



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
SECCIÓN DE POSGRADO

UTILIDAD DEL p16 Y Ki67 EN EL MANEJO DEL NIC2 CENTRO  
MÉDICO ONCOMUJER 2013 – 2015

PRESENTADA POR  
MANUEL JESÚS ROSADO FLORES

TESIS PARA OPTAR GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA CON  
MENCIÓN EN CIRUGÍA GENERAL Y ONCOLÓGICA

LIMA – PERÚ

2016



**Reconocimiento  
CC BY**

El autor permite a otros distribuir, mezclar, ajustar y construir a partir de esta obra, incluso con fines comerciales, siempre que sea reconocida la autoría de la creación original.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**USMP**  
UNIVERSIDAD DE  
SAN MARTÍN DE PORRES

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
SECCIÓN DE POSGRADO

**UTILIDAD DEL p16 Y Ki67 EN EL MANEJO DEL NIC2 CENTRO  
MÉDICO ONCOMUJER 2013-2015**

**TESIS**

**PARA OPTAR GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA CON MENCIÓN EN  
CIRUGÍA GENERAL Y ONCOLÓGICA**

**PRESENTADA POR  
MANUEL JESÚS ROSADO FLORES**

**LIMA – PERÚ**

**2016**

## **Asesor**

Pedro Javier Navarrete Mejia. Doctor en salud pública. Centro de investigación de salud pública. Instituto de investigación. Facultad de medicina humana. Universidad de San Martín de Porres

## **Jurado**

### **Presidente**

Juan Carlos Velasco Guerrero Doctor en salud publica

### **Miembro**

Zoel Anibal Huatuco Collante Maestro en políticas y planificación en salud

### **Miembro**

Manuel Jesus Laoyza Alarico Maestro en salud publica

Dedicado a mi familia por darme la fuerza y la motivación para superar cada día en mis logros profesionales.

A mi querida esposa Norma Pasquel y a mis hijos por haberme apoyado en todo momento.



## ÍNDICE

	Págs.
Asesor y jurado	ii
Dedicatoria	iii
Resumen	v
Abstract	vi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
I.1 Antecedentes de la investigación	4
I.2 Bases teóricas	21
I.3 Definición de términos	41
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	42
II.1 Tipo y diseño de investigación	42
II.2 Diseño muestral	42
II.3 Características del lugar o institución donde se realizó la investigación	42
II.4 Método de recolección de datos. Instrumentos	42
II.5 Procesamiento de datos	42
II.6 Aspectos éticos	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS	44
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	48
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
V.1 Conclusiones	50
V.2 Recomendaciones	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	
Anexo 1	
Ficha de recolección de datos	

## Resumen

**Introducción:** Los marcadores p16 y Ki 67 son útiles para determinar la evolución de la neoplasia intraepitelial cervical grado 2 ó NIC 2. La detección de estos biomarcadores permite diferenciar entre la infección autolimitada por el virus del papiloma humano (VPH) y la transformación celular inducida por células oncogénicas del VPH, sin embargo es importante aportar evidencias de su capacidad predictiva. **Metodología:** Se realizó un estudio cuantitativo, observacional, descriptivo, retrospectivo de corte transversal en 54 biopsias con diagnóstico histológico de NIC 2 del Centro Médico Oncomujer durante los años 2012 al 2015. Se utilizó el software SPSS23.0 y Microsoft Excel 2010. **Resultados:** La frecuencia del biomarcador p16 en pacientes con NIC2 fue del 61,1% y del Ki67 fue de un 59% con un  $p < 0,05$  y la positividad para ambos biomarcadores fue de 61,1% con un  $p > 0,05$ . **Discusión:** La asociación de las tinciones para los biomarcadores P16 y Ki67 mejoran la disquisición diagnóstica y permiten una mejor interpretación del riesgo de progresión según la literatura revisada en conformidad con el estudio. La positividad de ambas pruebas demostró un riesgo de progresión soportando la necesidad de manejo quirúrgico.

## PALABRAS CLAVE

p16, Ki67, neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (NIC-II)

## Abstract

**Introduction:** The markers p16 and Ki 67 som useful in determining the evolution of intreccervical neoplasia grade 2 or CIN 2. Deteccion of these biomarkers to differentiate between self-limited by the human papillomavirus (HPV) infection and cell transformation induced oncogénicas HPV cells, however it is important to provide evidence of its predictive ability. **Methodology:** A quantitative, observational, descriptive, retrospective cross-sectional study was conducted in 54 biopsies with histological diagnosis of CIN 2 Oncomujer Medical Center during the years 2012 to 2015. The SPSS23.0 software and Microsoft Excel 2010 was used. **Results:** The frequency of p16 biomarker in patients with CIN2 was 61.1% and Ki67 was 59% with  $p < 0.05$  for both biomarkers positivity was 61.1% with  $p > 0.05$ . **Discussion:** The association of staining for Ki67 and P16 disquision biomarkers improve diagnoses and enable better interpretation of the risk of progression as revised in accordance with the study literature. The positivity of both tests demonstrated a risk of progression supporting the need for surgical management.

### KEYWORDS

p16, Ki67, cervical intraepithelial high-grade neoplasia (CIN-II)



## INTRODUCCIÓN

El Cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres y el séptimo en frecuencia en ambos sexos, se calculó para el año 2012, 528,000 nuevos casos de los cuales el 85% se presentan en países en vías de desarrollo. Para el mismo año se calculó 266,000 muertes por esta enfermedad y el 87% de estas en países pobres<sup>1</sup>. Estas diferencias regionales en las tasas de incidencia y mortalidad se deben a los distintos factores de riesgo (infección), programas de detección y disponibilidad de tratamiento. Una sustancial parte de estas muertes se pueden evitar con adecuadas medidas de prevención y programas de detección precoz.<sup>2</sup>

En nuestro país según el registro de cáncer de Lima Metropolitana publicado el 2014, el cáncer de cuello uterino ocupa el quinto lugar de todos los cánceres y es el segundo más frecuente en las mujeres, con 1656 casos nuevos entre los años 2004 y 2005, con una tasa de incidencia de 19.2/100,000 mujeres, lo cual representa una de las incidencias más altas en el mundo. Esta enfermedad es la que refleja con mayor realismo la desigualdad social en salud.<sup>3</sup>

Gran parte del éxito en la lucha contra el cáncer de cuello uterino radica en el tratamiento de las lesiones premalignas, según las directrices de la OPS/OMS sobre tamizaje y tratamiento de las lesiones precancerosas para la prevención del cáncer cervicouterino las pacientes con diagnóstico de NIC 2 deben ser tratadas<sup>4</sup> así como la norma técnica oncológica para la prevención, detección y manejo de las lesiones premalignas del cuello uterino a nivel nacional indica tratamiento con crioterapia, escisión electro quirúrgica (cono Leep) o histerectomía ampliada a vagina dependiendo de factores asociados a edad, deseo de fertilidad y factores anatómicos de la paciente<sup>5</sup>, todos estos procedimientos con una determinada tasa de complicaciones y gasto de recursos.

Actualmente la sociedad americana de colposcopia y patología cervical junto con el colegio americano de patología ha publicado las bases y consenso para adoptar una nueva terminología estandarizada para las lesiones ano genitales relacionadas al PVH(virus del papiloma humano), en la cual las lesiones

intermedias como el NIC 2 se dividen dicotómicamente y algunas pasan a LBG(lesión de bajo grado) las cuales se comportan como una infección aguda por PVH (NIC 1) es decir que no requieren tratamiento inmediato y otra pasan a LAG(lesión de alto grado) y se comportan como NIC 3 y si requieren tratamiento, esto se basa en que si bien es cierto la lesión NIC 2 no se puede catalogar como NIC 1 y/o NIC 3 con la coloración de hematoxilina hioscina existen biomarcadores que nos permiten diferenciar las lesiones que van a progresar a cáncer y las que probablemente se auto limiten como es el caso de la proteína humana p16 que es codificada por el gen supresor CDKN2A (MTS1, INK4A) localizado en el cromosoma 9p21 que actúa inhibiendo las quinasas dependientes de las ciclinas (cdk), así desacelera el ciclo de replicación celular inactivando los complejos cdk4 y cdk6 ciclina D, los cuales regulan el punto de control de la Fase G1 del ciclo de replicación celular mediante la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb) la que libera el factor de transcripción E2F y permite que la célula entre en la fase S.

En los cánceres de cuello uterino existe una fuerte sobreexpresión del p16 y es fácilmente detectable por inmunohistoquímica y nos permite identificar las células con cambio displásico o maligno inducido por el PVH. El Ki67 es un antígeno que nos permite encontrar las células que se encuentran en proliferación y es expresado en todas las fases del ciclo de replicación celular.<sup>6, 7</sup> La expresión en una célula de ambos antígenos nos va a permitir diferenciar las lesiones intermedias.

El objetivo principal de este estudio fue: determinar la utilidad de los marcadores de inmunohistoquímica p16 y Ki67 en el manejo del NIC 2 y además determinar las características sociodemográficas de las pacientes con NIC 2. Para ello se realizó pruebas de inmunohistoquímica para p16 y Ki67 simultáneamente a 54 muestras de Biopsia diagnosticadas como NIC2, con una técnica que nos permitió realizar tinciones de inmunohistoquímica a varias muestras en una sola lamina abaratando costos y tiempo, el cual nos permitió separar las lesiones NIC 2 en dos grupos y así determinar cuántas deben ser tratadas y cuántas observadas.

Actualmente en nuestro país y en el mundo las lesiones cervicales premalignas diagnosticadas como NIC 2 son todas sometidas a tratamiento quirúrgico, como lo demuestran las normas y protocolos vigentes en nuestro país<sup>5</sup> y las directrices de la OMS/OPS.<sup>4</sup> Con este estudio se determinó que porcentaje de biopsias tienen positividad para uno o ambos marcadores lo que nos va a permitir diferenciar las pacientes que se van a comportar como Lesión de Bajo Grado(LBG) y las que progresaran a NIC 3, así se podrá cambiar la conducta terapéutica en estos casos, tratando solo a las que tienen la mayor probabilidad de progresión y observando al otro grupo, evitando un gasto innecesario de recursos humanos , técnicos y potenciales complicaciones en los pacientes.



## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### I.1 Antecedentes de la investigación

En un estudio del año 2006 acerca de la expresión del marcador de inmunohistoquímica p16 en el epitelio del tracto genital femenino y su valor en el diagnóstico se vio que el p16 que es una quinasa 4 dependiente de ciclina que se expresa en un pequeño número de tejidos neoplásicos y no neoplásicos y se ha venido utilizando como ayuda diagnóstica en diferentes patologías ginecológicas. Su expresión en forma difusa en el cuello uterino puede ser considerada como un equivalente a la presencia de Papiloma Virus (PVH) de alto riesgo y es útil para identificar la mayoría de lesiones de alto grado y algunas de bajo grado, también sirve para distinguir lesiones benignas de lesiones neoplásicas. También es útil como parte de un grupo de marcadores para distinguir entre carcinoma endometrial y endocervical. En vulva se utiliza para distinguir entre lesiones neoplásicas asociadas a PVH y las no asociadas a este virus. Así como también se utiliza para estudio de lesiones de metástasis, de primarios de cuello uterino, algunos sarcomas de útero y para distinguir tumores metastásicos a ovario.<sup>8</sup>

En el año 2012 se convocó un proceso de consenso para estandarizar la terminología empleada en las lesiones del tracto ano genital producidas por el Virus del Papiloma Humano (PVH) se llamo el proyecto LAST (Proyecto de Normalización para Lesiones Asociadas al PVH) y fue patrocinado por El Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical. Se constituyeron 5 grupos de trabajo, 3 de ellos se dedicaron a realizar revisión bibliográfica otro grupo se dedicó a revisar los antecedentes históricos y el ultimo a redactar las recomendaciones finales. Se aprobaron las recomendaciones para la estandarización de terminología utilizada para nombrar a las lesiones asociadas al papiloma en el tracto anogenital y se detalló cuidadosamente la utilización adecuada de biomarcadores específicos (entre ellos el p16 y Ki67) para mejorar diagnósticos y aclarar situaciones controversiales. Por último se elaboró un plan para la difusión de estas recomendaciones en la comunidad médica.<sup>9</sup>

En el año 2012 se realizó un estudio para determinar el rendimiento de la prueba del p16 en la citología de 578 muestras de lesiones intraepiteliales, 213 PVH de alto riesgo con ASCUS, 186 PVH de alto riesgo con LBG, 74 LAG, 56 eran NIC2 y 49 NIC3, el objetivo fue evaluar el desempeño del p16 en un programa de detección de cáncer de cuello uterino incluyendo lesiones de ASCUS, LAG y LBG, tratando de determinar si la realización rutinaria de esta prueba mejoraría la especificidad y el Valor predictivo positivo en las LAG. La sensibilidad del p16 fue 91% para NIC2 y 100% para NIC3, con una especificidad de 64 y 58% para cada uno de ellos, el valor predictivo negativo fue 96 y 100% y el valor predictivo positivo fue 39%. En el seguimiento posterior se observó 8 casos histológicamente negativos en la primera biopsia resultaron luego en 4 con NIC2 y 4 con NIC3. Por todos estos hallazgos se concluyó que la especificidad y sensibilidad del p16 confirman su gran utilidad en diagnóstico de lesiones de bajo grado y en lesiones de alto grado sobre todo en casos de discordancia citohistológica.<sup>10</sup>

En un estudio realizado en Tokio en varios centros médicos cuyo objetivo fue tratar de obtener información acerca de la eficacia del p16 como biomarcador para predecir los resultados del NIC, se realizó pruebas de inmunohistoquímica a pacientes con NIC entre 2000 y 2009, de forma retrospectiva se realizaron pruebas de PVH y se correlacionaron entre sí los resultados de las biopsias, del PVH y del p16. Se obtuvo como resultado que de un total de 244 pacientes de los cuales 82 con NIC 1, 60 con NIC 2 y 102 con NIC 3 el p16 fue positivo para 20.7% de NIC 1, 80% para NIC 2 y 89.2% para NIC 3, y en los grupos de NIC 1 y 2 la tasa de progresión fue significativamente mayor para los p16 positivos y la tasa de regresión fue significativamente menor para los pacientes p16 positivos. Las tasas de progresión y regresión no fueron significativamente diferentes en los grupos de alto riesgo PVH positivos y negativos. Por lo que se concluyó que la sobreexpresión de p16 en NIC 1 y NIC 2 es un biomarcador superior al test del genotipo de PVH.<sup>11</sup>

