viral localizándose principalmente en la membrana de la célula huésped e interactuando con algunos factores como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor p185-neu y los factores estimulantes de colonias; de esta manera, podría estimular la acción de estos diferentes factores vinculados a la proliferación celular; otro mecanismo asociado a esta proteína E5 es la de activar la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos, la cual, está asociada a la proliferación y diferenciación celular ⁶⁹. La proteína del gene E5 induce un aumento de la actividad de la MAP quinasa, por lo tanto, mejora la respuesta de la célula a los factores que intervienen en el crecimiento y la diferenciación; esto resulta en una proliferación continua y en un retardo de la diferenciación de la célula huésped.

Las proteínas de los genes E1 y E2 son sumariadas a continuación; la E2 es una proteína dimerica que forma un complejo con la E1, y la proteína del gen E2 es una proteína que se une al ADN que bloquea la transcripción de los genes E6 y E7 y permite que el producto o proteína del gen E1 -el cual es una proteína multimérica con actividad de ATPasa y de helicasa-, se una al ADN viral a nivel de LCR ^{3,21} y ambas formen un complejo de iniciación con ciclinas, principalmente la E, quinasas dependientes de ciclinas, la ADN polimerasa A, en la región p68, y con proteínas de la célula huésped ^{21,70,71}. En este proceso la E2 es fosforilada por quinasas a nivel de los residuos de serina 298 y 301, regulando de esa forma su unión a la E1 ^{21,72}. Asimismo, la E2 suprime al promotor P97 del VPH 16 o el P105 del VPH 18, que están ubicados próximo al gen TATA box de dichos virus, encargados de la transcripción de las

proteínas E6 y E7, reduciendo de esta forma la síntesis de dichas proteínas^{21,73}. También, la E2 activa directamente la síntesis de la p53 lo que produce la detención del ciclo celular en G1 y por supuesto la apoptosis^{21,74}. Todas estas uniones o complejos inician la replicación del genoma viral como elementos extracromosomales en la fase S del ciclo celular y el número de copias del virus es mantenido en forma constante en la célula infectada y con bajo nivel de transcripción.

La transcripción de las proteínas E6 y E7 es regulada y controlada por la proteína E2 lo que permite la liberación de las proteínas p53 y pRB, eso hace que el proceso normal de diferenciación celular de la célula huésped continúe. Luego, un promotor tardío activa los genes de la cápside, L1 y L2; las partículas virales son ensambladas en el núcleo y forman el virión; los viriones, son liberados por las células epiteliales superficiales al descamarse. Las proteínas E1 ^ E4 son la mayormente expresadas en las capas superficiales de los epitelios infectados por los VPH, en especial la E4, y constituyen aproximadamente el 30% del contenido proteico viral en la célula infectada; se sintetizan como una proteína mixta involucrando los genes E1y E4 debido a un ARNm empalmado, los cuales, codifican 5 aminoácidos del ORF E1 empalmado a la proteína codificada por el ORF E4^{75,76}. Ellas forman complejos hexaméricos capaces de unirse a la red de citoqueratina de la célula huésped, a través de su región N-terminal produciendo su desestabilización, igualmente, produce alteración del potencial de membrana de la mitocondria. La región C-terminal de la proteína permite su unión a la proteína del gen DEAD-box, alterando sus funciones como tipo helicasa, ATPasa, recambio de ARN y estabilización del ribosoma⁷⁷. La región intermedia de ella (aminoácidos 17 al 45) detiene el ciclo celular en la fase G2, a través de la unión a ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas y por el bloqueo de E7. Como consecuencia, la célula pierde su soporte estructural por la alteración del citoesqueleto, produciéndose un daño mito-

condrial y del metabolismo energético⁷⁶. La proteína E4 juega un papel en la maduración y liberación de los viriones del VPH, pero no parece ser citolítico en el proceso de replicación por lo que el ADN viral se encuentra en las células de las capas del epitelio, pero los viriones intactos se encuentran solo en las capas superiores del epitelio¹³.

La proteína de gen E2 que es sintetizada posteriormente, tiene la función de bloquear la transcripción de los genes E6 y E7, lo que resulta en la liberación de las proteínas p53 y la pRB y, permitir que la proteína del gen E1 se una al principio de la replicación viral localizada en el LCR; esta unión inicia la replicación del genoma viral como elementos extracromosómicos en la fase del ciclo celular S1. Luego las partículas virales son ensambladas en el núcleo y liberadas en las capas superficiales del epitelio estratificado¹³. Es posible que, durante la etapa de amplificación del genoma viral, la inhibición de las oncoproteínas E6 y E7, el daño al citoesqueleto, el trastorno mitocondrial-energético y la apoptosis permitan una mayor diseminación del virus, siempre que las proteínas de la cápside, L1 y L2, hayan sido sintetizadas formando con el ADN viral los nuevos viriones infectantes²¹.

En la Tabla 2 se resume la función de las proteínas virales.

Lesiones premalignas y malignas del cuello uterino

Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs) y el cáncer del cuello uterino (CaCu) son unos de los mejores ejemplos para entender como una infección viral puede producir una transformación maligna. La infección por los VPH de alto riesgo (VPH-AR) interfiere con la función de las proteínas celulares y con la expresión de los productos de los genes de la célula¹³.

En las lesiones benignas producidas por el VPH, el ADN viral está localizado fuera de los cromosomas o en forma episomal, a nivel del núcleo; en las NICs y CaCu, el ADN del VPH está generalmente integrado al genoma

o al ADN de la célula huésped. En algunos casos, la forma episomal y la forma integrada al ADN celular están presentes simultáneamente en la célula huésped^{13,78}.

El evento central e importante para la transformación maligna de las células infectadas es la integración del ADN del HPV-AR al ADN celular; esta integración interrumpe o bloquea el ORF E2, lo que ocasiona la pérdida de su expresión^{5,13,78,79}. Este bloqueo de la función del gen E2, la cual normalmente regula la transcripción de los genes E6 y E7, conduce a un incremento de la expresión de ellos. En los VPH-AR, las proteínas E6 y E7 tienen una alta afinidad por la p53 y pRB, esta unión altera la función normal de estas proteínas celulares que intervienen en el control del ciclo celular originando un aumento de la tasa de proliferación e inestabilidad genómica. Como consecuencia la célula infectada acumula cada vez más un ADN dañado que no puede ser reparado. La proteína E6 forma un complejo E6-AP al degradar o bloquear la p53^{80,81}, el resultado del bloqueo de la p53 es la pérdida de la capacidad que tiene dicha proteína de producir el arresto o detención del crecimiento celular y la apoptosis lo que trae como consecuencia el daño al ADN de la célula infectada^{82,83}. Asimismo, como mencionamos anteriormente se afectan otras vías independientes de la p53 como son: 1. La activación de la telomerasa⁸⁴; 2. La inhibición de la degradación de la familia SRC tirosina quinasas Blk⁸⁵ y 3. La unión o la degradación de proteínas celulares en el dominio PDZ⁸⁶. Estas vías afectadas juegan un papel adicional en la transformación oncogénica inducida por el VPH-AR. La proteína E7 además de degradar o inhibir la pRB y provocar la liberación del factor de transcripción E2F y la sobreexpresión de la p16^{Ink4A}, también interactúa y degrada las llamadas “proteínas de bolsillo”: la p107 y la p130^{87,88}. Por otra parte, la proteína E5 es la otra oncoproteína que estimula la actividad transformadora del factor de crecimiento epidérmico y parece tener importancia en la fase inicial de la infección, como menciona-

mos anteriormente⁸⁹, pero no está claro qué papel juegan las otras proteínas tempranas: E1, E2 y E4, en el proceso de malignización. Las 2 proteínas estructurales L1 y L2 no se encuentran expresadas en las células premalignas ni malignas. Los genes E6 y E7 inactivan los genes supresores de tumor como la p53 y la pRB, respectivamente, como hemos mencionado anteriormente; esta capacidad que tienen los VPH-AR ha permitido diferenciarlos de los VPH-BR.