En un trabajo de investigación realizado en Corea, donde se realizó tinción de inmunohistoquímica para p16, Ki67 y proteína de cápsida L1 en muestras

obtenidas de citología de base líquida en de pacientes con LAG( lesión sospechosa de lesión de bajo grado y ASCUS, bajo la premisa de que las células escamosas atípicas no pueden excluir lesión de alto grado y con el objetivo de tratar de identificar que pruebas podrían predecir lesiones de forma objetiva y reproducible para evitar seguimientos innecesarios a las pacientes. También se realizó la tipificación de PVH a las 56 pacientes las que se sometieron a confirmación por biopsia o seguimiento con citología se obtuvo que la positividad para p16 y Ki 67 se asoció fuertemente con NIC 2 y NIC 3. La especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para predecir el seguimiento del NIC 2 fueron 51.4%, 76.2%, 48.5% y 78.3% respectivamente, en la tinción de inmunohistoquímica de p16 y Ki67. De este estudio se concluyó que el p16, Ki67 y proteína de la cápsida L1, son biomarcadores muy útiles para predecir NIC 2 y también son suficientes para predecir NIC 3.<sup>12</sup>

En Italia se llevó a cabo un estudio en el cual se correlaciona la tipificación del PVH con prueba de ADN y tinción de inmunohistoquímica para p16 y Ki67 así se estudió la potencial utilidad de p16 y Ki67 en muestras histológicas la concordancia que alcanzó la prueba de ADN con la inmunohistoquímica fue del 89%, con lo que se concluye que el estudio de p16 y Ki67 tendría un alto valor diagnóstico en lesiones neoplásicas del cuello uterino.<sup>13</sup>

En el año 2013 en USA se llevó a cabo un estudio donde se evaluó la detección de lesiones precancerosas del cuello uterino con p16 y Ki67. Partiendo de la base que el PAP es una prueba poco sensible pero muy específica para la detección de NIC 2, se evaluó la posibilidad de que la combinación de p16 y Ki67 serían indicadores de progresión de las lesiones por PVH con una alta sensibilidad y especificidad para NIC 2, y comparar los resultados con los del PAP. En un total de 27,349 mujeres de 18 o más años en Europa se enrolaron en un programa prospectivo de detección de cáncer de cuello uterino, se les realizó Pap, PVH, p16 y Ki67 a todas, a los resultados de PVH positivos en mayores de 30 años se les realizó colposcopia y la histología de NIC 2 se usó como referencia. Los resultados de la citología con p16 y Ki67 eran comparables a la prevalencia de PAP anormal, en todas las mujeres la citología con p16/Ki67 fue más sensible que la tinción de Papanicolaou para la detección de NIC 2 y 1, las especificidades

fueron comparables. La prueba del PVH en mujeres de 30 o más años fue más sensible pero menos específica que el p16/Ki67. Se concluyó que la prueba de doble manchado con p16/Ki67 tiene sensibilidad superior con especificidad no inferior sobre la citología con PAP en la detección del NIC 2, y se podría recomendar el doble manchado en programas de tamizaje sobre todo en mujeres jóvenes donde el PVH tiene sus limitaciones.<sup>14</sup>

En el año 2013 se realizó un estudio en el Departamento de patología del Hospital Universitario de Seoul National para determinar la utilidad de la sobreexpresión del p16 y el ADN de PVH en el diagnóstico diferencial de la extensión del carcinoma epidermoide de cuello uterino. Partiendo de la base que el carcinoma epidermoide primario del tracto genital superior es muy raro, debe ser distinguido de la extensión del carcinoma epidermoide de cuello uterino para una adecuada estadificación del tumor, pero muchos pacientes con carcinoma epidermoide primario de trompas u ovario han sido previamente hysterectomizados por lo tanto es difícil determinar el sitio del tumor primario. Se compararon los resultados de patología con la expresión del p16 y el PVH en 4 pacientes con Ca epidermoide del tracto genital superior y 5 con Ca epidermoide de cuello uterino con extensión a la mucosa del tracto genital superior, en los 5 pacientes con carcinoma epidermoide de cuello uterino tuvieron una fuerte expresión del p16 y los 4 con carcinoma epidermoide del tracto genital superior fueron negativos. Tres de los 5 pacientes con carcinoma epidermoide de cuello uterino fueron positivos para PVH 16 y los 4 de carcinoma epidermoide primario de tracto genital superior fueron negativos para ADN de PVH. Se concluyó de este estudio que a la no expresión de p16 y ADN de PVH son importantes para la determinación de primarios del tracto genital superior.<sup>15</sup>

En un estudio realizado en Bucarest cuyo objetivo fue evaluar la hipótesis de que la inmunohistoquímica con p16 es más efectiva que la tipificación de PVH para detectar lesiones de alto grado en el diagnóstico histopatológico de pacientes con citologías anormales de ASCUS o LBG, fue un estudio retrospectivo de 63 casos, 22 con ASCUS y 41 con LBG utilizando CPIU p16 y Linear Array PVH, todos los casos se siguieron con colposcopia y biopsia, la sensibilidad y especificidad del p16 y PVH se analizaron con la prueba Chi cuadrado y se encontró que las

citologías LBG eran más probables p16 positivo que los de ASCUS, en mujeres con LBG la sensibilidad de p16 fue 37.5% superior a la de las mujeres con PVH de alto riesgo, mientras que en ASCUS fue 44.5% mayor. En ASCUS el p16 tiene una especificidad más alta (84.62%) que el PVH (53.85%); para las citologías de LBG esta diferencia es menor. Como conclusiones se obtuvo que el p16 es significativamente más sensible que el PVH para detectar lesiones precursoras sobre todo en pacientes con citología de ASCUS. Las citologías que resultan LBG deben tener biopsia y colposcopia, el p16 aumenta la precisión del diagnóstico en mujeres con LBG.<sup>16</sup>

En el Departamento de Patología del Hospital de Shanghai en el año 2013 se estudió el valor patológico de la detección del PVH, p16 y p53 en el NIC, el objetivo fue evaluar la infección por PVH, la sobreexpresión del p16 y p53 y determinar su papel en el diagnóstico y clasificación del NIC, se utilizó inmunohistoquímica para evaluar la sobreexpresión de p16 y p53 y reacción en cadena de la polimerasa para evaluar la presencia de ADN de PVH. En ciento cuatro casos, se encontró PVH18/16 en 49% y ADN de PVH6/11 en 9.6%. En doscientos tres casos el 74.4% expresó positividad a p16 y 47,3% a p53. La sobreexpresión de p16 presentó una tasa significativamente mayor en el grupo de NIC 1 que en el de metaplasia escamosa e hiperplasia y el grupo de NIC 2-. Hubo una marcada correlación entre el patrón de tinción de una banda del p16 y la infección por PVH16/18. Por otro lado la expresión de p53 no se correlaciona significativamente con el grado de NIC o Infección por PVH16/18. Estos resultados indican que la expresión del p16 se correlaciona con mayor grado de NIC y puede utilizarse como un biomarcador de diagnóstico para diferenciar entre NIC 1 y metaplasia escamosa y también entre NIC 2 Y NIC 1/3.<sup>17</sup>

En Malasia en el año 2014 se realizó un estudio de la expresión del p16 en lesiones del cuello uterino producidas por papiloma de alto riesgo, siendo el cáncer de cuello uterino una de las más frecuentes a nivel mundial y el PVH el principal factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad además las pruebas de diagnóstico y despistaje actuales tienen ciertas limitaciones para identificar las diversas lesiones del cuello uterino, este estudio propone evaluar la utilidad del p16 para mejorar el diagnóstico de lesiones producidas por el papiloma de alto



riesgo en el cuello uterino. En un total de 75 muestras se seleccionaron en tres grupos de 25 cada uno en NIC, CIS y Cervicitis crónica. La expresión de inmunohistoquímica para el grupo de cervicitis fue 0%, para los pacientes con NIC fue 72% y para los pacientes con CIS 100% por lo cual se concluyó que la expresión del p16 fue muy fuerte en el cáncer del cuello uterino y mínima en cervicitis por lo que la inmunohistoquímica p16 puede ayudar en el diagnóstico de los diferentes tipos de lesiones cervicales.<sup>18</sup>

Un estudio realizado en Ámsterdam a pacientes con citología para ASCUS y LBG con p16 y Ki67, tuvo como base del estudio a las pacientes con citología de ASCUS y LBG actualmente se repite la prueba a los 6 y 18 meses el objetivo de este estudio, fue analizar el desempeño en forma trasversal y longitudinal del doble manchado con p16 y Ki67 en la citología para detección de NIC grado 3 o más y NIC 2 en mujeres con citología dudosa ligeramente discariótica. En 256 mujeres con citología dudosa ligeramente discariótica se realizó inmunohistoquímica con p16 y Ki67 de forma retrospectiva y se comparó con los resultados de PVH y los resultados de seguimiento a largo plazo. En p16 y Ki67 la citología del doble manchado comprobó una sensibilidad del 100%, especificidad del 64,4% y un valor predictivo negativo de 100% para NIC 3. Las pruebas del PVH mostraron sensibilidad similar (96,3%) y valor predictivo negativo (99,1%) y una especificidad menor (57,6%) para NIC 3. La sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo para NIC 2 de la citología doblemente manchada fueron 89,7%, 73,1% y 95,1%, correspondientemente fue similar a lo comparado con la prueba de PVH. La citología doblemente manchada demostró una relevante menor tasa de referencia de la muestra del PVH (43,6% y 49,1%). Mientras el seguimiento de largo plazo, sin lesiones de NIC 3 desarrollados en PVH positivo en mujeres negativas doblemente manchada.<sup>19</sup>

En un estudio realizado en Austria sobre la proliferación de células de cáncer al cuello uterino se determinó que las infecciones por el papiloma virus de alto riesgo contribuyen con el cáncer al cuello uterino y el p16 y el CDK regulan el crecimiento de estas células por razones no muy bien comprendidas. En este artículo se presenta la regulación negativa de la expresión del gen p16 en 3 diferentes líneas celulares de cáncer al cuello uterino, en las cuales se reduce la

expresión del oncogén E7 lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación positiva entre el E7 y p16 cuyo agotamiento indujo la senescencia celular.<sup>20</sup>

En un metanálisis publicado en el año 2015 en el Current de ginecología acerca del camino por delante en la prevención y control del cáncer al cuello uterino hacen notar que desde comienzos de los años 50 el despistaje con PAP (Papanicolaou) ha reducido de una forma sustancial la mortalidad por cáncer de cuello uterino en los países del primer mundo, en la actualidad las campañas de vacunación contra el PVH de alto riesgo son las estrategias que prometen reducir la prevalencia a nivel mundial de cáncer de cuello uterino y lesiones pre malignas, sin embargo a raíz de la disminución de los índices de presentación de lesiones pre cancerosas, la persistencia en la utilización de la citología como método primario de detección puede volverse menos efectiva, esto daría a lugar a un aumento innecesario de referencias.

Por suerte las pruebas de ADN del PVH se han transformado de un candidato adecuado para reemplazar a la citología por ser una prueba menos específica pero más sensible en la detección de lesiones de alto grado y por ser menos propensa a error humano, también servirían estas pruebas de PVH para evaluar la eficacia de la vacunación. La citología podría utilizarse como una prueba de clasificación ya que la mayoría de frotis de pacientes PVH positivos obtendrían alteraciones de cierto grado de importancia. La prueba de PVH seguida de genotipificación se recomienda para el cribaje en países desarrollados. Otros biomarcadores podrían ayudar en la detección y clasificación de las lesiones neoplásicas del cuello uterino como son: PVH E6/E7, pruebas de ARN mensajero, metilación de genes virales y la inmunohistoquímica p16 tomando en cuenta los rápidos avances tecnológicos la anunciada llegada de la vacuna nonavalente para PVH (actualmente en ensayos de fase III), los estudios en este campo cada vez se vuelven más dificultosos.<sup>21</sup>

En un metanálisis realizado en Grecia acerca de cómo mejorar la detección de las neoplasias intraepiteliales cervicales sobre la base de las técnicas de biología molecular que actualmente proporciona información relacionada con el virus que causa el cáncer de cuello uterino, incluyendo tipificación de PVH con matiz

microscópico de ADN, técnicas de RNA mensajero, identificación de los oncogenes E6/E7 por citometría de flujo y la sobreexpresión del p16 por inmunohistoquímica. Estas técnicas combinan diferentes sensibilidades y especificidades, por lo que un enfoque combinado podría producir mejores resultados, en este artículo se propone combinar de manera inteligente estas técnicas para lograr un diagnóstico más preciso. Se evaluó esta técnica en 340 pacientes a los cuales se les realizó evaluación con PAP (citología), pruebas moleculares y colposcopia. Se encontró una sensibilidad del 89.4%, una especificidad de 97.1%, valor predictivo positivo de 89.4% y valor predictivo negativo de 97.1% en la detección de NIC2 o más, con lo que se concluyó que las combinaciones de estas pruebas produce mejores resultados en términos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, con lo cual se disminuye la tasa de referencia para colposcopia y para intervenciones terapéuticas.<sup>22</sup>

En un estudio realizado en Canadá en el cual se evalúa la correlación entre el p16, el subtipo específico del PVH y la progresión de lesiones de bajo grado (NIC1) en el cual se evaluó la eficacia del p16 y la tipificación del PVH como marcador pronóstico del NIC 1. En 64 muestras de cérvix con diagnóstico patológico de NIC 1 se realizó la tinción con p16 y la tipificación del PVH por PCR. De las 34 muestras p16 negativas, 26 retrocedieron, 7 persistieron y una progresó, de las 20 p16 difusamente positivas. 7 regresaron, 8 persistieron y 5 progresaron. De las 10 muestras de biopsia con manchado positivo en el 1/3 inferior de la muestra 7 regresaron y 3 persistieron. La tinción difusa de p16 en NIC1 se asoció solo con PVH de alto riesgo excepto con una muestra de biopsia PVH negativo. 3 cepas de PVH de alto riesgo y 1 cepa de bajo riesgo (PVH66) fueron identificadas en los 6 NIC1 que progresaron. Como conclusión se determinó que existe una relación significativa entre la tinción negativa al p16 o positividad del tercio inferior con la rara progresión del NIC1.<sup>23</sup>

En un estudio realizado en el sur de Brasil sobre la expresión del p16 y Ki67 en pacientes infectadas con papiloma virus con cuello uterino normal, displásico y neoplásico, partiendo del precepto que la proteína del ciclo celular p16 y el antígeno nuclear de proliferación celular Ki67, se utilizan como marcadores celulares de oncogenicidad. Las oncoproteínas E6 y E7 al interactuar con los

genes supresores p53 y GRb, sobre expresando el p16. El objeto de este estudio fue tipificar la presencia del ADN viral en 174 biopsias de cérvix y correlacionar los diferentes grados histológicos con las expresiones del p16 y Ki67, en un diseño de tipo trasversal en pacientes que se realizaron biopsia entre febrero del 2003 y diciembre del 2006 en el sur de Brasil, se determinó la presencia del ADN de PVH en frotis cervicales usando la PCR y se realizó inmunohistoquímica en las muestras de biopsia para evaluar la expresión de p16 y Ki67. El 89% de los pacientes presento DNA viral de los cuales 52% fueron de PVH de alto riesgo (16, 18, 31). La expresión del p16 se observó en 69% de los casos y en 100% de las lesiones de alto grado y de pacientes con PVH de alto riesgo, siendo más fuerte la expresión en las lesiones de mayor grado. El Ki67 y p16 se expresaron juntos en el 86% de las muestras y fueron 100% positivos en las muestras con PVH de alto riesgo. Estos resultados sugieren una asociación entre la presencia del PVH de alto riesgo y la expresión del p16 y Ki67, la cual es más fuerte en mujeres con lesiones de alto grado.<sup>24</sup>