La inmortalización del virus en las células infectadas requiere de la cooperación de las proteínas E6 y E7, sin embargo, la proteína E7 por sí sola, en niveles muy elevados, es capaz de inmortalizarse en la célula infectada^{13,90}, como mencionamos anteriormente la alteración de las proteínas celulares conlleva a un aumento de su proliferación y a una inestabilidad genómica y como consecuencia se acumula en la célula infectada e inmortalizada por el VPH, más y más daño en su ADN, de tal forma, que se hace imposible su reparación y eventualmente, las mutaciones acumuladas conducen a la célula hacia una transformación maligna; en adición a los oncogenes activados y a la inestabilidad cromosómica, se agregan la metilación del ADN celular y viral, la activación de la telomerasa y factores hormonales e inmunológicos que contribuyen a esta transformación maligna de la célula infectada. La progresión de las lesiones premalignas al CaCu toma en ocasiones más de 2 décadas, aunque algunos pacientes pueden desarrollar el CaCu más rápido que otras, incluso entre 1 a 2 años^{13,91}.

En las infecciones por los VPH-BR generalmente, la proteína E6 no se une a la p53 en niveles detectables y la proteína E7 se une a la pRB con una baja afinidad^{13,82}.

Inmunopatología de la infección del VPH

La inflamación crónica está asociada con el desarrollo de procesos malignos, entre ellos el CaCu. Aproximadamente un tercio de los tumores cancerosos están ligados a procesos inflamatorios debido a microorganismos⁹². En el caso del CaCu, durante el

evento inflamatorio crónico se produce una sobrerregulación de las citocinas y la presencia de células del sistema inmune en el tejido del CU que modulan la inflamación como también la progresión o regresión de la lesión premaligna del CU ^{92,93}.

Varios mecanismos presentes en las personas inmunocompetentes poseen un papel crítico en prevenir el inicio y la evolución de la lesión activa o subclínica de la infección del VPH. Estos mecanismos de defensa permiten que la mayoría de las infecciones por el virus se eliminen después de un tiempo relativamente corto con poca a ninguna secuela de la infección. Hay evidencias indican que la regresión de las lesiones inducidas por el VPH es la consecuencia de la respuesta inmune mediada por células ⁹⁴.

La producción y liberación de varias citoquinas por células cervicales y por células componentes del sistema inmune innato tales como los macrófagos, células asesinas naturales y leucocitos tipo linfocitos pueden ser activadas por estímulos antigénicos, que incluyen la infección por VPH ^{92,94}. El VPH es capaz de inducir un bloqueo o disminución de la expresión del interferón (IFN), un aumento de la interleucina 10 (IL-10) y del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) para producir una inmunosupresión local que junto con los antígenos de superficies tumorales forman una red que inhibe la respuesta inmune antitumoral ⁹⁵.

Boccardo y col. ⁹⁴ también han mencionado que la respuesta inmune debida a la pre-

sencia de la infección viral se debe a que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 (IL-1) y el interferón-alfa y beta (IFN- α y β) inhiben in vitro la transcripción de los oncogenes virales y el crecimiento de líneas celulares que posee el genoma viral. Sin embargo, como es sabido, un pequeño número de casos evaden la respuesta inmune, provocando que la infección persista, provocando el desarrollo de lesiones premalignas y CaCu. La infección viral persistente se ha relacionado con la inflamación crónica que como se mencionó arriba es un cofactor en el desarrollo de tumores cancerosos ⁹⁶.

Según Tindle ⁹⁷, un aspecto clave de la persistencia o eliminación de la infección del VPH, es que el virus logre evadir o no la respuesta inmune innata del huésped en vez de inhibirla. Esto se debe a que se logre o no, una combinación de factores que incluyen la restricción de la replicación e infección del virus en los sitios anatómicos específicos, la ausencia de lisis celular y una disminución de los niveles de expresión de las proteínas virales. Otros factores que pueden contribuir a evitar el sistema inmunológico del huésped son también, la disminución a la exposición a este sistema que desencadena potentes mecanismos antivirales e inmunomoduladores tales la activación de la vía IFN y la producción del TNF- α e IL-1. En la Tabla 3 se puede observar el efecto de las diferentes citocinas sobre la evolución de la neoplasia intraepitelial cervical.

Tabla 3

Efectos de las citocinas en la evolución de la neoplasia intraepitelial cervical

| Neoplasia intraepitelial cervical | Citocinas |
|-----------------------------------|---|
| Previene progresión | IL-2, INF- γ , IL-12, IL-21, IL-10, IL-32, IL-37, and TGF- β 1 |
| Inducen progresión | IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-32, TGF- β 1, MCP-1, y RANTES |
| Efecto dual | IL-10, IL-32, and TGF- β 1 |

Reproducido con permiso de: Carrero YN, Callejas DE, Mosquera JA. In situ immunopathological events in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: Review. *Transl Oncol.* 2021 May;14(5):101058. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101058. Epub 2021 Mar 4.

Regresión de la infección y latencia del VPH

La progresión de la infección por el VPH al CaCu solo ocurre en un porcentaje pequeño de mujeres infectadas por el virus ya que la mayoría de esas infecciones son aclaradas o eliminadas⁹⁸⁻¹⁰⁰. La infección es predominantemente una infección limitada por sí misma con una duración media de aproximadamente 8 a 12 meses⁵; el tipo de VPH que sea más persistente tiene más probabilidad de incorporarse al genoma de la célula infectada y llegar a producir su transformación maligna. La persistencia del virus en la célula es el factor clave en la patogenicidad del tipo del VPH⁷⁹. El VPH tipo 16 es el tipo más probable de persistir que cualquier otro tipo^{5,41,100}, es decir, su capacidad oncogénica viene dada por su habilidad de persistir y producir lesiones NIC y CCU en comparación con otros tipos oncogénicos y no oncogénicos (5). Sin embargo, hay varios VPHs de BR como son: 54, 61 y 71, que persisten como los de AR, pero no son capaces de progresar y producir la transformación maligna de la célula (5). En resumen, la persistencia de la infección viral es un mecanismo común usado tanto por los tipos de AR y BR, sin embargo, los tipos de AR y en especial el tipo 16 por su elevada prevalencia y capacidad oncogénica son promotores de la progresión de la infección hacia la malignización de la célula huésped⁵.

A pesar de los esfuerzos que realiza el virus para evadir los mecanismos defensivos del huésped, casi todas las infecciones que persisten inicialmente son controladas inmunológicamente². A pesar de que se puede lograr la eliminación temprana de la infección por las respuestas inmunológicas innatas del huésped, la regresión de la lesión requiere una respuesta eficaz de las células T que implica linfocitos T citotóxicos CD8 + antígenos específicos y las células CD4 + T helper 1 (TH1) (que producen IL-2 e IFN- γ) que reconocen las proteínas virales E6, E7 y E2. Estas células circulantes, los linfocitos T CD8 + y CD4 + se infiltran en

la lesión y superan en número a las células reguladoras CD25 +¹⁰¹. A pesar de esta intensa respuesta local, la respuesta sistémica de las células a antígenos específicos T es débil, a menudo transitoria y difícil de medir o determinar que los efectores celulares han sido identificados, la regresión de los CIN 1 producidos por el VPH 16 no se correlaciona con la presencia de las células citotóxicas granzima B + CD8 + y CD56 +^{101,102}. Asimismo, el agravamiento de la lesión precancerosa está asociado con un bajo número o ausencia de antígenos específicos de células T circulantes, y a medida que se empeora la lesión las células regulatorias CD25+ dominan el infiltrado celular local¹⁰³. Debido a que las células del epitelio afectado están inmunocomprometidas, las quimioquinas y sus receptores, que son necesarios para la presencia de las células T intraepiteliales, se encuentran disminuidos¹⁰⁴. Más aún, los niveles locales de IFN- γ están disminuidos y los niveles del IL-10 y el TGF- β (citocinas que bloquean la producción de citocinas proinflamatorias e inhiben la proliferación de las células TH-1 y de las células citotóxicas) están incrementados. Estudios realizados en conejos y perros con virus del papiloma para sus especies han sido utilizados como modelos para estudiar el comportamiento de los VPH en los epitelios humanos; en estos animales, una vez infectados por el virus se produce una infiltración linfocitaria con regresión de la lesión entre la semana 8 y 12 de post-infección y para la semana 16 se observa un epitelio sano^{105,106}. Este patrón de comportamiento de la infección y mecanismo defensivo ha sido reportado también en el ganado vacuno¹⁰⁷.

Sin embargo, la eliminación de la infección productiva o de un NIC 1 producida por el VPH por el sistema inmune del huésped no necesariamente conduce a una eliminación total de genoma viral en las células basales del epitelio, es decir, se mantiene el virus en forma latente o sea una infección latente^{97,104,108,109}, lo cual encaja bien con la observación de que el mantenimiento del genoma

viral requiere solo una expresión limitada del gen viral y el sistema de vigilancia por las células inmunes innatas que se encuentra en la capa basal del epitelio previene una reactivación de la infección del VPH. Zhang y col.¹¹⁰ han sugerido que durante la infección latente la expresión de los genes está restringida a los E1 y E2 y no se requiere los genes E6 y E7.

Cuando se compara la prevalencia de la infección del VPH en la población general, el número de casos o lesiones que progresan al cáncer es bajo (7). Rodríguez y col.⁴¹ reportaron que un 67% de las infecciones se elimina o aclara en un plazo de 12 meses, sin embargo, si la infección persiste por lo menos 12 meses, el riesgo de desarrollar un NIC2+ en 30 meses es del 21% y el riesgo es más elevado en mujeres menores de 30 años infectadas con el VPH 16, si la infección persiste por lo menos 12 meses. El riesgo de progresión de una displasia leve o NIC 1 a una displasia severa o NIC 3 es del 1% por año mientras que el riesgo de progresión de una displasia moderada o NIC 2 a displasia severa o NIC 3 es del 16% en 2 años y del 25% en 5 años¹³.

CONCLUSIÓN

Los mecanismos y procesos descritos previamente nos explican como el VPH produce la infección productiva y no productiva en las células de los epitelios escamoso estratificados del ser humano en especial el del cuello uterino. Nos explican además como la infección por el virus puede producir lesiones benignas y lesiones malignas, asimismo nos explica él por qué se clasifican en VPH de AR y BR. Estos procesos han permitido entender el comportamiento del virus y establecer el tratamiento primario para la prevención del CaCu.

Numero ORCID de autor

- José Núñez-Troconis:
0000-0002-5334-7265

REFERENCIAS

1. **Willemsen A, Bravo IG.** Origin and evolution of papillomavirus (onco)genes and genomes *Phil. Trans. R. Soc. B* 2019 374: 20180303. <http://doi.org/10.1098/rstb.2018.0303>.
2. **Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S.** Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16086. doi: 10.1038/nrdp.2016.86.
3. **Van Doorslaer K, Bernard HU, Chen Z, de Villiers EM, zur Hausen H, Burk RD.** Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trends Microbiol.* 2011;19(2):49-50. doi: 10.1016/j.tim.2010.11.004.
4. **Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V.** Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2015;53(2): S166-S171. Disponible en: <https://www.re-dalyc.org/articulo.oa?id=457744942008>
5. **Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K.** Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):281-290. doi: 10.1159/000214919.
6. **Conway MJ, Meyers C.** Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009;88(4):307-317. doi: 10.1177/0022034509333446
7. **Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 (Suppl 5):F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083.
8. **Senba M, Mori N.** Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev*. 2012; 6(2):e17. doi: 10.4081/oncol.2012.e17
9. **Ochoa-Carrillo FJ.** Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III. *GAMO* 2014;13:308-315. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-virusdep>

10. **Taxonomy.** ICTV. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Revisado en marzo 14, 2023.
11. **Papillomaviridae.** *Virus taxonomy*. 2020 Release. ICTV 9th Report. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae. Revisado en: marzo 14, 2023
12. **Human reference clones.** International Human Papillomavirus Reference Center. Swedish National HPV Reference Laboratory. Karolinska Institutet. Disponible en https://www.hpvcntr.se/human_reference_clones/. Revisado en marzo 14, 2023.
13. **Burd EM.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.
14. **Núñez-Troconis, J.** Epidemiología del virus del papiloma humano. *Invest Clin* 63(2): 170 - 184, 2022. <https://doi.org/10.54817/IC.v63n2a07>.
15. **Bosch FX, de Sanjosé S.** The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007; 23(4):213-27. doi: 10.1155/2007/914823.
16. **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 the World. Summary Report 17 June 2019 (updated 2019-07-27 08:33:24). Revisado en enero 15, 2022.
17. **Brown AJ, Trimble CL.** New technologies for cervical cancer screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012 Apr;26(2):233-42. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2011.11.001.
18. **Mistry N, Wibom C, Evander M.** Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. *Virol J*. 2008;5:118. doi: 10.1186/1743-422X-5-118.
19. **Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM.** The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999;274(9):5810-22. doi: 10.1074/jbc.274.9.5810.
20. **Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M.** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001;75(3):1565-70. doi: 10.1128/JVI.75.3.1565-1570.2001.
21. **Rivera R, Delgado Jorge, Paniel V, Barrero R, Larraín A.** (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus del papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chilena Obstet Ginecol* 71(2), 135-140. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262006000200011>
22. **Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA.** Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71(3):2449-2456. doi: 10.1128/JVI.71.3.2449-2456.1997. PMID: 9032382.
23. **McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M.** Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 1999;261(2):271-279. doi: 10.1006/viro.1999.9825.
24. **Selinka HC, Giroglou T, Sapp M.** Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 2002;299(2):279-287. doi: 10.1006/viro.2001.1493.
25. **Day PM, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307(1):1-11. doi: 10.1016/s0042-6822(02)00143-5.
26. **Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P.** Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 2003;77(6):3846-3850. doi: 10.1128/jvi.77.6.3846-3850.2003.
27. **Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC.** Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(5):a016725. doi: 10.1101/cshperspect.a016725.
28. **Anderson RG.** Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(23):10909-10913. doi: 10.1073/pnas.90.23.10909.
29. **Merle E, Rose RC, LeRoux L, Moroiannu J.** Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin alpha-2beta1 heterodimers. *J Cell Biochem* 1999;74(4):628-637.

30. Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 2002;277(26):23958-64. doi: 10.1074/jbc.M200724200.
31. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U SA*. 2004;101(39):14252-14257. doi: 10.1073/pnas.0404229101.
32. Zhang P, Monteiro da Silva G, Deatherage C, Burd C, DiMaio D. Cell-penetrating peptide mediates intracellular membrane passage of Human Papillomavirus L2 Protein to trigger retrograde trafficking. *Cell* 2018 Sep 6;174(6):1465-1476.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.031.
33. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110(5):525-541. doi: 10.1042/CS20050369.
34. Schwartz S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology* 2013;445,187-196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>
35. Liu Z, Rashid T, Nyitray AG. Penises not required: a systematic review of the potential for human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile penetration. *Sex Health* 2016;13(1):10-21. doi: 10.1071/SH15089.
36. Sundström K, Ploner A, Arnheim-Dahlström L, Eloranta S, Palmgren J, Adami HO, Ylitalo Helm N, Sparén P, Dillner J. Interactions Between High- and Low-Risk HPV Types Reduce the Risk of Squamous Cervical Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015;107(10):djv185. doi: 10.1093/jnci/djv185.
37. Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Schiffman M, Rodríguez AC, Hildesheim A, Burk RD, Plummer M. Clustering of multiple human papillomavirus infections in women from a population-based study in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2011;204(3):385-390. doi: 10.1093/infdis/jir286.
38. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. New Mexico HPV Pap Registry Steering Committee. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis* 2014;209(6):855-864. doi: 10.1093/infdis/jit577.
39. de Araujo-Souza PS, Ramanakumar AV, Candeias JM, Thomann P, Trevisan A, Franco EL, Villa LL; Ludwig-McGill. Cohort Study. Determinants of baseline seroreactivity to human papillomavirus type 16 in the Ludwig-McGill cohort study. *BMC Infect Dis* 2014;14: 578. doi: 10.1186/s12879-014-0578-0.
40. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010;202(12):1789-1799. doi: 10.1086/657321.
41. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R. Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(7):513-517. doi: 10.1093/jnci/djn044.
42. Núñez-Troconis J, Delgado M, González J, Mindiola R, Velásquez J, Conde B, Whitby D, Munroe DJ. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area. *Invest Clin* 2009;50(2):203-212.
43. Schiffman M 2, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590):890-907. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0.
44. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014;383(9916):524-532. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62218-7.
45. de Martel C, Shiels MS, Franceschi S, Sirmard EP, Vignat J, Hall HI, Engels EA, Plummer M. Cancers attributable to infec-

- tions among adults with HIV in the United States. *AIDS* 2015 Oct 23;29(16):2173-81. doi: 10.1097/QAD.0000000000000808.
46. **International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S.** Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;118(6):1481-1495. doi: 10.1002/ijc.21493.
47. **International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S.** Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;119(5):1108-1124. doi: 10.1002/ijc.21953.
48. **International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S.** Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007;370(9599):1609-1621. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61684-5.
49. **Gargano JW, Nisenbaum R, Lee DR, Ruffin MT 4th, Steinau M, Horowitz IR, Flowers LC, Tadros TS, Birdsong G, Unger ER.** Age-group differences in human papillomavirus types and cofactors for cervical intraepithelial neoplasia 3 among women referred to colposcopy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(1):111-21. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0664.
50. **Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF.** Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 2009;5(2):e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.
51. **Flores ER, Lambert PF.** Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* 1997;71(10):7167-7179. doi: 10.1128/JVI.71.10.7167-7179.1997.
52. **Gilbert DM, Cohen SN.** Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* 1987;50(1):59-68. doi: 10.1016/0092-8674(87)90662-3.
53. **Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K.** Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* 2006;80(9):4431-4439. doi: 10.1128/JVI.80.9.4431-4439.2006.
54. **Doorbar J.** Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol* 2013;3(4):416-421. doi: 10.1016/j.coviro.2013.06.003.
55. **Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J.** Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* 2015;7(7):3863-3890. doi: 10.3390/v7072802.
56. **Cladel NM, Hu J, Balogh K, Mejia A, Christensen ND.** Wounding prior to challenge substantially improves infectivity of cottontail rabbit papillomavirus and allows for standardization of infection. *J Virol Methods* 2008;148(1-2):34-39. doi: 10.1016/j.jviro.2007.10.005.
57. **Valencia C, Bonilla-Delgado J, Oktaba K, Ocádiz-Delgado R, Gariglio P, Covarrubias L.** Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *J Invest Dermatol* 2008;128(12):2894-2903. doi: 10.1038/jid.2008.156.
58. **Doorbar J.** The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S7-15. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006.
59. **Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yūgawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T.** The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 2012;86(6):3276-3283. doi: 10.1128/JVI.06450-11.

60. Flores ER 2, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF. Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology* 1999;262(2):344-354. doi: 10.1006/viro.1999.9868.
61. Bernard HU. Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 2013;445(1-2):197-204. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.035.
62. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006;11:2286-2302. doi: 10.2741/1971.
63. Bodily JM, Hennigan C, Wrobel GA, Rodríguez CM. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology* 2013;443(1):11-19. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.033.
64. Syrjänen SM, Syrjänen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* 1999;31(3):175-187. doi: 10.3109/07853899909115976.
65. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999;18(53):7690-7700. doi: 10.1038/sj.onc.1202953.
66. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *JNCI* 2000;92(9):690-698. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.690>
67. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003;77(19):10186-10201. doi: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003
68. Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* 2002;76(21):10914-10920. doi: 10.1128/jvi.76.21.10914-10920.2002.
69. Gu Z, Matlashewski G. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* 1995;69(12):8051-8056. doi: 10.1128/JVI.69.12.8051-8056.1995.
70. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 1999;274(5):2696-2705. doi: 10.1074/jbc.274.5.2696.
71. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 1998;72(9):7407-7419. doi: 10.1128/JVI.72.9.7407-7419.1998.
72. Penrose KJ, McBride AA. Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 2000;74(13):6031-6038. doi: 10.1128/jvi.74.13.6031-6038.2000.
73. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* 1997;16(3):504-514. doi: 10.1093/emboj/16.3.504.
74. Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000;275(1):87-94. doi: 10.1074/jbc.275.1.87.
75. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2002;76(19):9806-9818. doi: 10.1128/jvi.76.19.9806-9818.2002.
76. Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 2004;78(13):7199-7207. doi: 10.1128/JVI.78.13.7199-7207.2004.
77. Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson PJ, Walker PA, Laskey P, Omary MB, Doorbar J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 2004;78(2):821-833. doi: 10.1128/jvi.78.2.821-833.2004.

78. Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, Kudo T. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3514-3517. doi: 10.1128/JCM.37.11.3514-3517.1999
79. García-Tamayo J, Molina J, Blasco-Olaechea. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical: Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Invest. Clín* 2010;51(2):193-208. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332010000200004&lng=es.
80. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63(6):1129-1136. doi: 10.1016/0092-8674(90)90409-8.
81. Scheffner M2, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75(3):495-505. doi: 10.1016/0092-8674(93)90384-3.
82. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(9):3988-3992. doi: 10.1073/pnas.90.9.3988.
83. Matlashewski G, Banks L, Pim D, Crawford L. Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells. *Eur J Biochem* 1986;154(3):665-672. doi: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09449.x.
84. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001;75(9):4467-4472. doi: 10.1128/JVI.75.9.4467-4472.2001.
85. Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(17):9557-9562. doi: 10.1073/pnas.96.17.9557.
86. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(21):11612-11616. doi: 10.1073/pnas.94.21.11612.
87. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243(4893):934-937. doi: 10.1126/science.2537532.
88. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998;396(6706):84-88. doi: 10.1038/23962.
89. Münger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989;63(10):4417-4421. doi: 10.1128/JVI.63.10.4417-4421.
90. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 1991;65(1):473-478. doi: 10.1128/JVI.65.1.473-478.1991.
91. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(3):252-258. doi: 10.1093/jnci/91.3.252.
92. Carrero YN, Callejas DE, Mosquera JA. In situ immunopathological events in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: Review. *Transl Oncol* 2021 May;14(5):101058. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101058. Epub 2021 Mar 4.
93. Hemmat N, Bannazadeh Baghi H. Association of human papillomavirus infection and inflammation in cervical cancer. *Pathog Dis* 2019 Jul 1;77(5):ftz048. doi: 10.1093/femspd/ftz048.
94. Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010 Nov;31(11):1905-12. doi: 10.1093/carcin/bgq176. Epub 2010 Sep 5.

95. Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol* 2014 Oct 10;5(4):753-63. doi: 10.5306/wjco.v5.i4.753.
96. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med* 2019 Jul-Sep;18(3):121-126. doi: 10.4103/aam.aam_56_18.
97. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2002 Jan;2(1):59-65. doi: 10.1038/nrc700.
98. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/42-51. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.018.
99. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1831-1836. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04956-4.
100. Rodríguez AC 2, Burk R, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Solomon D, Guillen D, Alfaro M, Viscidi R, Morales J, Hutchinson M, Wacholder S, Schiffman M. The natural history of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia among young women in the Guanacaste cohort shortly after initiation of sexual life. *Sex Transm Dis* 2007;34(7):494-502. doi: 10.1097/01.olq.0000251241.03088.a0
101. Woo YL, Sterling J, Damay I, Coleman N, Crawford R, van der Burg SH, Stanley M. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG* 2008;115(13):1616-21; discussion 1621-1622. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.01936.x.
102. van der Burg SH, de Jong A, Welters MJ, Offringa R, Melief CJ. The status of HPV16-specific T-cell reactivity in health and disease as a guide to HPV vaccine development. *Virus Res* 2002; 89(2):275-84. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00196-x
103. Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jäger P, van Baarle D, Schuurinġ E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* 2007;150(2):199-209. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03468.x
104. Moore RA, Nicholls PK, Santos EB, Gough GW, Stanley MA. Absence of canine oral papillomavirus DNA following prophylactic L1 particle-mediated immunotherapeutic delivery vaccination. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 9):2299-2301. doi: 10.1099/0022-1317-83-9-2299.
105. Christensen ND, Cladel NM, Reed CA, Han R. Rabbit oral papillomavirus complete genome sequence and immunity following genital infection. *Virology* 2000;269(2):451-461. doi: 10.1006/viro.2000.0237.
106. Nicholls PK, Moore PF, Anderson DM, Moore RA, Parry NR, Gough GW, Stanley MA. Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology*. 2001;283(1):31-39. doi: 10.1006/viro.2000.0789.
107. Knowles G, O'Neil BW, Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* 1996;70(12):8451-8458. doi: 10.1128/JVI.70.12.8451-8458.1996.
108. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011;414(2):153-163. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.019.
109. Maglennon GA, McIntosh PB, Doorbar J. Immunosuppression facilitates the reactivation of latent papillomavirus infections. *J Virol* 2014;88(1):71071-6. doi: 10.1128/JVI.02589-13.
110. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 1999;263(2):388-394. doi: 10.1006/viro.1999.9950.

Matrix metalloproteinase 2 expression and disease-free survival of patients with osteosarcoma: a meta-analysis.

Tianshu Gao, Zhenting Wang, and Yi Liu

Department of Orthopedics, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu Province, China.

Keywords: meta-analysis; MMP-2; osteosarcoma; prognosis.

Abstract. Numerous studies indicate the influence of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) overexpression in osteosarcoma (OS) outcomes. A previous study has systematically analyzed the correlation between MMP-2 expression and the prognosis of OS. However, the results of subsequent studies remain inconsistent. Therefore, a meta-analysis in terms of the prognostic value of MMP-2 expression in OS was conducted. We employed the Newcastle-Ottawa scale (NOS) to evaluate the quality of the studies. Five studies involving 284 patients were included. The relative risk (RR) with a corresponding 95% confidence interval (95%CI) was calculated to appraise the predictive value of MMP-2 positive expression for OS recurrence and metastasis, and lower disease-free survival. It was indicated by the results that MMP-2 positive individuals with OS had higher recurrence and metastasis rates than negative individuals (RR=1.85, 95%CI:1.16-2.93, $p<0.01$). Sensitivity analysis showed that the combined RR was stable. There was no significant change, independently of whichever article was excluded.

Expresión de la metaloproteinasa de matriz 2 y supervivencia libre de enfermedad de pacientes con osteosarcoma: un metanálisis

Invest Clin 2023; 64 (2): 255 – 262

Palabras clave: metanálisis; MMP-2; osteosarcoma; pronóstico.

Resumen. Numerosos estudios indican la influencia de la sobreexpresión de la metaloproteinasa-2 de matriz (MMP-2) en los resultados del osteosarcoma (OS). En un estudio previo se analizó sistemáticamente la correlación entre la expresión de MMP-2 y el pronóstico del OS. Sin embargo, los resultados de estudios posteriores siguen siendo inconsistentes. Por lo tanto, se llevó a cabo un metanálisis en términos del valor pronóstico de la expresión de MMP-2 en el OS. Se empleó la escala de Newcastle-Ottawa (NOS) para evaluar la calidad de los estudios. Se incluyeron 5 estudios con 284 pacientes y se calculó el riesgo relativo (RR) con su correspondiente intervalo de confianza del 95% (ic95%) para evaluar el valor predictivo de la expresión positiva de MMP-2 para recidiva de OS y metástasis, y menor supervivencia libre de enfermedad. Los resultados indicaron que los individuos positivos para MMP-2 con OS presentaron mayor tasa de recidiva y metástasis que los individuos negativos (RR= 1,85; ic 95%: 1,16-2,93; $p < 0,01$). El análisis de sensibilidad mostró que el RR combinado era estable. Cualquiera que fuera el artículo excluido, no hubo ningún cambio significativo.

Received: 19-09-2022

Accepted: 06-11-2022

INTRODUCTION

Osteosarcoma (OS) is one of the most common primary malignant bone tumors, which mainly afflicts children, adolescents, and young adults. The incidence rate of OS worldwide is 1 to 3 per million people every year^{1,2}. Owing to advanced surgical procedures and combined chemotherapy, the survival rate of OS sufferers has improved from under 20% to 70%³. Nevertheless, this improvement was limited to individuals with local or earlier-stage OS, and the survival rate of individuals with recurrences or metastasis has not improved⁴. At present, the pathogenesis of OS remains ambiguous⁵. Consid-

ering there is no suitable biomarker to estimate the prognosis of OS, it is crucial to find an appropriate biomarker to identify those critical patients and give them individualized treatment on time.

Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) pertains to the family of zinc-dependent endopeptidases. It is associated with diverse cytological processes, including cell proliferation, migration, apoptosis, angiogenesis, and immunity⁶. Previous studies have shown its overexpression in endometrial, oral epithelial, and hepatocellular carcinoma and generally predicted poorer prognosis⁷⁻⁹. MMP-2 may also be related to the prognosis of OS sufferers, but the conclusions remain

controversial¹⁰⁻¹⁴. Therefore, we performed a meta-analysis to systematically evaluate the correlation between the expression of MMP-2 and OS recurrence and metastasis.

MATERIALS AND METHODS

Search strategy

A systematic search was performed in PubMed, Embase, Cochrane Library, Wanfang database and China National Knowledge Internet (CNKI) for relevant articles that were published before February 9, 2021 with no language restrictions. These terms were included: “osteosarcoma” or “osteogenic sarcoma” and “matrix metalloproteinase 2” or “MMP-2”. The ethics approval is inappropriate because meta-analysis is based on former studies.