En un estudio prospectivo realizado en China acerca de la tinción de inmunohistoquímica p16 y el valor predictivo para la progresión del NIC1. Debido al que el p16 se sobre expresa en tejido con diagnóstico de NIC y cáncer de mujeres infectadas con papiloma se han realizado pocos estudios prospectivos para evaluar al p16 como un marcador de riesgo de progresión de NIC1. Se investigó la prevalencia del p16 en las biopsias de NIC1 y si predice el riesgo de desarrollar lesión mayor en 6557 mujeres entre 30 y 49 años durante los años 2003 al 2005 utilizando pruebas de citología y PVH, se utilizó colposcopia en mujeres con resultados anormal y la inmunohistoquímica a todas las biopsias con NIC1 o más, las mujeres NIC1 fueron seguidas sin tratamiento y la prevalencia del p16 fue 2.7, 42.7, 75.5, 79.6 y 100% para las pacientes con biopsia negativa, NIC1, NIC2, NIC3 y cáncer respectivamente. La positividad del PVH estaba asociada fuertemente al p16 y se asoció la positividad del p16 en biopsias NIC1 con un mayor riesgo de desarrollar lesión mayor en 2 años de seguimiento.<sup>25</sup>

En un metanálisis realizado en el año 2014 sobre inmunohistoquímica p16 y la concordancia de las biopsias de cérvix entre diferentes observadores, sobre la base que la evaluación morfológica es subjetiva y hay una baja concordancia, la

inmunohistoquímica con p16 puede mejorar la interpretación de las biopsias. Se realizó una evaluación sistemática de bibliografía acerca de la concordancia de los patólogos utilizando el p16 en biopsias con diagnóstico de NIC 1 y NIC2. Se encontraron 5 artículos en los cuales había concordancia en la interpretación de resultados con p16 positivo o negativo y significativamente mayor para NIC 2, también hubo una mejor concordancia en NIC3 con el uso de p16 pero no hubo una significación estadística importante. Como conclusión se evidenció una mejor concordancia en más lesiones NIC 2 usando p16.<sup>26</sup>

En un estudio realizado en el año 2015 sobre si la expresión del p16 y Ki67 mejorarían la precisión del diagnóstico en lesiones cervicales pero no la infección persistente por PVH de alto riesgo en NIC1, se trazó como objetivo determinar la asociación entre la expresión de p16 y Ki67 y las lesiones cervicales, para determinar qué papel podrían desempeñar el p16 y Ki67 como marcadores pronósticos en pacientes con infección persistente por PVH de alto riesgo. En un total de 1154 casos de biopsias cervicales 331 negativos, 462 con NIC1, 176 con NIC2, 163 con NIC3 y 22 con carcinoma epidermoide, además 283 mujeres con NIC1 fueron captadas en 1 año de seguimiento, se utilizó la técnica de PCR para detectar PVH de alto riesgo en intervalo de 6 meses durante 1 año, 40 mujeres tuvieron infección persistente por PVH de alto riesgo, 182 tuvieron infección transitoria y 61 no tuvieron PVH de alto riesgo. La expresión de p16 y Ki67 se evaluó por inmunohistoquímica en 4 categorías negativo, 1+, 2+, 3+. No se encontró un aumento significativo en la expresión de p16 y Ki67 en pacientes con biopsia negativa, la expresión de Ki67 pero no de p16 aumentó significativamente de NIC2 y NIC3. La positividad de p16 no se correlacionó con la infección persistente por PVH de alto riesgo. Se concluyó que el p16 y Ki67 pueden mejorar la precisión del diagnóstico en lesiones de cuello uterino pero no pueden predecir la infección persistente por PVH de alto riesgo en NIC1.<sup>27</sup>

Se piensa que la gran mayoría del carcinoma epidermoide en el cérvix se encuentran asociados a la lesión por VPH de alto riesgo, sin embargo una parte del grupo de lesiones de alto grado son PVH negativo. El hecho de que la positividad del PVH pueda influir en el diagnóstico del patólogo de las lesiones cervicales el p16 se ha aplicado ampliamente para facilitar un diagnóstico preciso

sobre todo en lesiones de alto grado (NIC 2, NIC 3). Para evaluar si la tinción con p16 es útil en el diagnóstico de lesiones de alto grado en mujeres PVH negativo se estudió un grupo de 46 mujeres con diagnósticos patológicos de NIC 2 y NIC 3 todas con PVH negativo al menos una prueba dentro de los 6 meses de la biopsia inicial. Los conoleep durante los 6 meses de la biopsia inicial fueron revisados y documentados. La tinción de inmunohistoquímica para p16 se realizó en todas las biopsias iniciales. Algunas piezas operatorias de cono leep sin evidencia de lesiones de alto grado con hematoxilina-eosina y con tinción para p16 se diagnosticó negativa, focal/irregular o difusa. Las edades de las 46 mujeres fluctuaban entre los 17 y 58 años con una media de 35 años, 44 tenían citología normal, 42 tenían conoleep dentro de los primeros 6 meses de la biopsia en cuyas piezas operatorias se demostró que en 32 casos (76.2%) tenían lesión de alto grado, 22 casos con NIC 2 y 10 casos con NIC 3, 6 casos con NIC 1 y 4 casos biopsia negativa, la inmunohistoquímica de p16 en pacientes con lesión de alto grado mostro el 66.7% patrón de tinción difusa el 16.7% tenían patrón focal/irregular y el 16.7% eran p16 negativo. En el seguimiento del conoleep los 28 casos con patrón de tinción difusa tuvieron lesión de alto grado, los 7 casos con tinción negativa no tenían displasia de alto grado. El patrón de inmunohistoquímica con tinción difusa del p16 correlaciona con 100% con lesiones NIC 2 y NIC 3 en las biopsias iniciales y en los conos por lo tanto el valor predictivo y negativo de la inmunoreactividad del p16 para predecir NIC 2 y NIC 3 es casi 100% por lo que una mujer con PVH negativo y p16 negativo es muy difícil que pueda tener una lesión de alto grado y hay que tener mucho cuidado con procedimientos Leep innecesarios.<sup>28</sup>

Un estudio realizado en China sobre la historia natural del NIC 1 y la importancia clínica de la proteína p16 como un marcador de la progresión de este, estudió los factores biológicos asociados a la progresión del NIC 1 y analizó el valor predictivo de la proteína p16 como marcador de progresión. Entre Agosto del 2010 a Julio del 2013 se captaron 104 pacientes con PVH positivos con resultados de citología normal, LBG y LAG, con la finalidad de analizar los factores relacionados con la progresión del NIC 1 incluyendo edad de la paciente, resultado del PAP, tipificación de PVH, Proteína de la cápsida del PVH L1 y p16. Estos cinco factores de analizaron con regresión logística binaria y se obtuvo

que en el primer año de seguimiento de los 104 casos: 15 casos negativos, 78 ASCUS, 11 LBG. De 52 casos con PAP negativo y con PVH de alto riesgo negativos, 30 fueron negativos, 10 fueron NIC 1, 5 fueron NIC 2 y 7 fueron NIC 3. De los 104 casos, luego de 1 año 82 retrocedieron, 10 persistieron y 12 progresaron de los 5 progresaron a NIC 2 y 7 progresaron a NIC 3, ninguno progreso a Cáncer. Se realizó inmunohistoquímica con tinción para p16 y el análisis univariado demostró que la edad de la paciente, el PVH, la proteína L1 y el PAP antes de la colposcopia no se asociaron a riesgo de progresión, mientras que el análisis multivariado demostró que el p16 se asocia con un riesgo mayor de progresión del NIC 1. Se concluyó que la inmunotinción con p16 es un factor de riesgo de progresión del NIC 1.<sup>29</sup>

En un meta análisis realizado por un grupo expertos de Alemania, Italia, Francia, Bélgica y USA sobre el impacto de la utilización de la inmunohistoquímica del p16 en citología y biopsias, partiendo sobre la premisa de que la detección de lesiones neoplásicas del cuello uterino viene siendo obstaculizada por la baja sensibilidad de la citología y la baja especificidad de la prueba del PVH, estas deficiencias pueden conducir a tratamiento y referencias innecesarias. La identificación del p16 como un marcador de la transformación neoplásica de células del epitelio cervical por PVH permite su estudio en muestras de citología biopsias, lo cual mejora mucho la precisión diagnóstica. La citología con p16 tiene mucho mayor sensibilidad para detectar NIC que la citología convencional y comparado con las pruebas de PVH, la tinción con inmunohistoquímica del p16 tiene una especificidad mejor con muy buena sensibilidad, con esta evidencia clínica se concluye que el biomarcador p16 puede ser útil en el trabajo diagnóstico rutinario de las lesiones asociadas al PVH.<sup>30</sup>

En un artículo publicado en Julio del 2015 sobre la gradación de la patología de cuello uterino inducida por el PVH utilizando como marcadores la proteína E4 en combinación con p16 o MCM. El PVH produce lesiones cervicales variadas que van desde infecciones agudas temporales hasta las lesiones de alto grado, la clasificación de estas lesiones requiere el examen histopatológico y posiblemente el uso de biomarcadores. El p16 y MCM se perfilan como biomarcadores que expresan la actividad E6/E7 y pueden expresarse en lesiones de alto grado. En

este estudio se combina estos 2 biomarcadores con la detección de la proteína E4 de PVH con el fin de identificar ambos tipos de lesión. Gracias a esta óptica se pueden distinguir lesiones de la categoría NIC 2 en dos grupos, uno que se comporta como NIC 1 y otro que se comporta como NIC 3. Para esto se evaluaron 530 biopsias mediante el uso de tinción múltiple que permite superponer patrones de biomarcadores incluso en combinación con una imagen de hematoxilina-eosina. La clasificación convencional del NIC fue establecida por el panel de revisión y se comparó directamente con la patología molecular en la misma muestra de tejido. La detección de la proteína E4 coincidió con el inicio de la evaporización y presencia de coilocitos en la tinción de hematoxilina-eosina. Estos resultados sugieren que utilizar pares de biomarcadores moleculares complementarios tales como MCM/E4 o aún más prometedor p16/E4 pueden ayudar a la mejor estratificación de la neoplasia intraepitelial cervical.<sup>31</sup>

En un trabajo de investigación realizado en USA acerca de las transiciones moleculares de la infección por papiloma al NIC y al cáncer. Se estudiaron 128 muestras cervicales congeladas desde normales pasando por NIC 1, NIC 2, NIC 3 y cáncer desde múltiples perspectivas revelando una cascada de cambios progresivos. En comparación con el tejido sano la expresión de muchos genes de replicación/repación y proliferación celular se incrementó en lesiones NIC 1/lesiones NIC 2 y más evidente en lesiones NIC 3 en concordancia con la inactivación de genes supresores tumorales producida por el PVH. La transición de NIC 3 a cáncer mostro cambios metabólicos y una correlación inversa más fuerte que con cualquier gen fue un aumento de la expresión de p16 en cáncer ligados al PVH. Los resultados también indican que los receptores estrógenos son muy diferentes de los de cáncer de mama y actúan indirectamente a través de los fibroblastos del estroma de los tumores.<sup>32</sup>

En un estudio realizado en Australia sobre la evaluación de la inmunotinción con p16 para la detección de cambios de alto grado de la citología cervical. Desde la introducción de la vacuna del PVH en Australia en el 2007 ha disminuido significativamente la prevalencia de las enfermedades asociadas al papiloma como verrugas genitales y lesiones de alto grado, para mejorar la capacidad de identificar células anormales menos prevalente se pueden adjuntar marcadores



para mejorar la sensibilidad y especificidad de la citología, uno de estos marcadores es el p16 detectable en células que expresan el oncogén E7 codificado por el PVH de alto riesgo, en este estudio se evaluó una cohorte de 454 mujeres sometidas a tratamiento quirúrgico por displasia cervical, se detectaron 321 (71%) positivas a p16. Comparando la tinción de p16 en preparaciones de citología con el diagnóstico histológico de 212 pacientes mostramos 26(54%), 41(78%) y 80(90%), fueron positivas a p16 en las mujeres con NIC 1, NIC 2 y NIC 3, los virus PVH 16 y 18 fueron los más frecuentes en las lesiones de alto grado y correlacionan altamente con la tinción p16. Por lo que se concluye que la tinción con p16 proporciona una ayuda adicional para detectar lesiones de alto grado en los frotis de citología en lugares donde hay una baja prevalencia de enfermedad.<sup>33</sup>

En un metanálisis de la supervivencia de pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello en función del tipo de PVH y el estado del p16 realizado en Europa y publicado en Julio del 2015, los datos indican un mejor pronóstico para el carcinoma asociado al papiloma virus y el papiloma virus y el p16 se aceptan como predictores de supervivencia, se evaluaron 18 de 397 artículos la proporción porcentual de los grupos fue 25% para PVH+/p16, 61.2% para PVH/p16-, 7.1% para VPH/p16+ y 6.8% para PVH+/p16-. Se requieren más ensayos clínicos para determinar las posibles diferencias en la supervivencia de los pacientes en función de estos biomarcadores sin embargo la prueba de PVH puede ser recomendable en estos casos.<sup>34</sup>

En un estudio realizado en Brasil sobre la determinación de p16/Ki67 y la prueba de PVH en la detección del NIC 2/NIC 3 con diagnóstico en mujeres con lesión de bajo grado o ASCUS. El objetivo fue comparar la validez de la doble tinción p16/Ki67 y la prueba para PVH de alto riesgo para identificar lesiones NIC 2 y NIC 3 en mujeres con citología de ASCUS y LBG, se tomaron datos de 201 mujeres sometidas a despistaje por citología que tenían resultado ASCUS(96) o LBG(105) todas fueron sometidas a colposcopia con o sin biopsia para el diagnóstico de NIC 2 y NIC 3, se realizó el test de cobas y la inmunohistoquímica, se obtuvieron 8 casos de NIC 2/NIC 3 de las pacientes con ASCUS y 23 casos de NIC 2/NIC 3 de las pacientes con LBG. En el grupo de ASCUS la sensibilidad y especificidad de la prueba de PVH para detectar NIC 2/NIC 3 fueron 87.5 y 79.5% y para la

inmunohistoquímica fueron 69.6 y 75.3%. Se observó un mejor rendimiento de la inmunohistoquímica especialmente entre las mujeres menores de 30 años. La prueba de inmunohistoquímica y el test de cobas tuvieron un desempeño similar en las mujeres con ASCUS. Entre las mujeres mayores de 30 años con diagnóstico de LBG ambos métodos tuvieron un desempeño similar.<sup>35</sup>

Se evalúa en 477 mujeres la doble tinción con p16INK4a y Ki67 en una población en Kenia en el 2015 donde realiza la comparación con el virus del papiloma humano de alto riesgo en las pruebas de ADN y la inspección visual con ácido acético y yodo de Lugol. Los resultados se obtuvieron en el 100% de los casos siendo positivo en el 20,9% para el Virus del Papiloma Humano ADN, 3,1% para ácido acético y yodo Lugol, y 8,2% para p16INK4a y Ki67. La conclusión principal que muestra el estudio es que es una prueba útil en países en vía de desarrollo ya que apunta a una menor fracción de resultados falsos positivos en comparación con la citología común para el virus del papiloma humano.<sup>36</sup>

La producción continua de proteínas como E2 y E7 en la infección por el Virus del Papiloma Humano, establece un rol importante en la identificación de las primeras etapas de progresión a malignidad. Se realiza un estudio en el que se compara la identificación de las proteínas E2, E7 y P16 en las diferentes etapas: lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado, carcinoma escamoso, adenocarcinoma in situ y adenocarcinoma invasivo. Durante el estudio inmunohistoquímico, se identificó tanto la proteína E2 como E7 para los diferentes estadios, determinándose su expresión como proteínas oncogénicas virales complementarias al uso de la expresión del P16. Se concluye que la proteína E2 podría ser un marcador de lesión intraepitelial de bajo grado, mientras que la proteína E7 podría ser un marcador no solo para las lesiones intraepiteliales de bajo grado sino también para las lesiones intraepiteliales de alto grado.<sup>37</sup>

Las células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) y las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) del PAP son tratadas de forma conservadora y alrededor del 18,8% progresión a lesiones de alto grado. Se estudiaron 381 casos consecutivos de ASC-US y LSIL de los cuales 294 tuvieron correcto seguimiento citológico. De estos, 165 casos fueron utilizados para

analizar los factores predictivos de progresión a lesión intraepitelial de alto grado y 129 casos fueron sometidos a análisis de correlación entre citología e histología. De los 165 casos, el 79,4% retrocedieron, 13,9% eran persistentes y 6,7% progresaron a lesión intraepitelial de alto grado. La presencia del virus del papiloma humano estuvo en las mujeres que presentaron progresión de la enfermedad ( $p < 0,05$ ). El promotor de metilación de P16 fue más frecuente en los casos que progresaron y no se presentó en los casos de regresión. En relación a la biopsia para correlacionar la citología e histología, el 17,8% de los casos encontró neoplasia intraepitelial grado 2 o superior a esta. Demostrando así en los dos grupos de pacientes la utilidad del promotor de metilación P16 como marcador de la progresión de la enfermedad ASC-US y LSIL a lesión intraepitelial de alto grado.<sup>38</sup>

La utilidad de la proteína P16 como marcador biológico para la displasia cervical y carcinoma está bien establecida. Sin embargo, su utilidad también se observa en neoplasias escamosas que surgen en otras ubicaciones anatómicas, incluyendo cabeza, cuello y tracto oro faríngeo, además de lesiones escamosas en superficie ocular y regiones peri orbitales. Se estudió retrospectivamente 13 lesiones de la superficie ocular y 16 lesiones escamosas orbitales, todas por biopsia en la Universidad de San Diego, se encontró una inesperada gran prevalencia de inmunoreactividad fuerte a la proteína P16, sin observar correlación estadísticamente significativa con la edad sexo y etnia del paciente. Por lo cual se concluyó que hay una fuerte asociación entre la expresión del p16 y la infección por PVH en la superficie ocular y peri orbital.<sup>39</sup>

Se realizó un estudio en China acerca de la relación entre la expresión del P16 y la resistencia al CIS platino en las células de cáncer de cérvix. El CIS platino es un agente quimioterápico de primera línea para el tratamiento de cáncer de cérvix, con una buena respuesta al inicio la mayoría de pacientes desarrollan una resistencia posteriormente, los mecanismos subyacentes a este proceso no están claros. En el presente estudio la expresión del P16, se analizó por PCR y análisis de transferencia Western en las células con y sin resistencia al CIS platino y la interacción entre el p16 y cdk4 a través de coinmunoprecipitación. En éste estudio se evidencia una fuerte expresión del p16 en el cáncer de cérvix, y las células con

resistencia al CIS platino se asociaron a la inactivación de la proteína del retinoblastoma. Los resultados de este estudio indicaron que requieren la presencia del p16 para que las células del carcinoma cervical desarrollen resistencia al CIS platino.<sup>40</sup>

En un estudio publicado en setiembre del 2015 sobre la identificación de la infección por PVH en tejido de cancer, se observó que los virus ADN oncogénicos implicados en el carcinoma epidermoide de varios sitios anatómicos y de los adenocarcinomas cervicales, podrían identificarse en algunos carcinomas y eso ayudaría a la clasificación de tumor, pronóstico y tratamiento. Se capturaron con sondas Cepas de PVH 16 Y 18 en un total de 21 carcinomas de cabeza y cuellos genitourinarios y ginecológicos. Se utilizó el resultado del p16 como el estándar de oro, y el rendimiento máximo del ensayo fue 92 % de sensibilidad y 100% de especificidad del PVH.<sup>41</sup>

En Hungría se realizó un estudio acerca del uso del Claudín-1 como biomarcador de la citología e histología cervical. Varias pruebas de inmunohistoquímica se utilizan para el triaje del PVH en casos de citología positiva como un complemento para el diagnóstico de cáncer de patología cervical. La proteína Claudín-1 muestra una expresión alterada en el cáncer cervical se realiza una comparación de esta con la citología del PVH en una población de 352 mujeres que fueron referidas para colposcopia y 150 mujeres, que asistieron a chequeo de rutina. La citología y prueba de PVH se realizaron junto con la prueba de Claudín-1 y se utilizó como referencia la tinción de inmunohistoquímica de p16. Se utilizaron tres protocolos diferentes y se observó una alta correlación entre p16 y Claudín-1 el cual puede competir con este como biomarcador en Cáncer de cuello uterino. En conclusión, el Claudín-1 tiene potencial diagnóstico igual que el P16 en citología e histología.<sup>42</sup>

Se realizó un estudio en el instituto de Cáncer de USA sobre la tinción del p16 / Ki67 en citología para el estudio de lesiones pre cancerosas del cérvix en mujeres PVH positivas. El PVH usado como marcador para triaje de quien debe ser referido para una colposcopia, el PVH abarcaría una gran población por lo que se propone el doble manchado con p16 / Ki67 como un biomarcador para el cribaje

de esta población. En 1509 mujeres PVH positivas, se realizó un estudio observacional prospectivo desde el 2012, usando el doble manchado p16 / Ki67 en la citología, como evaluando el rendimiento clínico de la prueba entre todas las mujeres PVH positivas y en mujeres PVH positivas y en mujeres PVH positivas con citología negativa. Se evaluó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo en comparación con la citología. La doble tinción tuvo positividad inferior (45,9%) comparado con la citología ASC-US (53,4%). Para la detección de NIC 2 la doble tinción tenía similar sensibilidad y estadísticamente mayor especificidad en comparación con el PAP. En conclusión, la citología de doble manchado mostro una buena estratificación de riesgo para las mujeres PVH positivas aun con las que tenían citología normal.<sup>43</sup>

## **I.2 Bases teóricas**

Los cánceres infiltrantes de cuello uterino vienen precedidos usualmente por una larga etapa de enfermedades pre invasoras. Esto se caracteriza microscópicamente por un grupo de manifestaciones que van desde la atipia celular a diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC o CIN, según sus siglas en inglés) antes de progresar a carcinoma infiltrante. Un adecuado conocimiento de la etiología, la fisiopatología y la evolución natural de las lesiones pre invasoras proporciona una buena base para la inspección visual y el diagnóstico colposcópico, y para entender los principios del tratamiento de estas lesiones. En este capítulo se describe la evolución de los sistemas de clasificación de las lesiones precursoras del carcinoma de células escamosas del cuello uterino, las bases citológicas e histológicas de su diagnóstico y su evolución natural en cuanto a las tasas de regresión, persistencia y progresión.

También se describen las lesiones precancerosas del epitelio endocervical, comúnmente llamadas lesiones glandulares. El concepto de precursores del cáncer cervicouterino se remonta a fines del siglo XIX, cuando se reconocieron áreas de cambios epiteliales atípicos no invasores en muestras de tejidos colindantes con cánceres invasores (William, 1888). El término carcinoma *in situ* (CIS) se introdujo en 1932 para denominar las lesiones en las cuales las células Carcinomatosas indiferenciadas abarcaban todo el espesor del epitelio, sin

atravesar la membrana basal.

Posteriormente se comunicó la asociación entre CiS y cáncer invasor del cérvix uterino. El término displasia se introdujo a fines de los años cincuenta para denominar la atipia epitelial cervical intermedia entre el epitelio normal y el CIS. La displasia se clasificó en tres grupos — leves, moderados y severos — según el grado de afectación de la capa epitelial por las células atípicas. Posteriormente, por muchos años, las lesiones precancerosas cervicales se notificaron usando las categorías de displasia y CiS, en la actualidad ampliamente empleadas en muchos países en desarrollo.

Clasificar en dos categorías distintas la displasia y el carcinoma in situ (CiS) fue progresivamente considerándose como arbitrario, sobre la base de los resultados de algunos estudios prospectivo de seguimiento de las mujeres con esas lesiones. Se vio que algunos casos de displasia tuvieron regresión, algunos persistían y otros progresaban a CiS. Se observó una relación directa entre progresión y grado histológico. Estas observaciones llevaron al concepto de un solo proceso patológico continuo en el que el epitelio normal evoluciona a lesiones epiteliales precursoras y luego a cáncer infiltrante. Sobre la base de estas observaciones, en 1968 se introdujo la denominación de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para estratificar las múltiples posibilidades de atipia celular confinada al epitelio. La NIC se dividió en los grados 1, 2 y 3. NIC 1 era similar a la displasia leve, NIC 2 a la displasia moderada y NIC 3 a la displasia severa y al CiS.

En los años ochenta fueron identificándose cada vez más alteraciones anatomopatológicas en el epitelio cervical como la atipia coilocítica o condilomatosa asociada a la infección por virus del papiloma humano (PVH). Los coilocitos son células atípicas con una zona de cavitación o halo peri nuclear en el citoplasma, que denota cambios citopáticos causados por la infección del PVH. Esto llevó a la implementación de un sistema de clasificación histológico simplificado en dos grados. En 1990 se propuso una terminología histopatológica basada en dos grados de la enfermedad: lesión de bajo grado, que comprendía

las anomalías compatibles con atipia coliocítica y las lesiones NIC 1, y lesión de alto grado que comprendía NIC 2 y NIC 3. Se consideró que las lesiones de alto grado eran las reales precursoras del cáncer invasor.

En 1988, el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU, convocó un seminario para proponer una nueva modalidad de presentación de los resultados de la citología cervical (informe del seminario del Instituto Nacional del Cáncer, 1989; Solomon, 1989; Kurman *et al.*, 1991). Las recomendaciones realizadas entonces y su revisión en un segundo seminario llevado a cabo en 1991 fueron llamadas Sistema Bethesda (TBS) (informe del taller del Instituto Nacional del Cáncer, 1992).

La característica principal del TBS fue la creación del término “lesión escamosa intraepitelial”, con dos grados: lesiones de bajo grado (LBG) y lesiones de alto grado (LAG). La clasificación TBS categoriza los cambios condilomatosos planos (infección por PVH) y la NIC de bajo grado (NIC 1) en LBG, mientras que la LAG abarca los NIC más avanzados, NIC 2 y NIC 3. Se empleó el término lesión para recalcar que los cambios morfológicos en los que se basa un diagnóstico patológico no necesariamente significan proceso neoplásico.

El TBS fue diseñado para realizar los informes de citología, pero sirve también para reportar resultados histopatológicos. Se utiliza sobre todo en América del Norte. En el cuadro 2.1 se presenta la correlación entre la terminología de displasia o carcinoma *in situ*, los diversos grados de NIC y el Sistema Bethesda. En este manual, al comentar los diversos grados de lesión escamosa precancerosa cervicouterino, emplearemos la terminología NIC.

El TBS fue revisado y reevaluado en un seminario realizado en el 2001 convocado por el Instituto Nacional del Cáncer, de los Estados Unidos, copatrocinado por 44 sociedades profesionales de más de 20 países (Solomon *et al.*, 2002).

### **Características clínicas de la NIC**

No se han identificado síntomas particulares ni características clínicas que indiquen la presencia de NIC. Sin embargo, muchas de estas lesiones pueden tornarse blancas tras aplicar una solución de ácido acético al 3-5% y ser yodo negativas después de aplicar Lugol, pues el epitelio de la NIC contiene escaso o ningún glucógeno.

### **Diagnóstico y clasificación de la NIC por la citología**

La NIC puede detectarse por examen microscópico de las células cervicales en un frotis teñido por la técnica de Papanicolaou. En estas preparaciones citológicas, se evalúan los cambios de cada una de las células para el diagnóstico y la clasificación de NIC. En cambio, el examen histopatológico de los tejidos permite evaluar otras características. Evaluar citológicamente la NIC basándose en los cambios nucleares y citoplasmáticos es generalmente muy difícil. La hipertrofia de los núcleos y los cambios en tamaño y forma son características constantes de todas las células displásicas. La mayor intensidad tintórea (hipercromía) es otra característica destacada. Las células displásicas siempre presentan distribución irregular de la cromatina, como en grumos.

Los núcleos anormales en las células superficiales o intermedias indican una NIC de bajo grado (las figuras mitóticas y los nucléolos visibles son poco comunes en estos frotis), mientras que la anomalía de los núcleos de células para basales y basales indica NIC de alto grado. El tamaño del núcleo respecto de la cantidad relativa de citoplasma (relación núcleo/citoplasma) es una de las características más importantes para evaluar el grado de NIC. Las mayores relaciones se asocian con grados mayores de NIC. En general, en un frotis cervical se observan células con diferentes grados de alteración, lo que implica bastantes dificultades y una buena carga de subjetividad al presentar los resultados. La experiencia del citólogo es sumamente importante en el informe final.