Inclusive and exclusive criteria

Inclusive criteria:

1. MMP-2 expression in OS tissues was determined by immunohistochemical staining;
2. Patients were pathologically diagnosed with OS (gold standard);
3. Included studies had to be cohort studies;
4. Sufficient information for constructing a 2×2 contingency table was available in these studies.

Exclusive criteria:

1. No pathology was applied to confirm the diagnosis of OS;
2. The critical value for positive versus negative expression was not given;
3. Review articles, case reports, dissertations, and articles on in vitro cell experiments and animal experiments.
4. MMP-2 expression was not recorded with dichotomous variables, or the patient survival outcomes were unidentified.
5. Earlier and smaller sample size studies were excluded for articles with the same patient population from the same authors.

Data extraction

Two investigators (TG and ZW) extracted the data separately from selected articles. Two investigators (YL and TG) reached a consensus and then crosschecked the data extracted. The main information extracted from the ultimately selected studies is presented below, including the first author's name, publication year, number of participants, and the critical value. MMP-2 expression was divided into positive and negative groups according to the critical values provided in the articles.

Quality assessment

Newcastle-Ottawa scale (NOS)¹⁵ was employed to evaluate the quality of the studies. NOS possesses eight indicators with a total of nine stars. Studies obtaining a score of no less than six stars were included.

Statistical analysis

The pooled risk ratio (RR) with 95% confidence intervals (95%CI) was calculated to evaluate the predictive value of MMP-2 expression for OS recurrence and metastasis. The significance of the pooled RR was then checked through the Z test, which was considered significant when the P value was <0.05. The heterogeneity between the studies was evaluated through I² statistics, which described the proportion of total variation in meta-analysis assessment from 0 to 100%. The random effect model was used in this meta-analysis. We also adopted Begg's funnel plot together with Egger's test to evaluate the probability of publication bias. The statistical analysis was performed by The Review Manager 5.3 (RevMan 5.3) and Stata version 12.0 (Stata Corporation) softwares. The 2-tailed P value under 0.05 would be considered statistically significant.

RESULTS

Selection and study characteristics

Five cohort studies¹⁰⁻¹⁴ with 284 individuals were included in the primary retriev-

al and ulterior evaluation of full texts (Fig. 1). Two of them were written in English, and the other three were written in Chinese. Among the 284 individuals, 191(67.3%) individuals were positive for MMP-2 expression, and 93(32.7%) individuals were negative for MMP-2 expression. The other study characteristics are shown in Table 1.

Quality assessment of studies

We evaluated the quality of the included cohort studies through the NOS. The scores ranged from 6 to 8 stars, with an average score of 6.6 stars. The characteristics of the included studies are shown in Table 1, and the detailed scores for each study are listed in Table 2.

Meta-analysis

The combined RR for evaluating the correlation between positive MMP-2 expression and OS recurrence and metastasis is (RR=1.85, 95%CI:1.16-2.93, $p < 0.01$) (Fig. 2). This also indicated that removing any separate study did not significantly change our results. The Begg funnel plot and Egger's

test assessed the publication bias. The funnel plot suggested that there was no obvious publication bias in this meta-analysis (Fig. 3), and the same outcome was obtained by the Egger's test ($p > 0.1$).

DISCUSSION

OS is one kind of primary bone tumor mainly afflicting the young generation^{16,17}. The survival rate of local or earlier-stage OS patients has increased by over 70% owing to advanced surgical techniques and combined chemotherapy. Still, the prognosis of patients with recurrence or metastasis remains tragic¹⁸. Therefore, it is vital to identify high-risk patients through appropriate biomarkers and give them individualized treatment as soon as possible.

Belonging to the zinc-dependent endopeptidase, MMP-2 hydrolyzes diverse molecules in the extracellular matrix. For example, it participates in numerous biological processes, including cell proliferation, differentiation, adhesion, and migration. Its overexpression is usually associated with

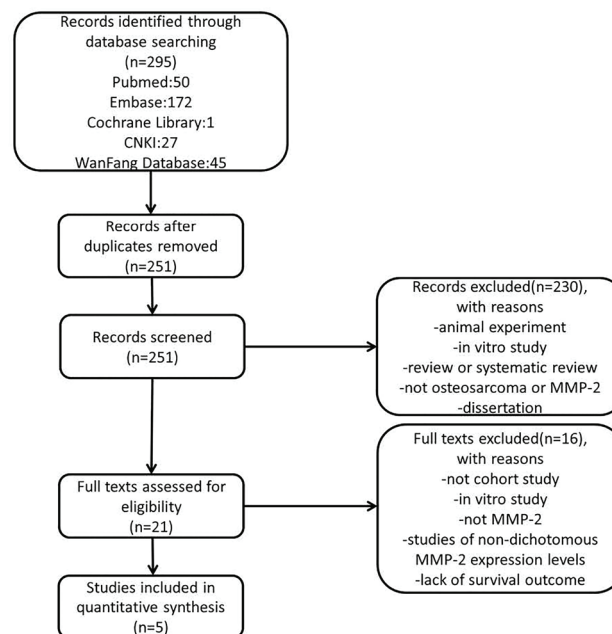


Fig. 1. Schematic representation of the study selection.

Table 1
Characteristics of included studies and NOS scores.

| Reference | Study | Year | No. of individuals | Average age (y) | Average follow-up period (m) | Critical value | MMP-2 positive Recurrence or metastasis | MMP-2 negative Total | NOS score |
|-----------|---------------|------|--------------------|-----------------|------------------------------|----------------|---|----------------------|-----------|
| [10] | Gong 2020 | 2020 | 73 | 23 | 42 | >25% | 26 | 40 | 33 |
| [11] | Guo 2004 | 2004 | 60 | 21.8 | 17.6 | >5% | 20 | 46 | 14 |
| [12] | Li 2006 | 2006 | 56 | 18 | 47 | ≥10% | 23 | 30 | 26 |
| [13] | Uchibori 2006 | 2006 | 47 | 25.6 | 43.3 | >10% | 15 | 41 | 6 |
| [14] | Zhou 2015 | 2015 | 48 | 12.4 | 24 | >5% | 8 | 34 | 14 |

Table 2
Detailed scores of included studies according to NOS scale.

| Reference | Study | Representativeness of exposed cohort | Selection of non-exposed cohort | Ascertainment of exposure | Outcome present at the start of the study | Comparability | Assessment of outcome | Follow-up long enough | Adequacy of follow-up | NOS score |
|-----------|---------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| [10] | Gong 2020 | * | 0 | * | * | * | * | * | * | 7 |
| [11] | Guo 2004 | * | 0 | * | * | 0 | * | * | * | 6 |
| [12] | Li 2006 | 0 | 0 | * | * | * | * | * | * | 6 |
| [13] | Uchibori 2006 | * | * | * | * | * | * | * | * | 8 |
| [14] | Zhou 2015 | * | 0 | * | * | 0 | * | * | * | 6 |

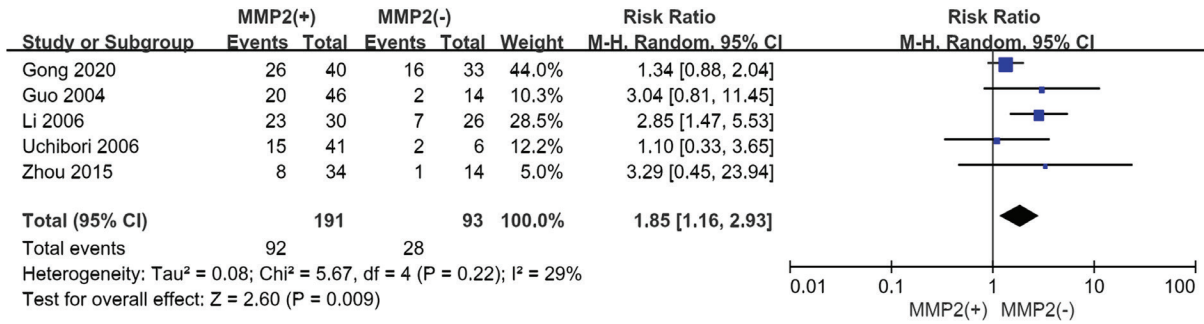


Fig. 2. Expression of MMP-2 and recurrence and metastasis rate of OS patients.