### **Diagnóstico y clasificación de la NIC por la histopatología**

Puede sospecharse NIC por examen citológico con la técnica de Papanicolaou o mediante examen colposcópico. El diagnóstico final de NIC se establece por



examen histopatológico de una biopsia de cuello uterino con sacabocados o una muestra de escisión. Se evalúa si una muestra tisular cervical presenta NIC y en qué grado, en función de las características histológicas de diferenciación, maduración y estratificación de las células y de las anomalías de los núcleos. Para clasificar la NIC se observa la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras y diferenciadas. Los grados más avanzados de NIC suelen tener una mayor proporción del espesor epitelial con células indiferenciadas y solo una delgada capa superficial de células maduras, diferenciadas. Al realizar el diagnóstico se evalúan anomalías nucleares como la dilatación, la mayor relación núcleo/citoplasma, la hiper Cromía, el polimorfismo y la variación del tamaño nuclear (anisocariosis). A menudo existe una importante correlación entre la proporción del epitelio que presenta maduración y el grado de anomalía nuclear. Las figuras mitóticas de las células en división son poco comunes en el epitelio normal y, cuando existen, se observan solo en la capa para basal. Conforme aumenta la gravedad de la NIC se incrementa el número de figuras mitóticas, que pueden notarse en las capas epiteliales superficiales. Cuan menos diferenciado es un epitelio, más superficial es el nivel en cual pueden verse figuras mitóticas. Las configuraciones anormales de las figuras mitóticas también se tienen en cuenta al establecer el diagnóstico final. En la NIC 1 existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Las células indiferenciadas se encuentran en las capas más profundas del epitelio (tercio inferior). Se observan figuras mitóticas, pero no muchas. Pueden verse cambios citopáticos debidos a la infección por el PVH en todo el espesor del epitelio. La NIC 2 se caracteriza por cambios celulares displásicas restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con alteraciones nucleares más acentuadas que en la NIC 1.

En la NIC 3, la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el cuarto superficial del epitelio, con abundantes figuras mitóticas. Las anomalías nucleares aparecen en todo el espesor del epitelio. Muchas figuras mitóticas tienen formas anormales. Una estrecha relación entre citólogo, histopatólogo y colposcopista mejora la precisión de los resultados en las tres disciplinas. En particular, ayuda a diferenciar los grados más leves de NIC de otras afecciones con las que pueden confundirse.

## **Etiopatogenia de la neoplasia cervical**

Algunos estudios epidemiológicos han identificado algunos factores de riesgo que contribuyen a la aparición de precursores del cáncer de cuello uterino y del propio cáncer. Entre estos factores figuran la infección con ciertos tipos oncogénicos de papiloma virus humanos (PVH), inicio de las relaciones sexuales a una edad temprana, los múltiples compañeros sexuales, la multiparidad, el uso prolongado de anticonceptivos orales, el hábito de fumar, la pobreza, la infección por *Chlamydia trachomatis*, la falta de micronutrientes y un régimen alimenticio con pocas frutas y verduras.

Los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 de PVH están fuertemente asociados con NIC y con cáncer invasor. Se considera que la infección persistente con uno o más de dicho tipos oncogénicos causa irremediamente neoplasia cervical (CIIC, 1995). El análisis de los resultados combinados de un estudio de casos y controles multicéntrico realizado por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC, 1995) arrojó riesgos relativos (RR) que iban de 17 en Colombia a 156 en Filipinas, con un RR combinado de 60 (intervalo de confianza del 95%: 49-73) de cáncer cervicouterino. La asociación fue similar para el carcinoma escamo celular (RR: 62) y para el adenocarcinoma del cuello uterino (RR: 51). Se detectó ADN del PVH en 99,7% de 1.000 muestras evaluables de biopsia de cáncer cervicouterino obtenidas en 22 países. El 16 y el 18 son los principales genotipos víricos de PVH encontrados en los cánceres cervicouterino de todo el mundo.

Varios estudios de cohorte (de seguimiento) comunican una fuerte asociación entre la infección persistente por PVH oncógenos y el riesgo elevado de NIC (Koutsky *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1998; Moscicki *et al.*, 1998; Liaw *et al.*, 1999; Wallin *et al.*, 1999; Moscicki *et al.*, 2001; Woodman *et al.*, 2001; Schlecht *et al.*, 2002). La infección por PVH se transmite por vía sexual, por lo que los factores de riesgo están fuertemente relacionados con el comportamiento sexual (por ejemplo, número de compañeros sexuales o relaciones sexuales a una edad temprana). En la mayoría de las mujeres, las infecciones por PVH son

pasajeras. La evolución natural de la infección por PVH se ha estudiado mucho. La prevalencia de la infección por PVH varía entre las diferentes regiones del mundo, suele alcanzar un máximo de 20 a 30% de las mujeres de entre 20 y 24 años de edad, y disminuye luego a 3-10% de las mayores de 30.

Cerca del 80% de las mujeres jóvenes que contraen PVH presentan infecciones pasajeras que se resuelven en el espacio de 12 a 18 meses. Se cree que la infección por PVH empieza en las células basales o para basales del epitelio metaplásico. Si la infección persiste, puede ocurrir que el genoma vírico se incorpore al de la célula anfitriona. La diferenciación normal y la evolución de epitelio escamoso metaplásico inmaduro a maduro puede interrumpirse como resultado de la expresión de oncoproteínas E6/E7 y de la pérdida del control del crecimiento normal. Esto puede conducir posteriormente a la aparición de epitelio displásico anormal. Si el proceso neoplásico no se interrumpe, las lesiones tempranas de bajo grado pueden llegar a abarcar todo el espesor del epitelio. Después, la enfermedad puede atravesar la membrana basal y convertirse en cáncer invasor, extendiéndose a los tejidos y órganos circundantes. La invasión puede luego alcanzar la sangre y los conductos linfáticos, con lo cual la enfermedad puede diseminarse a los ganglios linfáticos y a órganos distantes.

### **Evolución natural de los precursores del cáncer cervicouterino**

A pesar de la exposición frecuente de las mujeres a los PVH, la aparición de neoplasia cervical es poco común. La mayoría de las anomalías cervicales causadas por la infección por PVH tienen poca probabilidad de progresar a NIC o a cáncer cervicouterino de alto grado, pues la mayoría retroceden por sí mismas. El largo plazo que transcurre entre la infección inicial y la enfermedad evidente indica que pueden ser necesarios varios cofactores (diferencias genéticas, efectos hormonales, carencias de micronutrientes, tabaquismo o inflamación crónica) para que avance la enfermedad. La regresión espontánea de la NIC también parece indicar que muchas mujeres pueden no estar expuestas a dichos cofactores.

Varios estudios han abordado la evolución natural de la NIC, haciendo hincapié en la regresión, la persistencia y la progresión de la enfermedad. Han revelado

que la mayoría de las lesiones de bajo grado son transitorias; que en la mayoría de los casos vuelven a la normalidad en plazos relativamente cortos o no progresan a formas más graves. En cambio, es mucho más probable que la NIC de alto grado se convierta en cáncer invasor, aunque también algunas de estas lesiones persisten como tales o retroceden. El intervalo medio para que los precursores progresen a cáncer invasor va de 10 a 20 años. Algunos estudios han intentado resumir las tasas de regresión, persistencia y progresión de la NIC. Aunque estos estudios tengan muchas limitaciones, proporcionan ciertas pistas sobre el comportamiento biológico de tales lesiones. En el cuadro 2.3 se presenta el análisis de los resultados combinados de los estudios publicados de 1950 a 1993 (Ostor *et al.*, 1993). En otro resumen, la probabilidad acumulada para todos los grados de NIC estudiados tanto por citología como por histología es de 45% de regresión, 31% de persistencia y 23% de progresión (Mitchell *et al.*, 1994). Las tasas de progresión a cáncer invasor en estudios de seguimiento por biopsia de pacientes con carcinoma *in situ* se situaban entre 29% y 36% (McIndoe *et al.*, 1984). Un metanálisis de 27.000 mujeres dio las tasas ponderadas de progresión a LAG y a cáncer invasor a los 24 meses, según la anomalía citológica de referencia, que se presentan en el cuadro 2.4 (Melinkow *et al.*, 1998). Holowaty *et al.* (1999) calcularon el RR de progresión y de regresión de displasias moderadas y avanzadas en un seguimiento de 2 años, tomando como referencia la displasia leve. El RR de CIS fue 8,1 para la displasia moderada y 22,7 para la displasia grave. El correspondiente RR de cáncer invasor fue 4,5 y 20,7 respectivamente.

### **Adenocarcinoma *in situ***

La lesión precursora, cuya procedencia del epitelio cilíndrico se conoce, se denomina adenocarcinoma *in situ* (AIS). En el AIS, el epitelio cilíndrico normal es reemplazado por epitelio anormal que presenta pérdida de la polaridad, células y núcleos de mayor tamaño, hipercromía nuclear, actividad mitótica, menor expresión de la mucina citoplasmática y estratificación celular o acumulación (figura 2.6). También pueden observarse ramificaciones glandulares anormales y glándulas arracimadas con proyecciones epiteliales papilares intraluminales sin islotes de estroma. Puede subdividirse, según el tipo de células, en endocervical, endometriode, intestinal y mixto. La mayoría de los AIS se encuentran en la zona

de transformación. El AIS puede asociarse a la NIC de epitelio escamoso entre uno y dos tercios de los casos. <sup>44</sup>

En los últimos años la inmunohistoquímica ha adquirido una importancia determinante en el diagnóstico histológico y citológico. Sin embargo, la gran proliferación de nuevos marcadores y las crecientes publicaciones, algunas de ellas con resultados discordantes, hacen que resulte imprescindible una revisión constante de su utilidad y necesidad. Los problemas diagnósticos en el cérvix uterino se centran en dos aspectos fundamentales: a) la identificación inequívoca de las lesiones verdaderamente premalignas (preinvasivas) y su diferenciación de sus simuladores, y b) la distinción entre las neoplasias primitivas invasoras y los tumores metastásicos o las extensiones de neoplasias de otro origen.

A pesar de que la mayoría de las lesiones glandulares y escamosas del cérvix uterino comparten una patogenia común la infección por el virus del papiloma humano (PVH), la diferente naturaleza y morfología de ambos epitelios hace que los diagnósticos diferenciales planteados, tanto de las lesiones preinvasivas como de las lesiones invasivas, sean muy diferentes. Por lo tanto, los paneles inmunohistoquímicos útiles en ambas situaciones serán distintos y coincidirán en pocos anticuerpos.

### **Papel de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico de las lesiones del epitelio escamoso**

Las principales limitaciones del diagnóstico histológico en la evaluación de las lesiones intraepiteliales escamosas son: a) la importante variación inter e intra observador en su diagnóstico, y b) la necesidad de identificación de las lesiones de bajo grado que presentan un verdadero potencial de progresión.

### **Marcadores que pueden mejorar la concordancia diagnóstica en las lesiones preinvasivas**

A pesar de que se considera el estándar de oro en el que se basan las conductas clínicas actuales, el estudio histológico de las lesiones intraepiteliales de cuello

uterino presenta una notable variabilidad inter e intra observador. En prácticamente todos ellos la concordancia diagnóstica es mayor en los extremos del espectro (biopsias negativas, NIC3 y carcinoma invasor), mientras que disminuye en las lesiones intermedias (NIC1 y, especialmente, NIC2). Dado que, según los criterios clínicos actuales, el tratamiento está indicado en las pacientes con NIC2 o más (NIC2+), y que este es precisamente el diagnóstico que presenta una mayor variabilidad inter e intra observador, en los últimos años se han propuesto diferentes marcadores para aumentar la concordancia diagnóstica en estas lesiones. Las condiciones que debería tener un buen marcador para ser útil en este contexto son: a) poseer una elevada sensibilidad para NIC2+ y/o NIC3; b) poseer una alta especificidad, y c) ser fácil de evaluar y reproducible.

p16INK4a es una proteína codificada por el gen supresor tumoral CDKN2A, localizado en el cromosoma 9. Una infección por PVH de alto riesgo produce una sobreexpresión de la proteína, que puede ser detectada mediante técnicas inmunohistoquímicas. A pesar de su asociación con las infecciones por PVH y de su similitud terminológica con el PVH 16, p16INK4a no es una proteína viral. Las evidencias existentes sobre la utilidad de la sobreexpresión de p16INK4a para reducir las discordancias en lesiones preinvasivas e invasivas de cuello uterino son muy numerosas y lo convierten en un elemento objetivo con escasa variabilidad inter observador. La sobre expresión de p16INK4a es altamente específica de las lesiones displásicas, particularmente de las de alto grado, las cuales son prácticamente siempre positivas, mientras que es negativa en la inmensa mayoría de las lesiones reactivas. La interpretación de la tinción de p16INK4a debe ser estricta para valorar la presencia o ausencia de sobreexpresión de la proteína. En la actualidad se considera únicamente como sobreexpresión de p16INK4a una positividad basal y supra basal del epitelio escamoso cervical difusa, citoplasmática y nuclear, haya o no tinción de los estratos más superficiales, en un área epitelial, aunque esta pueda ser muy pequeña. Por el contrario, tanto la negatividad absoluta como la positividad focal y/o parcheada, irregular o en damero para este marcador, o la tinción exclusiva de las capas epiteliales superficiales, se consideran como ausencia de sobreexpresión. Aunque esta última forma de positividad es frecuente en lesiones de bajo grado, puede observarse también en algunos epitelios cervicales

normales. La inclusión de casos con positividad parcheada o irregular podría explicar, al menos en parte, la existencia, en algunos trabajos, de positivities para p16INK4a cercanas o incluso superiores al 10% en las biopsias negativas. Así, varios estudios han mostrado que la adición de p16INK4a a la tinción rutinaria de hematoxilina y eosina aumenta notablemente la concordancia inter observador tanto en el diagnóstico de presencia o ausencia de lesión como en la gradación de las lesiones. La tinción es particularmente útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y lesiones no neoplásicas morfológicamente similares, como las alteraciones celulares asociadas a inflamación o atrofia, o la metaplasia escamosa reactiva o inmadura. También ha mostrado su utilidad en la identificación de lesiones pequeñas, con artefactos o escasamente representadas en la muestra, en la evaluación de legrado endocervical, y en la comprobación del estado de los márgenes de resección en piezas de conización, particularmente cuando estos están con artefactos y son difíciles de valorar, considerándose una herramienta de seguridad en el diagnóstico histológico rutinario.

Ki67 es un antígeno que identifica las células en proliferación. La identificación de Ki67 se ha utilizado como apoyo del diagnóstico histológico convencional en casos dudosos, estableciéndose una relación directa entre la presencia o no de lesión intraepitelial y su grado y la extensión de células positivas (positividad limitada al estrato basal en epitelios normales, células positivas en el tercio inferior o en la mitad del epitelio en lesiones de bajo grado y positividad difusa en lesiones de alto grado). Sin embargo, se trata de un marcador poco específico en la detección de lesiones premalignas, pues su expresión aumenta en cuadros reactivos epiteliales (inflamación). En un reciente trabajo, Galgano et al, compara la sensibilidad de p16INK4a con Ki67 y con el antígeno L1 de PVH, observando que p16INK4a presenta los mejores resultados (99,2% de sensibilidad versus 62,1 y 16,5% para Ki67 y L1, respectivamente). En este mismo trabajo se refiere que la tinción doble con p16INK4a y Ki67 en histología no aporta ventajas con respecto a la tinción exclusiva con p16INK4a.

La proteína 2 del mantenimiento de minicromosomas (MCM2) y la topoisomerasa II (TOP II) se encuentran sobre expresadas en los procesos que presentan una

inducción aberrante de la fase S del ciclo celular, circunstancia existente en células infectadas por el PVH. Utilizados de forma aislada presentan una sensibilidad cercana al 80% y una especificidad del 75%. Utilizados de forma combinada presentan una mejora de sus prestaciones individuales. Esta combinación está comercializada con el nombre de ProExC. En los trabajos en los que se comparan p16INK4a y ProExC, tanto la sensibilidad como la especificidad del primero son algo superiores a las del segundo. La utilización simultánea de ambos marcadores no mejora tampoco las prestaciones de los marcadores utilizados de forma aislada. Cdc6 y Mcm5 son dos antígenos relacionados con la proliferación celular equiparables a Ki67 pero que, al igual que Ki67, carecen de especificidad. El antígeno nm23 tiene una sensibilidad cercana al 80% pero una especificidad inferior al 40%, por lo que tampoco resulta de utilidad.

### **Marcadores que aportan información evolutiva en casos de NIC1**

Si bien se considera que todos los carcinomas de cérvix derivan de lesiones intraepiteliales, solo una minoría de estas progresará a carcinoma invasor. En concreto, se estima que aproximadamente el 16% de las lesiones de bajo grado progresan. Hasta el momento actual no existen elementos definitivamente aplicables para diferenciar entre los casos que van a progresar y los que no. Por ello, las guías clínicas actuales contemplan el seguimiento sin tratamiento de estas pacientes como la conducta más apropiada. Algunos trabajos recientes han indicado que p16INK4a puede proporcionar información pronóstica en estas lesiones. Hariri et al y Del Pino et al analizaron el posible valor predictivo de la determinación de p16INK4a en lesiones intraepiteliales de bajo grado. En ambos estudios la ausencia de sobreexpresión de la proteína p16INK4a identificaba un grupo de lesiones de bajo grado con mínima o nula capacidad de progresión. En los dos trabajos todas las lesiones de bajo grado que progresaron a NIC2+ mostraron positividad para p16INK4a en la biopsia de NIC1. No obstante, solo un porcentaje de las lesiones de NIC1 positivas para p16INK4a progresaron. Estos resultados, aunque pendientes de confirmación en series más amplias, sugieren que p16INK4a podría ser un importante marcador pronóstico en el manejo de lesiones intraepiteliales de bajo grado. <sup>45</sup>



El virus del papiloma humano (PVH) pertenece a una familia que comprende más de 100 genotipos diferentes. Se pueden dividir en dos grupos según actúen sobre la piel o en mucosas (nasofaríngea, oral y genital). Los genotipos que infectan las mucosas se dividen a su vez en «alto riesgo» (los más representativos de este grupo serían el PVH-16 y el PVH-18) y «bajo riesgo» según su potencial neoplásico.

Muchos estudios han demostrado el poder carcinógeno del PVH; de hecho se ha encontrado en casi todas las lesiones pre neoplásicas y neoplásicas del cérvix, si bien el potencial oncogénico de los distintos genotipos varía a pesar de expresar las mismas oncoproteínas. La infección comienza por las células basales del epitelio escamoso donde el virus se replica episomalmente (ADN no integrado; fuera del cromosoma huésped, en el citoplasma) y expresa los genes virales tempranos (*early*) E1, E2, E4, E5, E6 y E7. La célula basal infectada, que ya muestra signos de disrupción celular por la presencia del virus, continúa su diferenciación y migración hacia la superficie epitelial, donde la célula escamosa comienza a expresar los genes PVH tardíos (*late*) L1 y L2. En este momento la infección puede o bien regresar espontáneamente o progresar a lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LBG), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LAG) o carcinoma escamoso de cérvix, permitiendo la invasión local o incluso la diseminación metastásica. En las células epiteliales transformadas los genes víricos están integrados en el ADN huésped, expresando las proteínas oncogénicas E6 y E7.

En los tipos de alto riesgo (AR) PVH-16 y PVH-18 las proteínas E6 y E7 pueden inducir la inmortalización de los queratinocitos, que se debe en parte a la interacción de PVH16 E7 con determinadas proteínas, sobre todo pRb (producto del gen del retinoblastoma). Esta proteína ejerce un papel esencial en el control del ciclo celular, ya que regula la actividad de diversos factores de transcripción (E2F). En situación quiescente, la pRb se encuentra activa, hipofosforilada y unida a E2F. Si exponemos estas células a efectos mitogénicos se inicia la transcripción de genes G1 específicos (ciclinas D) que a su vez se unen y activan las cinasas dependientes de ciclina (CDK4 y CDK6) que fosforilan la pRb en medio de la fase G1, lo que libera el factor E2F y se produce la transición a la fase S 2. Puesto que

existe esta vía de activación del ciclo celular debe haber algún mecanismo que controle a su vez esta vía de activación; de esto se encarga un pequeño grupo de proteínas, entre las que destaca la p16ink4a, proteína supresora tumoral, que se unen a las CDK e inhiben su actividad cinasas (inhibidores de cinasas dependientes de ciclina [CDKI]), por tanto una expresión ectópica de p16ink4a dará lugar a una acumulación de pRb hipofosforilada, secuestro de E2F y consecuentemente arresto de G1. La proteína RB produce un control negativo sobre la p16, por lo que la inactivación funcional de pRb por cualquier motivo conduce a una sobreexpresión de p16 y, por tanto, a que tenga lugar la activación de la cascada p16/ciclina D/CDK4/pRb reguladora del ciclo celular 3. La interacción de PVH16 E7 con pRb, al igual que sucede con la fosforilación mediada por CDK, provoca la liberación de E2F activos y estimulación de la entrada en fase S, incluso en ausencia de complejos CDK4 y CDK6 activos y en presencia de altos niveles de p16ink4a, lo que indica que la función supresora de p16 puede ser sobrepasada por los oncogenes víricos; de este modo, la sobreexpresión de p16 que en condiciones normales habría detenido el ciclo celular, no tienen ningún efecto, ya que la pRb ha sido bloqueada previamente por la E7. La inactivación de la función reguladora de p16 se ha visto desde estadios muy precoces de la progresión oncogénica del PVH, pero no durante la transformación maligna tardía, mientras que la expresión de E6/E7 sólo se ha podido confirmar por hibridación *in situ* en displasias graves o carcinomas.

En neoplasias malignas de mama, pulmón, páncreas, etc., se ha demostrado una inactivación de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (p16ink4a) que puede deberse a delección homocigota, mutación somática o hipermetilación, pero ninguna de estas causas está presente en las lesiones del cérvix, habiéndose encontrado una relación recíproca entre la expresión de pRb y p16. En los genotipos de bajo riesgo (BR) las oncoproteínas E6 y E7 han demostrado escasa afinidad para unirse a pRb (hasta 10 veces menos) y carecen de actividad transformadora *in vitro*. En el caso de PVH1 (virus cutáneo que se asocia a lesiones benignas de piel) la E7 se une a pRb con la misma eficacia que PVH16 E7, pero aun así no produce transformación celular; en este sentido se ha demostrado recientemente que PVH1 E7 no es capaz de promover la inactivación de pRb. Giarré et al, han encontrado una diferencia en ambas proteínas E7 al final

del dominio de unión a pRb que comprende tan sólo tres aminoácidos y que es la que determina su capacidad para superar la acción inhibitoria de p16ink4a; así pues, parece que la unión de E7 a pRb es un factor esencial, pero no suficiente para inducir la transformación de las células huésped.

Gracias a trabajos previos, sabemos que la p16ink4a se puede demostrar por estudio inmunohistoquímico, mostrando un patrón de tinción diferente según la infección se deba a genotipos de alto o bajo riesgo, independientemente del tipo de lesión cervical. La inmunoreactividad es nuclear y citoplasmática en casos de lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LAG/NIC II-III) y carcinoma escamoso, con una positividad difusa e intensa (sobre todo cuando se asocia a PVH 16/18), mientras que en casos de displasias leves (LBG/NIC I) es fundamentalmente nuclear, más débil y focal. Sano et al, establecieron una clasificación según el porcentaje de células positivas para la inmunotinción de p16: 0% al 5%: negativo; < 80%: positivo focal, y > 80%: positivo difuso. No se ha detectado inmunoreactividad en epitelio no displásico, células mesénquimas o metaplásicas, si bien cierta reactividad débil se ha encontrado en el citoplasma y núcleo de fibroblastos proliferantes, células endoteliales y algunas células inflamatorias.

La eficacia de la inmunotinción de p16 en lesiones escamosas de cérvix parece estar fuera de toda duda, más aun teniendo en cuenta que en el estado fisiológico de inactividad esta proteína no se expresa en las células glandulares, aunque su representatividad es ligeramente menor para los adenocarcinomas de cérvix.

Aproximadamente el 100% de los carcinomas escamosos y displasias graves de cérvix asociados a PVH AR sobre expresan p16 de manera difusa, aunque no todos los casos que presentan sobreexpresión de p16 son PVH positivos, esta circunstancia podría deberse a diferentes factores, como un falso negativo en la detección del virus por escaso número de copias víricas o por pérdida de la región subgenómica en el ADN vírico. También parece indicar que existen vías desconocidas de activación de la p16 independientes de la acción del PVH. En contraste, la inmunotinción negativa o débilmente positiva ha sido fundamentalmente descrita en adenocarcinomas no asociados a PVH, sugiriendo que la desregulación de esta proteína puede estar relacionada con la etiología de

estas lesiones.<sup>46</sup>

### **Tinción dual p16 + ki 67. Un paso más en cuanto a la especificidad de citologías ginecológicas**

La tinción dual actúa mediante 2 anticuerpos unidos a 2 cromógenos diferentes, de modo que las células con positividad para p16 mostrarán tinción citoplasmática y/o nuclear de color marrón y aquellas con positividad para ki67 mostrarán coloración nuclear rojiza. El kit comercial (NICtecW PLUS, Laboratorios MTM) se encuentra calibrado para que solo aquellas células que muestren ambas tonalidades sean consideradas positivas para la integración viral. A la hora de realizar la lectura de las preparaciones citológicas, las células con doble tinción destacaran sobre un fondo azulado pálido, de modo que su identificación será rápida y eficaz. La imagen obtenida será similar a la de un «huevo frito», de modo que un núcleo rojo centrará un citoplasma marrón (realmente, la tinción marrón también es nuclear, pero el colorante rojizo la oculta).

El significado pronóstico y terapéutico de las lesiones positivas para la tinción dual será el mismo que para la determinación aislada de p16 (NICtecW Cytology), proponiéndose la realización de una biopsia a aquellas pacientes con resultados positivos. Las ventajas de rapidez y seguridad serán similares pues la determinación se realizará en ambos casos sobre la muestra previa, sin necesidad de molestar a la paciente con una nueva toma, pero la sensibilidad (respecto de la clásica tinción PAP) y la especificidad (respecto del clásico tipaje viral) aumentaran, así como la comodidad para el citólogo en la identificación de células problema.<sup>47</sup>

### **Utilidad de p16 y Ki67 en el diagnóstico histológico**

A pesar de que se considera el estándar de oro en el que se basan las conductas clínicas actuales, el estudio histológico de las lesiones intraepiteliales de cuello uterino presenta una notable variabilidad inter e intra observador. En prácticamente todos los trabajos la concordancia diagnóstica es mayor en los extremos del espectro (biopsias negativas, NIC3 y CCU), mientras que la

discordancia es más elevada en las lesiones intermedias (NIC1 y, especialmente NIC2).

Dado que según los criterios clínicos actuales el tratamiento está indicado en aquellas pacientes con NIC2 o más (NIC2+), y que éste es precisamente el diagnóstico con una mayor variabilidad inter e intra observador, en los últimos años se han propuesto diferentes marcadores para aumentar la concordancia diagnóstica en estas lesiones. Tres son las condiciones que debería tener un buen marcador para ser útil en la práctica diaria: 1) una elevada sensibilidad para NIC2+ y/o NIC3+; 2) una alta especificidad, y 3) ser fácil de evaluar y reproducible.

Las evidencias existentes sobre la utilidad de la sobreexpresión de p16 para reducir la variabilidad diagnóstica en lesiones preinvasivas e invasivas de cuello uterino son muy numerosas, de modo que se puede afirmar que se trata de una herramienta sumamente útil no sólo en el diagnóstico de lesiones de cérvix sino en el manejo posterior de las mismas, aportando un elemento objetivo con escasa variabilidad inter observador. La sobreexpresión de p16 es altamente específica de las lesiones displásicas, particularmente de las de alto grado, las cuales son prácticamente siempre positivas, mientras que es negativa en la inmensa mayoría de las lesiones reactivas.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que la forma de valorar p16INK4a se ha refinado en los últimos años. En la actualidad se considera únicamente como sobreexpresión una positividad difusa en células basales y para basales (es decir, en el tercio inferior del epitelio) en un área epitelial, aunque ésta pueda ser pequeña. Por el contrario, tanto la negatividad absoluta como la positividad parcheada, irregular o en damero para este marcador se consideran como ausencia de sobreexpresión. Aunque ésta última forma de positividad es frecuente en lesiones de bajo grado, puede observarse también en algunos epitelios cervicales normales. La inclusión de casos con positividad parcheada o irregular explica, al menos en parte, la existencia en algunos trabajos de positivities para p16 cercanas o incluso superiores al 10%.

Prácticamente todos los estudios han demostrado que la adición de p16 a la tinción rutinaria de hematoxilina eosina aumenta notablemente la concordancia inter observador en cuanto a la presencia o ausencia de lesión y el grado de consenso en la gradación de dichas lesiones. La tinción es particularmente útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones no neoplásicas tales como las inflamatorias o los cambios celulares asociados a la atrofia y las lesiones verdaderamente premalignas, en la identificación de lesiones pequeñas o escasamente representadas en la muestra y en la evaluación de legrados endocervical.

La identificación de Ki67 ha venido utilizándose como apoyo del diagnóstico histológico convencional en casos dudosos, estableciéndose una relación directa entre la presencia o no de lesión intraepitelial y su grado y la extensión de células positivas. Así, los epitelios sin lesión presentan solo células positivas en el estrato basal, las lesiones de bajo grado muestran células positivas en el tercio inferior o en la mitad del epitelio, y las de alto grado positividad difusa en todos los estratos epiteliales desde el basal al superficial. Sin embargo, se trata de un marcador poco específico en la detección de lesiones víricas, pues su expresión aumenta en cuadros reactivos epiteliales (inflamación) y puede verse en linfocitos intraepiteliales, todos ellos posibles falsos positivos que dificultan su interpretación.

En un reciente trabajo Galgano y cols (*Galgano et al, 2010*) comparan la sensibilidad de p16, con Ki67 (y también con el antígeno L1 de PVH), observando que p16 presenta los mejores resultados. En este mismo trabajo, los autores indican que la tinción doble con p16 y Ki67 en histología no aporta ventajas con respecto a la tinción exclusiva con p16. La proteína 2 del mantenimiento de minicromosomas (MCM2) y la topoisomerasa II (TOP II $\alpha$ ) se encuentran sobre expresadas en los procesos que presentan una inducción de la fase S del ciclo celular aberrante, circunstancia existente en células infectadas por el PVH. Utilizados de forma aislada presentan una sensibilidad cercana al 80% con una especificidad del 75% (*Badr et al, 2008*). Utilizados de forma combinada presentan una mejora de sus prestaciones individuales. Esta combinación está comercializada con el nombre de ProExC. En los trabajos en los que se comparan

p16 y ProExC, tanto la sensibilidad como la especificidad del primero son algo superiores a las del segundo (*Badr et al 2008; Guo et al, 2011*). La utilización simultánea de ambos marcadores no mejora tampoco las prestaciones de los marcadores utilizados de forma aislada.