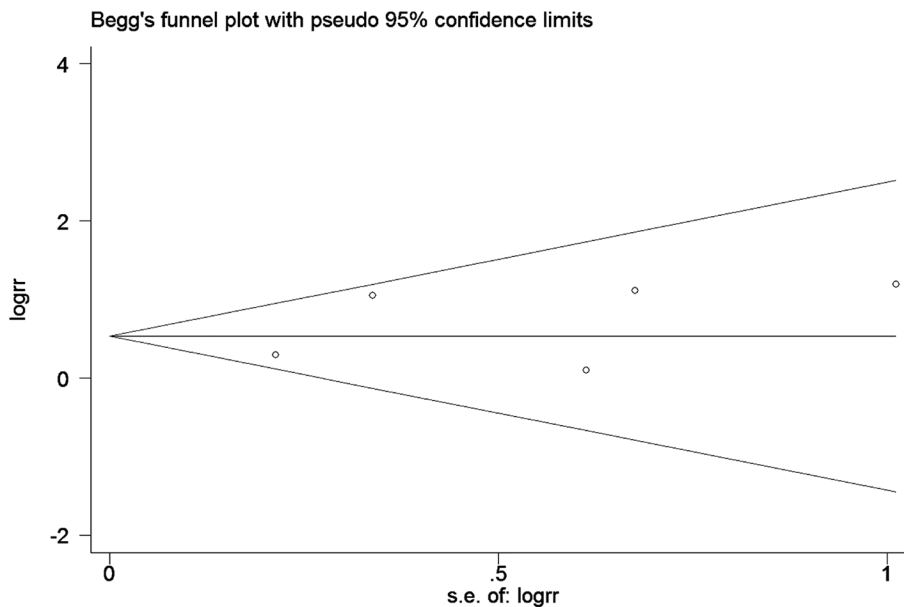


Fig. 3. Funnel plot for the publication bias.

the malignant phenotype of tumors¹⁹. Previous meta-analysis has suggested that MMP-2 overexpression has a close association with poor prognosis of ovarian cancer, non-small cell lung cancer, and gastric cancer²⁰⁻²². Therefore, we conducted a meta-analysis to estimate the relevance between MMP-2 expression and OS recurrence or metastasis rate.

Five published studies were finally included (Fig. 1). Our results suggested that the MMP-2 overexpression predicted the higher recurrence and metastasis rate and poorer survival of osteosarcoma patients (RR=1.90, 95%CI:1.35-2.67, P<0.01) (Fig.

2). Considering that only five studies were included, subgroup analysis was abandoned.

A sensitivity analysis was then conducted by removing individual studies sequentially to appraise our results' stability. The pooled RR was stable since the elimination of any single study had no significant influence on it. The Begg funnel plot and Egger's test results have shown that there was no obvious publication bias in the research. All the above suggested that MMP-2 could be a potential prognostic biomarker for OS.

However, there are still some shortcomings in our meta-analysis. Only 284 cases (191 positives and 93 negative cases) were

included in the study. A relatively small sample size will inevitably lead to random errors, sample bias, and a decrease in the universality of our conclusion. At present, there has been no unified critical value to delimit the positive/negative expression of MMP-2, and there might be some bias since only papers written in Chinese or English were incorporated into our research. Although there is no obvious publication bias, there may still be potential publication bias in this meta-analysis since studies with significant results are more possibly to be published. In addition, a larger sample size and more studies are needed for subgroup analysis in terms of age, gender, tumor location, and treatment methods to obtain more general and detailed conclusions.

CONCLUSIONS

In conclusion, overexpression of MMP-2 predicts higher recurrence and metastasis rates and lower disease-free survival rates. MMP-2 has the potential of a prognostic biomarker of osteosarcoma. Nevertheless, more randomized studies with more samples are necessary to obtain a more solid evaluation of the prognostic value of MMP-2 for OS patients.

Funding

This study was financially supported by the Science and Research Project of the Wuxi Municipal Health Commission (No. M202019).

Conflict of interest

None to declare.

Authors' ORCID Number

- Tianshu Gao: 0000-0002-5524-0234
- Zhenting Wang: 0000-0001-7329-1505
- Yi Liu: 0000-0003-0350-9008

Authors contribution

TG and ZW performed this study and drafted this manuscript. YL designed this study and significantly revised this manuscript. TG and ZW contributed equally to this study and should both be considered as first authors. All authors have approved the submission and publication of this manuscript.

REFERENCES

1. **Biazzo A, De Paolis M.** Multidisciplinary approach to osteosarcoma. *Acta Orthop Belg* 2016;82(4):690-698. PMID: 29182106.
2. **Corre I, Verrecchia F, Crenn V, Redini F, Trichet V.** The osteosarcoma microenvironment: a complex but targetable ecosystem. *Cells* 2020;9(4):976. doi: 10.3390/cells9040976.
3. **Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R.** Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol* 2015;33(27):3029-3035. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4895.
4. **Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, Hendifar A, Chawla S, Fedenko A, Angeles C, Menendez LR.** A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* 2012;2012:704872. doi: 10.1155/2012/704872.
5. **Jafari F, Javdansirat S, Sanaie S, Naseri A, Shamekh A, Rostamzadeh D, Dolati S.** Osteosarcoma: A comprehensive review of management and treatment strategies. *Ann Diagn Pathol* 2020;49:151654. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151654.
6. **Cui N, Hu M, Khalil RA.** Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;147:1-73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
7. **Deng W, Peng W, Wang T, Chen J, Zhu S.** Overexpression of MMPs functions as a prognostic biomarker for oral cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oral Health Prev Dent* 2019;17(6):505-514. doi: 10.3290/j.ohpd.a43636.
8. **Liu C, Li Y, Hu S, Chen Y, Gao L, Liu D, Guo H, Yang Y.** Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in endometrial cancer:

- A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(29):e10994. doi: 10.1097/MD.00000000000010994.
9. **Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, Constantin C, Neagu M.** The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019;2019:9423907. doi: 10.1155/2019/9423907.
 10. **Gong C, Sun K, Xiong HH, Sneh T, Zhang J, Zhou X, Yan P, Wang JH.** Expression of CXCR4 and MMP-2 is associated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Histol Histopathol* 2020;35(8):863-870. doi: 10.14670/HH-18-219.
 11. **Yamahana H, Komiya Y, Takino T, Endo Y, Yamada H, Asada C, Uto Y.** Structure-activity relationships of UTX-121 derivatives for the development of novel matrix metalloproteinase-2/9 inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2021;69(10):1017-1028. doi: 10.1248/cpb.c21-00549.
 12. **Gieger TL, Nettifee-Osborne J, Hallman B, Johannes C, Clarke D, Nolan MW, Williams LE.** The impact of carboplatin and toceranib phosphate on serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and metalloproteinase-9 (MMP-9) levels and survival in canine osteosarcoma. *Can J Vet Res* 2017;81(3):199-205. PMID: 28725110.
 13. **Uchibori M, Nishida Y, Nagasaka T, Yamada Y, Nakanishi K, Ishiguro N.** Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Oncol* 2006;28(1):33-42. PMID: 16327977.
 14. **Kunz P, Sähr H, Lehner B, Fischer C, Seebach E, Fellenberg J.** Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma. *BMC Cancer* 2016;16:223. doi: 10.1186/s12885-016-2266-5.
 15. **Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P.** The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. Available at: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm
 16. **Benjamin RS, Patel SR.** Pediatric and adult osteosarcoma: comparisons and contrasts in presentation and therapy. *Cancer Treat Res* 2009;152:355-363. doi: 10.1007/978-1-4419-0284-9_19.
 17. **Simpson E, Brown HL.** Understanding osteosarcomas. *JAAPA* 2018;31(8):15-19. doi: 10.1097/01.JAA.0000541477.24116.8d
 18. **Käger L, Tamamyan G, Bielack S.** Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol* 2017;13(4):357-368. doi: 10.2217/fon-2016-0261.
 19. **Henriet P, Emonard H.** Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a “hero” of the past. *Biochimie* 2019;166:223-232. doi: 10.1016/j.biochi.2019.07.019.
 20. **Fu Z, Xu S, Xu Y, Ma J, Li J, Xu P.** The expression of tumor-derived and stromal-derived matrix metalloproteinase 2 predicted prognosis of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2015;25(3):356-362. doi: 10.1097/IGC.0000000000000386.
 21. **Qian Q, Wang Q, Zhan P, Peng L, Wei SZ, Shi Y, Song Y.** The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancer Invest* 2010;28(6):661-669. doi: 10.3109/07357901003735634.
 22. **Shen W, Xi H, Wei B, Chen L.** The prognostic role of matrix metalloproteinase 2 in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140(6):1003-1009. doi: 10.1007/s00432-014-1630-6.

Contents

EDITORIAL

The Editor's dilemma in the current circumstances of scientific communication

Ryder E (*E-mail: elenaryder@gmail.com*) 139
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a00>

ORIGINAL PAPERS

Analysis of the value of dynamic computed tomography (CT) examination in the diagnosis of early lung cancer (English).

Sheng L, Wu L, Xia X, Li J (*E-mail: ljmweylxt@163.com*) 142
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a01>

Pre-stroke physical activity is related to good functional outcomes in stroke patients after endovascular thrombectomy (English).

Meng X, Ding H, Yin C, Xia W, Wu Y, Li J (*E-mail: lijicanan@ccarm.org.cn*) 151
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a02>

Laparoscopic and Seldinger techniques for the treatment of concomitant gallstones and choledocholithiasis. A retrospective study (English).

Song R, Feng L, Li X, Liu X, Yang B, Gong M, Qiao T (*E-mail: cmff75@163.com*) 165
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a03>

The sonographic features of preoperative ultrasonography of metastatic tumors of thyroid cancer confirmed by surgical pathology (English).

Ruan L, Zhang Q, Qu Q (*E-mail: quqinghongh@163.com*) 173
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a04>

Expression of MiR-20a-5p and its target gene in colon cancer and its effect on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells (English).

Tang X (*E-mail: tangxingkui@126.com*), Lin Y, Wang Y, He J, Luo X, Liang J, Zhu X. 184
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a05>

Risk factors for the prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis and their predictive values (English).

Li L, Zhang J, Yuan P, Song J, Lu Z, Zhao G (*E-mail: teprtg208177@163.com*) 196
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a06>

CASE REPORTS

COVID-19 associated mucormycosis in Venezuela: case report and literature review (Spanish).

Royero-León C, Sojo-Milano M (*E-mail: msojom1@gmail.com*), Pérez-Castro L, Barazarte-Sánchez D, Golaszewski JB, Muñoz-Gelvez R, Gómez-Daza F 206
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a07>

Intraoperative finding of Amyand's hernia: case report and literature review (Spanish).

Buitrago D, Rojas-Rivas S, González-Delatorre A, Terán-Angel G (*E-mail: uillermondi@gmail.com*) 226
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a08>

REVIEWS

Rol of the human papilloma virus in the development of cervical cancer (Spanish).

Núñez-Troconis J (*E-mail: jtnunext@gmail.com*) 233
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a9>

Matrix metalloproteinase 2 expression and disease-free survival of patients with osteosarcoma: a meta-analysis (English).

Gao T, Wang Z, Liu Y (*E-mail: liuyi@ph@nau.edu.cn*) 255
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a10>

Contenido

EDITORIAL**El dilema del Editor ante las circunstancias actuales de la comunicación científica.**

Ryder E (*Correo electrónico: elenaryder@gmail.com*) 139
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a00>

TRABAJOS ORIGINALES**Análisis del valor del escaneo dinámico realizado por tomografía computarizada (TC) en el diagnóstico de cáncer de pulmón temprano (Inglés).**

Sheng L, Wu L, Xia X, Li J (*Correo electrónico: ljmweylxt@163.com*) 142
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a01>

La actividad física previa al ictus se relaciona con un buen resultado funcional en pacientes con ictus tras una trombectomía endovascular (Inglés).

Meng X, Ding H, Yin C, Xia W, Wu Y, Li J (*Correo electrónico: lijianan@carm.org.cn*) 151
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a02>

Técnicas laparoscópica y de Seldinger para el tratamiento de cálculos biliares y coledocolitiasis concomitantes. Un estudio retrospectivo (Inglés).

Song R, Feng L, Li X, Liu X, Yang B, Gong M, Qiao T (*Correo electrónico: cmff75@163.com*) 165
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a03>

Características ecográficas de la ultrasonografía preoperatoria de tumores metastásicos de cáncer de tiroides confirmados por patología quirúrgica (Inglés).

Ruan L, Zhang Q, Qu Q (*Correo electrónico: quqinghongh@163.com*) 173
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a04>

Expresión del MiR-20a-5p y su gen objetivo en cáncer de colon y sus efectos sobre la proliferación y apoptosis de células cancerosas de colon (Inglés).

Tang X (*Correo electrónico: tangxingkui@126.com*), Lin Y, Wang Y, He J, Luo X, Liang J, Zhu X. 184
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a05>

Factores de riesgo para el pronóstico de pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada y sus valores predictivos (Inglés)

Li L, Zhang J, Yuan P, Song J, Lu Z, Zhao G (*Correo electrónico: teprt208177@163.com*) 196
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a06>

REPORTE DE CASOS**Mucormicosis asociada a la COVID-19 en Venezuela: consideraciones en torno a un caso y revisión de la literatura (Español).**

Royero-León C, Sojo-Milano M (*Correo electrónico: msojom1@gmail.com*), Pérez-Castro L, Barazarte-Sánchez D, Golaszewski JB, Muñoz-Gelvez R, Gómez-Daza F 206
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a07>

Hallazgo intraoperatorio de hernia de Amyand: reporte de caso y revisión de literatura (Español).

Buitrago D, Rojas-Rivas S, González-Delatorre A, Terán-Angel G (*Correo electrónico: uillermondi@gmail.com*) 226
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a08>

REVISIONES**Papel del virus del papiloma humano en el desarrollo del cáncer del cuello uterino (Español).**

Núñez-Troconis J (*Correo electrónico: jtnunext@gmail.com*) 233
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a9>

Expresión de la metaloproteinasas de matriz 2 y supervivencia libre de enfermedad de pacientes con osteosarcoma: un metanálisis (Inglés).

Gao T, Wang Z, Liu Y (*Correo electrónico: liuyixeph@nau.edu.cn*) 255
<https://doi.org/10.54817/IC.v64n2a10>