Cdc6 y Mcm5 son dos novedosos antígenos relacionados con la proliferación celular, equiparables a Ki67, pero carecen de especificidad, por cuanto no distinguen las células proliferantes displásicas y no displásicas. El antígeno nm23 tiene una sensibilidad cercana al 80%, pero una especificidad inferior al 40% por lo que tampoco resulta de utilidad. Por último, aunque PVH es el agente causal de todas las lesiones escamosas del cérvix y que éste es siempre detectable mediante técnicas muy sensibles como las basadas en la PCR, los diferentes tests comerciales basados en hibridación in situ, por su especificidad relativamente baja para PVH, presentan porcentajes de positividad para NIC2-3 entre un 55 y un 70% que los hace poco útiles en la práctica.

Si bien la mayoría de los carcinomas de cérvix derivan de lesiones intraepiteliales, sólo una minoría de éstas progresará a carcinoma invasor. Ello es particularmente notorio para las lesiones de bajo grado, de las que sólo un mínimo porcentaje va a progresar, mientras que la mayoría (hasta 85%), regresará espontáneamente. Por ello, las guías clínicas actuales contemplan el seguimiento sin tratamiento de estas pacientes. La morfología no aporta información sobre el riesgo de progresión de estas lesiones por lo que sería de gran interés disponer de un marcador capaz de identificar las lesiones de bajo grado con capacidad de progresión.

Algunos trabajos recientes han indicado que p16 puede proporcionar información pronóstica en estas lesiones. Hariri y cols. (*Hariri et al, 2007*) y Del Pino y cols. (*Del Pino et al, 2009*) han analizado el posible valor predictivo de la determinación de p16 en lesiones intraepiteliales de bajo grado. En ambos estudios la ausencia de sobreexpresión de la proteína p16 identificaba un grupo de lesiones de bajo grado con mínima o nula capacidad de progresión. En los dos trabajos, todas las lesiones de bajo grado que progresaron a NIC 2-3 mostraron positividad para p16 en la biopsia de NIC1. No obstante, solo un porcentaje de las lesiones de NIC1 positivas para p16 progresaron. Estos resultados, aunque pendientes de

confirmación en series más amplias, sugieren que p16 podría ser un importante marcador pronóstico en el manejo de lesiones intraepiteliales de bajo grado.

### **Utilidad de p16 y Ki67 en el cribado**

Como se ha expresado anteriormente, el test de Papanicolaou, el método más común de cribado del CCU ha demostrado una sensibilidad limitada para el diagnóstico de LAG y CCU. Además, dicho test, detecta a un elevado número de mujeres con lesiones ASC-US y LBG que tienen un riesgo muy bajo de progresión a LAG y CCU. Por otra parte, el reconocimiento de que la infección por PVH es un factor necesario para el desarrollo del CCU está conllevando a un cambio en el paradigma de los programas de cribado con un uso cada vez más extendido de los tests de detección de PVH en el cribado primario.

De este modo, aunque los test de PVH son muy sensibles para la detección de lesiones cervicales premalignas, no puede discriminar entre las frecuentes infecciones transitorias y las verdaderas lesiones premalignas, mucho menos prevalentes. La p16 como marcador único aumenta la sensibilidad y la especificidad de la citología convencional para la detección de lesiones premalignas, en comparación con la citología convencional. Sin embargo, la frecuente presencia de células normales positivas para p16 obliga a utilizar criterios morfológicos (Denton et al, 2010).

Por ello, recientemente se ha propuesto que la detección simultánea de p16, marcador de anti proliferación, y Ki67, un marcador de proliferación, en una misma célula epitelial cervical podrían ser, en citología, marcadores subrogados de la desregulación del ciclo celular secundaria a la infección transformante por PVH. La principal ventaja de esta tinción dual p16/Ki67 es que no precisa de interpretación morfológica de las características nucleares, y se considera como positiva para el test cualquier citología con al menos una célula con positividad dual (tinción marrón citoplasmática para p16 y tinción roja nuclear para Ki67).

Debido a estas ventajas, p16 aislada para citología ha sido retirada del mercado y solamente es posible utilizar la citada tinción dual. Dicha tinción dual p16/Ki67 en



las extensiones citológicas ha mostrado ser uno de los tests más prometedores para identificar lesiones cervicales premalignas considerándose como test positivo la presencia de una o más células que expresen ambos biomarcadores. En la actualidad se han publicado nueve estudios valorando este test en citología, con algunas diferencias notables en los criterios de inclusión de las pacientes. En la mayoría de estos estudios el test ha demostrado una sensibilidad y especificidad muy altas, próximas respectivamente al 90% y al 80%. La sensibilidad del test es muy alta en muestras preparadas con ThinPrep y parece reducirse en extensiones convencionales y extensiones preparadas con SurePath.

La tinción dual p16/Ki67 ha demostrado ser particularmente útil en el triaje de las pacientes con citología de ASCUS y LBG o en las pacientes con test de PVH positiva con citología negativa. El test presenta una sensibilidad y especificidad muy altas entre las mujeres mayores de 30 años, pero en menores de 30 años, grupo particularmente conflictivo, dada la frecuencia de alteraciones citológicas leves y de infecciones por PVH transitorias en este grupo de edad el rendimiento es excelente. En uno de los estudios publicados la adición de criterios morfológicos a la valoración inmunohistoquímica incrementa de forma notable la especificidad de la técnica. Esta estrategia puede ser especialmente útil en mujeres jóvenes. <sup>7</sup>

### **I.3 Definición de términos**

#### **P16**

Proteína que se sobre expresa en células infectadas con PVH-AR

#### **Ki67**

Antígeno que identifica las células en proliferación.

#### **NIC 2**

Neoplasia intraepitelial cervical que compromete los dos tercios internos del epitelio.

#### **Inmunohistoquímica**

Técnica histopatológica de tinción con anticuerpos inmunofluorescentes.

## **CAPÍTULO II: METODOLOGÍA**

### **II.1 Tipo y diseño de investigación**

El presente estudio fue de tipo cuantitativo, observacional, descriptivo, retrospectivo de corte transversal.

El diseño de la investigación fue descriptivo transversal.

### **II.2 Diseño muestral**

Para este estudio se tomó la totalidad de las Historias Clínicas y muestras de biopsias con resultado histopatológico NIC 2 del Centro Médico Oncomujer durante los años 2012 al 2015.

### **II.3 Características del lugar o institución donde se realizó la investigación**

Este estudio se realizó con las biopsias de pacientes del Centro Médico Oncomujer, institución privada especializada en prevención de enfermedades neoplásicas y atención de neoplasias ginecológicas.

### **II.4 Método de recolección de datos. Instrumentos**

En el presente estudio se utilizó una ficha de recolección de datos para cada uno de los pacientes en estudio.

### **II.5 Procesamiento de datos**

Se empleó la base de datos con el software SPSS 23.0 para Windows y Microsoft Excel 2010. Se utilizó estadística descriptiva.

### **II.6 Aspectos éticos**

El presente trabajo de investigación fue de tipo observacional de revisión de biopsias de pacientes que fueron atendidas en el Centro Médico Oncomujer,

previa autorización de la institución y respetando la confidencialidad de cada paciente. Se obtuvieron los resultados de cada una de las pacientes que acudieron para estudio citológico por PAP, IVAA y que tuvieron como resultado de biopsia el diagnóstico de NIC 2. La investigación no presenta ninguna intervención terapéutica, solo se trata de procedimientos diagnósticos. En los procedimientos realizados en el Instituto Onco Mujer, no se describe interurrencias que hayan afectado o puesto en riesgo la salud de la paciente.



### CAPÍTULO III: RESULTADOS

Este estudio se realizó con un total de 54 pacientes que tenían una muestra de biopsia de cuello uterino con diagnóstico de NIC 2 atendidas en el centro médico Onco Mujer. Se obtuvo una media de la edad de 36,37 años. Ninguna paciente se perdió durante el estudio utilizando el total de pacientes durante el periodo del 2013 al 2015. Se consideró como resultado positivo la tinción del marcador p16, marcador Ki67 o una tinción positiva para ambos marcadores simultáneamente. De lo contrario se consideró un resultado negativo la no tinción de ninguno de estos marcadores, no quedando ninguna muestra sin resultado intermedio o diferente al mencionado.

En primer lugar se presentan las características sociodemográficas de las pacientes atendidas entre los años 2013 y 2015. Se describe la edad en intervalos de 10 años cada uno. El grupo de edad correspondiente de 22 a 30 años tuvo un total de 18 pacientes que representan el 33,3%. El grupo de edad correspondiente de 31 a 40 años tuvo un total de 20 pacientes que representan el 37%. El grupo de edad correspondiente de 41 a 50 años tuvo un total de 14 pacientes que representan el 25,9% y finalmente el grupo de edad de mayores de 51 años tuvo un total de pacientes solo 2 los cuales representan el 3,7%.

El lugar de procedencia correspondiente a Costa tuvo un total de 36 pacientes que representan el 66,7%, el lugar de procedencia Sierra con un total de 4 pacientes representa el 7,4% y el lugar de procedencia Selva con un total de 14 pacientes representa el 25,9%.

El estado civil se conformó por 5 criterios, pacientes solteras con un total de 21 pacientes representaron el 38,9%, pacientes casadas con un total de 18 pacientes representaron el 33,3%, pacientes viudas y divorciadas conto con 1 paciente respectivamente representando cada una el 1,9% y finalmente las pacientes convivientes con un total de 13 pacientes representó el 24,1%.

La paridad se conformó en intervalos con respecto a la cantidad de hijos siendo estos de 1 a 2 hijos, de 3 a 4 hijos y de 5 a más. El primer grupo de 1 a 2 hijos

conto con 27 pacientes representando el 64,3%, el segundo grupo de 3 a 4 hijos conto con 10 pacientes representando el 23,8% y finalmente el tercer grupo de 5 a más hijos conto con 5 pacientes representando el 11,9%.

Toda la información acerca de las características sociodemográficas de las pacientes en estudio se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Características sociodemográficas de las pacientes atendidas en el centro médico Oncomujer, 2013 - 2015 (n = 54)

Edad (años)	n	%
22 – 30	18	33.3
31 – 40	20	37.0
41 – 50	14	25.9
51 – más	2	3.7
Procedencia		
Costa	36	66.7
Sierra	4	7.4
Selva	14	25.9
Estado civil		
Soltera	21	38.9
Casada	18	33.3
Viuda	1	1.9
Divorciada	1	1.9
Conviviente	13	24.1
Paridad		
1 - 2	27	64.3
3 - 4	10	23.8
5 a más	5	11.9

En segundo lugar se realizó la tinción para el marcador p16 en la totalidad de biopsias positivas para NIC 2. El resultado positivo para la tinción de p16 fue de 33 pacientes representando el 61,1% de la población total y el resultado negativo para la tinción del p16 fue de 21 pacientes representando el 38,9% de la población total.

Toda la información acerca de la tinción de p16 en las pacientes del estudio se encuentra en la tabla 2.

Tabla 2. Hallazgos laboratoriales P 16 de las biopsias de las pacientes con NIC 2 en el centro médico Oncomujer, 2013 - 2015

P 16	Frecuencia	Porcentaje	IC 95%
Positivo	33	61.1	
Negativo	21	38.9	25.9 - 51.9
Total	54	100%	

En tercer lugar se realizó la tinción para el marcador Ki67 en la totalidad de biopsias positivas para NIC 2. El resultado alto para la tinción de Ki67 fue de 32 pacientes representando el 59,3% de la población total y el resultado bajo para la tinción del Ki67 fue de 22 pacientes representando el 40,7% de la población total.

Toda la información acerca de la tinción de Ki67 en las pacientes del estudio se encuentra en la tabla 3.

Tabla 3. Hallazgos laboratoriales Ki 67 de las biopsias de las pacientes con NIC 2 en el centro médico Oncomujer, 2013 - 2015

Ki 67	Frecuencia	Porcentaje	IC 95%
Alto	32	59.3	
Bajo	22	40.7	27.6 - 53.8
Total	54	100%	

Finalmente, se realizó un análisis para ambas tinciones p16 y Ki67 de manera simultánea. Se obtuvo resultado positivo para p16 y con resultado alto para ki67 de 32 pacientes representando el 59,3% de la totalidad. Asimismo, se obtuvo resultado negativo para p16 y resultado bajo para Ki67 de 21 pacientes representando el 38,9% de la totalidad, no se encontraron hallazgos de p16 negativo con Ki67 de alto valor. Sin embargo se encontró 1 hallazgo de p16 positivo con Ki67 de bajo

grado, lo que indicaría un falso positivo del p16.

Toda la información acerca del análisis entre la tinción p16 y la tinción Ki67 en simultáneo se encuentra en la tabla 4.

Tabla 4. Hallazgos laboratoriales de P 16 y Ki 67 de las biopsias de las pacientes con NIC 2 en el centro médico Oncomujer, 2013 - 2015

P 16	Ki 67				Total	
	Alto		Bajo		n	%
	n	%	n	%		
Positivo	32	59.3%	1	1.9%	33	61.1%
Negativo	0	0.0%	21	38.9%	21	38.9%
Total	32	59.3%	22	40.7%	54	100.0%



## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

La edad media de esta población fue 36.37 años, lo cual correlaciona con la edad de incidencia de las lesiones pre cancerosas de cervix que según la literatura se encuentra entre 30 y 40 años.<sup>1-4</sup> El 70% de esta población se encontró entre los 22-40 años de edad y el 71% fueron solteras o casadas, siendo todas sexualmente activas, concordando con lo descrito por la literatura revisada,<sup>1-4</sup> este hallazgo se soporta en el factor epidemiológico “actividad sexual”, según el cual el trauma de la cabeza del pene sobre el cervix produce la microfisura que permite al virus del papiloma humano ingresar e infectar las células basales del epitelio escamoso.<sup>1-3</sup>

La procedencia de las pacientes fue mayoritariamente de Lima, debido a la ubicación del centro medico oncomujer, sin embargo hubo un número importante de pacientes procedentes de la selva lo que concuerda con los estudios epidemiológicos realizados en nuestro país, y finalmente las menos frecuentes fueron las pacientes provenientes de la sierra.

La tinción de inmunohistoquímica Ki67 fue positiva en 59.3% de todos los casos de NIC-2 revisados, lo que representa una baja concordancia entre el diagnóstico histológico de NIC-2 y esta tinción,<sup>6,12-14</sup> que en estudios previos varía entre 30-60% de concordancia ínter e intraobservador. La interpretación de Ki67 es indirecta ya que nos informa que se trata de un epitelio con muchas mitosis, lo que infiere una replicación descontrolada y progresión de tumor a largo plazo, lo que soporta el manejo quirúrgico de estas lesiones, sin embargo cuando el Ki67 resulta baja positividad, significa que el riesgo de progresión sería bajo, por tanto el manejo quirúrgico sería discutible en este grupo de pacientes<sup>6</sup>. No obstante, aun no se ha establecido aun cual es el valor de corte para definir una positividad alta o una positividad baja en el uso de Ki67, en el presente estudio como en estudios previos se considera positiva o alta la tinción hasta las capas superiores del epitelio y se considera baja cuando solo se colorean las capas inferiores cercanas a la lamina basal. Lo que aportaría la tinción con Ki67 sería la sensibilidad, solo indicaría actividad de replicación celular. La tinción con p16 se asocia fuertemente a la presencia de virus del papiloma humano de alto riesgo, y



su positividad es mayor cuanto mayor es el grado de la lesión, lo que nos aportaría la especificidad de la prueba.

La asociación de las tinciones de inmunohistoquímica Ki67 y p16, mejora la disquisición diagnóstica y nos permiten una mejor interpretación del riesgo de progresión según la literatura revisada, en nuestra población el 59.32% fueron positivas a ambas pruebas, estableciendo el criterio llamado “riesgo de progresión”, y soportando la necesidad de manejo quirúrgico. Sin embargo, cuando los resultados son negativos, nos demuestra el bajo riesgo de progresión y la necesidad de seguimiento y observación, considerando estas lesiones como de bajo grado. Esto se soporta en que el p16INK4, es un inhibido de ciclina quinasa, que funciona como un sistema de retroalimentación generado por cada mitosis celular, que tiene por función inactivar el “complejo ciclina D-ciclina dependiente de quinasa”, reactivando la función inhibidora del gen Rb; pero cuando este gen esta bloqueado por el gen oncogénico E7 dependiente del virus del papiloma humano, la proliferación celular se vuelve descontrolada y p16 se acumula en la célula dañada; siendo un indicador de integración del ADN viral al ADN del huésped y marcador manifiesto de progresión; su asociación a Ki67 permite reducir los falsos positivos, ya que la positividad de p16 debe concordar con un numero de mitosis elevado, ósea un Ki67 altamente positivo.<sup>6-20</sup> Hubo un caso de p16 positivo y Ki67 de baja posibilidad, lo que indicaría un caso falso positivo con p16, esto muestra que a pesar de ser el p16 positivo, no hay replicación celular descontrolada y por lo tanto no hay riesgo de progresión. De lo que se infiere que ambos marcadores deben ser positivos para indicar tratamiento quirúrgico a la paciente.

En en futuro próximo, estas tinciones deberían implementarse en los protocolos de manejo de las lesiones premalignas de cuello uterino, probablemente no solo para casos de Nic 2, sino también para casos de Nic 1 y Nic 3, pudiendo recibir tratamiento quirúrgico algunas pacientes con diagnostico histológico de Nic 1 y otras pacientes con diagnostico histológico de Nic 3 podrian ser observadas, ejerciendo medicina de presicion.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### V.1 CONCLUSIONES

Las pacientes cuyas biopsias fueron estudiadas en este trabajo, presentan características sociodemográficas similares a las de estudios previos en otros países.

Las tinciones de inmunohistoquímica p16 y Ki67, son de gran utilidad en la evaluación de las pacientes con diagnóstico histológico de NIC-2.

Las pacientes con tinciones de inmunohistoquímica negativas para uno o ambos marcadores (40%) no necesitan ser sometidas a tratamiento quirúrgico, pueden manejarse con observación como un NIC 1.

Un 60% de mujeres que si tienen riesgo de progresión a cancer (p16 y Ki67 positivos) requieren manejo quirúrgico.

La tasa de falsos positivos con esta combinación de tinciones de inmunohistoquímica es baja.

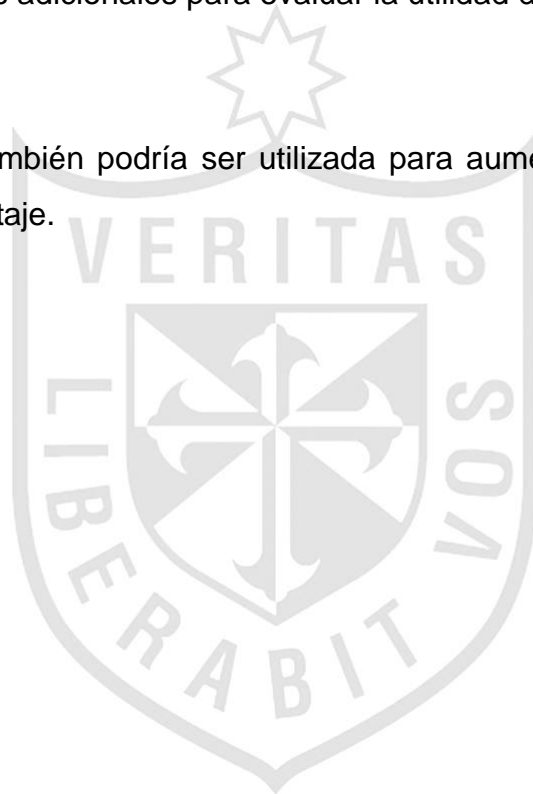
## V.2 RECOMENDACIONES

El uso de p16 y Ki 67, deben realizarse de rutina en todos los casos de NIC-2 diagnosticados histologicamente.

Solo las pacientes con p16 y Ki67 positivos deben ser sometidas a tratamiento quirúrgico.

Se requieren estudios adicionales para evaluar la utilidad del p16 y Ki67, en casos de NIC-1 o NIC-3.

Esta doble tinción también podría ser utilizada para aumentar la sensibilidad en programas de despistaje.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Cancer Fact Sheets: Cervical Cancer. Estimated incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. 2012
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2011; 62(2):69-90
3. Centro de Investigación Maes Heller, Instituto de Enfermedades Neoplásicas. Registro de Cáncer en Lima Metropolitana. 2005
4. Organización Panamericana de la Salud. Directrices de la OMS sobre detección y tratamiento de lesiones precancerosas para la prevención del cáncer cervicouterino. 2014,1(1)1-42
5. Norma Técnico-Oncológica para la prevención, detección y manejo de las lesiones premalignas del cuello uterino a nivel nacional. Perú. 2008;1(121):1-49
6. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Arch Pathol Lab Med. 2012;136(10):1266-97
7. Comino R, Hernández JJ, Sánchez A, Ordi J. Valor de p16 en el cribado y diagnóstico de las lesiones del cérvix uterino. 2013
8. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. Adv Anat Pathol. 2006; 13(1):8-15
9. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Arch Pathol Lab Med. 2012: 136(1):1266-1297
10. Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, Butera D, Palmieri EA, Bulletti S, et al. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women

within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol.* 2012; 56 (5):506-14

11. Nishio S, Fujii T, Nishio H, Kameyama K, Saito M, Iwata T, et al. p16INK4a immunohistochemistry is a promising biomarker to predict the outcome of low grade cervical intraepithelial neoplasia: comparison study with HPV genotyping. *J Gynecol Oncol.* 2013; 24(3):215-221
12. Byun SW, Lee A, Kim S, Choi YJ, Lee YS, Park Js. Immunostaining of p16INK4a/Ki-67 and L1 Capsid Protein on Liquid-based Cytology Specimens Obtained from ASC-H and LSIL-H Cases. *International Journal of Medical Sciences.* 2013; 10(12):1602-1607
13. Zappacosta R, Colasante A, Viola P, D'Antuono T, Lattanzio G, Capanna S, et al. Chromogenic In Situ Hybridization and p16/Ki67 Dual Staining on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cervical Specimens: Correlation with HPV-DNA Test, E6/E7 mRNA Test, and Potential Clinical Applications. *BioMed Research International.* 2013; 1(1):1 -11
14. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. 2013;105(1):1550-1557
15. Yoo SH, Son EM, Sung CO, Kim KR. Primary Squamous Cell Carcinoma of the Upper Genital Tract: Utility of p16INK4a Expression and HPV DNA Status in its Differential Diagnosis from Extended Cervical Squamous Cell Carcinoma. *The Korean Journal of Pathology.* 2013; 47(6): 549-556
16. Stanculescu R, Bratila E, Bausic V, Vladescu T. The triage of low-grade cytological abnormalities by the immunocytological expression of cyclindependent kinase inhibitor p16INK4a versus Human Papillomavirus test: a real possibility to predict cervical intraepithelial neoplasia CIN2 or CIN2+. *Rom J Morphol Embryol.* 2013; 54(4):1061–1065
17. Wu J, Li XJ, Zhu W, Liu XP. Detection and pathological value of papillomavirus DNA and p16INK4A and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *ONCOLOGY LETTERS.* 2014;7(1): 738-744
18. Krishnappa P, Mohamad IB, Lin YJ, Barua A. Expression of P16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagnostic Pathology.* 2014; 19(1):1-6

19. Uijterwaal MH, Witte BI, Van Kemenade FJ, Rijkaart D, Ridder R, Berkhof J, et al. Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. *British Journal of Cancer*. 2014; 110(1): 1579–1586
20. Pauck A, Lener B, Hoell M, Kaiser A, Kaufmann A, Zwerschke W, et al. Depletion of the cdk Inhibitor p16INK4a Differentially Affects Proliferation of Established Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Virology*. 2014;88 (10): 5256-5262
21. Tota JE, Ramana–Kumar AV, El-Khatib Z, Franco EL. The road ahead for cervical cancer prevention and control. *Curr Oncol*. 2010; 21 (1720): e255-264
22. Bountris P, Haritou M, Pouliakis A, Margari N, Kyrgiou M, Spathis A, et al. An Intelligent Clinical Decision Support System for Patient-Specific Predictions to Improve Cervical Intraepithelial Neoplasia Detection. *BioMed Research International*. 2014;1(1):1-20
23. Razmpoosh M, Sansregret A, Oligny LL, Patey N, Dormoy-Raclet V, Ducruet T, et al. Assessment of Correlation Between p16INK4a Staining, Specific Subtype of Human Papillomavirus, and Progression of LSIL/CIN1 Lesions. First Comparative Study. *Am J Clin Pathol*. 2014; 142:104-110
24. Calil LN, Edelweiss MI, Meurer L, Igansi CN, Bozzetti MC. p16 INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract*. 2014; 210(8):482-7
25. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP, Jeronimo J, et al. p16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: A prospective study in China. *Int. J. Cancer*. 2014; 134(1): 1715–1724
26. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, Doeberitz MV, Arbyn M. p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(6):767-72
27. Zhong P, Li J, Gu Y, Liu Y, Wang A, Sun Y, et al. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict

- persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(3):2979-86
28. Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. p16 Immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol.* 2015; 34(2):180-6
29. Wang R, Li X, Qian M, Niu J, You Z. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia I and the clinical significance of p16(INK4a) protein as a marker of progression in cervical intraepithelial neoplasia I. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2015; 50(3):210-215.
30. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16INK4a immunochemistry in cervical histopathology and cytology: An update of recent developments. *Int. J. Cancer.* 2015; 136(1): 2741–2751
31. Griffin H, Soneji Y, Van Baars R, Arora R, Jenkins D, van de Sandt M, et al. Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM. *Mod Pathol.* 2015; 28(7):977-93
32. Den Boon JA, Pyeond D, Wange S, Horswill M, Schiffman M, Sherman M, et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. 2015;1(1):e3255-3264
33. Tabrizi SN, Tan SE, Von Knebel DC, Tan J, Quinn MA, Garland SM. Evaluation of p16INK4a immunostaining for the detection of high-grade changes in cervical cytology. *Pathology.* 2015;47(4):314-9
34. Coordes A, Lenz K, Qian X, Lenarz M, Kaufmann AM, Albers AE. Meta-analysis of survival in patients with HNSCC discriminates risk depending on combined HPV and p16 status. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015;1(405):1-12
35. Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad E, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLOS ONE.* 2015;1(10):1-10

36. Ngugi CW, Schmidt D, Wanyoro K, Boga H, Wanzala P, Muigai A, et al. p16INK4a/Ki-67 dual stain cytology for cervical cancer screening in Thika district, Kenya. *Infectious Agents and Cancer*. 2015; 10(1):1-6
37. Ramirez N, Guerra F, Camporeale G, Quintana S, Diaz L, Cuneo N, et al. Expressions of E2 and E7-HPV16 proteins in pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Biotech Histochem*. 2015; 19(1):1-8
38. Lee H, Lee EJ. HPV infection and p16 promoter methylation as predictors of ASC-US/LSIL progression. *Cancer Cytopathol*. 2015;1(1):1-8
39. Kobalka PJ, Abboud JP, Liao X, Jones K, Lee BW, Korn BS, et al. p16INK4A expression is frequently increased in periorbital and ocular squamous lesions. *Diagnostic PaFthology*. 2015; 10(1):1-7
40. Li Y, Xiao S, Dan L, Xue . P16INK4A is required for cisplatin resistance in cervical carcinoma SiHa cells. *ONCOLOGY LETTERS*. 2015; 9(1): 1104-1108
41. Montgomery ND, Parker JS, Eberhard DA, Patel NM, Weck KE, Sharpless NE, et al. Identification of Human Papillomavirus Infection in Cancer Tissue by Targeted Next-generation Sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;1(1)1-6
42. Benczik M, Galamb Á, Koiss R, Kovács A, Járay B, Székely T, et al. Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res*. 2015;1(1):1-10
43. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(12):1-6
44. Sellors JW, Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes. 2003
45. Torres FJ, Alameda F, Ordi J, Costa I. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico y en el manejo de las lesiones del cuello uterino. *Rev Esp Patol*. 2012; 45(2):86-95
46. Azúa-Romero J. El papel modulador de p16<sup>ink4a</sup> en la infección por el virus del papiloma humano. *Rev Clin Esp*. 2005; 205(5): 248-51



47. Torres Gómez FJ, Torres Olivera FJ, Ortega V, Puerta R. Tinción dual p16·ki67. Un paso más en cuanto a la especificidad de citologías ginecológicas. Prog Obstet Ginecol. 2012; 55(10):518-519



## ANEXOS

### Anexo 1

#### Ficha de recolección de datos

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS			
<b>NÚMERO DE CASO</b>			
<b>EDAD (AÑOS)</b>			
<b>PROCEDENCIA</b>	(1) COSTA		
	(2) SIERRA		
	(3) SELVA		
<b>ESTADO CIVIL</b>	(1) SOLTERA		
	(2) CASADA		
	(3) VIUDA		
	(4) DIVORCIADA		
	(5) CONVIVIENTE		
<b>PARIDAD</b>	<b>N° NACIDOS VIVOS</b>		
<b>HALLAZGOS LABORATORIALES</b>	<b>p16</b>	(1) POS	(2) NEG
	<b>Ki67</b>	(1) ALTO	(2) BAJO