



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.
SERVICIO DE PATOLOGÍA

**ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA CON
ANTICUERPO MONOCLONAL PARA p16^{INK4}
EN LESIONES INTRAEPITELIALES DE BAJO
Y ALTO GRADO EN CITOLOGÍA CERVICAL**

TÉSIS DE POSGRADO PARA OBTENER
EL TÍTULO EN LA ESPECIALIDAD DE
ANATOMÍA PATOLÓGICA QUE PRESENTA:
DRA. ÁNGELA DAYANA WILLIAMS JACQUEZ



MÉXICO, D.F.

ENERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JUAN SORIANO ROSAS
TUTOR DE TESIS
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

DR. AVISSAI ALCÁNTARA VÁZQUEZ
JEFE DEL SERVICIO DE PATOLOGÍA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

ÍNDICE.

• Abreviaturas.	iv
• Índice de tablas.	v
• Índice de figuras.	vi
• Antecedentes.	1
• Justificación y planteamiento del problema.	5
• Objetivos.	6
• Material y métodos.	7
• Definición operacional de las variables.	8
• Descripción del estudio.	10
• Análisis estadístico.	12
• Consideraciones éticas.	13
• Resultados.	14
• Discusión.	18
• Bibliografía.	21

ABREVIATURAS:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASC	Células epiteliales atípicas (por sus siglas en inglés)
ASC-US	Células epiteliales atípicas de significado incierto que favorecen a una lesión de bajo grado (por sus siglas en inglés)
CC	Cáncer cervicouterino
LIEAG	Lesión intraepitelial de alto grado
LIEBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NICAG	Neoplasia intraepitelial cervical de alto grado
NICBG	Neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado
NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
pRB	Proteína del gen del retinoblastoma
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Correlación diagnóstica de la citología cervical convencional con la biopsia cervical	14
Tabla 2. Intensidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16 ^{INK4a} en la citología cervical convencional.	16
Tabla 3. Correlación de la intensidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16 ^{INK4a} con el diagnóstico histopatológico	17

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.

15

Intensidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en la citología cervical convencional, la cual se correlaciona con la severidad de la lesión. a. LIEBG intensidad (-). b. LIEAG (+). c. LIEAG (++) . d. LIEAG (+++).

ANTECEDENTES.

El cáncer cervicouterino (CC) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en las mujeres mexicanas, con una tasa de mortalidad de 14.49 por 100,000 mujeres de 25 años y más(1). La evidencia epidemiológica y molecular claramente indican que ciertos tipos del virus del papiloma humano (VPH) son la causa principal de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y del CC invasor(2). Sin embargo, el 80% de las mujeres con un resultado positivo para HPV no desarrollan NIC ni CC(3).

En México, se ha calculado que la proporción de mujeres sanas portadoras del VPH es del 15 al 40% en los grupos de edad joven, sexualmente activos, siendo del 3 al 10% en los grupos de personas de 35 años y más (4).

En mayo de 2007, se realizaron algunas modificaciones en la Norma Oficial Mexicana para la prevención diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia epidemiológica del cáncer cervical (NOM-014 SSA2-1994) (4). Una de las mayores incluyó el uso del sistema Bethesda para informar los resultados de la citología cervical. Así las lesiones del epitelio escamoso ahora se informan como: Lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG; que incluye displasia leve e infección del virus de papiloma humano); lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG; que incluye displasia moderada, grave y carcinoma insitu); así como una categoría más llamada ASC (células epiteliales atípicas por sus siglas en inglés) misma que se encuentra dividida en dos ASC-US que son células epiteliales atípicas de significado incierto que favorecen a una lesión de bajo grado, y ASC-H células epiteliales atípicas de significado incierto que favorecen una lesión de alto grado.

El virus del papiloma humano (VPH) se caracteriza por tener un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud, con un virión no envuelto que mide 45 a 55 nm. de diámetro y una cápside proteica icosaédrica (3).

Los virus con afinidad por las mucosas se clasifican según su riesgo de progresión a cáncer, los tipos 6 y 11 son virus de bajo

riesgo, los tipos 16 y 18 son de alto riesgo, estos cuatro tipos corresponden al 75% de los VPH asociados con neoplasia anogenital. Los VPH de bajo riesgo o no oncogénicos son los tipos 6, 11, 42, 43 y 44, los cuales se relacionan principalmente con el condiloma acuminado y la LIEBG; sólo rara vez se asocian con una LIEAG o un carcinoma invasor. En contraste, los VPH de alto riesgo u oncogénicos se encuentran en todo el espectro de las lesiones intraepiteliales e invasoras, tanto del epitelio plano estratificado como del glandular; los cuales son 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58, 67 y 68. El VPH-16 aparece más relacionado con lesiones del epitelio plano estratificado y los tipos 31, 33, 35, 52, 58 y 67 se relacionan estrechamente con él. El VPH-18 es el tipo más frecuente en las neoplasias glandulares, y los tipos 39, 45, 59 y 68 se comportan de manera similar a éste (4).

Se ha comprobado que más de 90% de los carcinomas cervicouterinos contienen ADN del VPH, correspondiendo al tipo 16 la mayor prevalencia al encontrarse aproximadamente en la mitad de los casos, seguido por el tipo 18, involucrado en 12% de los mismos (4).

Se considera que los responsables de la pérdida del control de la proliferación celular son los genes virales transformantes E6/E7, la expresión de éstos genes se observa usualmente en los tipos virales de alto riesgo como 16 y 18, mientras que no se detecta en los tipos 6 y 11 de bajo riesgo. La oncoproteína E6 del VPH-16 se une a p53 y dicha unión provoca que se degrade; esta proteína es un importante represor o controlador del crecimiento y la diferenciación celular, en parte por estimulación de p21 y p16^{INK4a}. La proteína E7 impide la regulación del crecimiento celular mediante una unión competitiva con la ciclina A1 y el gen del retinoblastoma, quienes regulan la progresión de las células desde la fase G1 a la fase S, causando una importante pérdida de control sobre la multiplicación celular y dando como resultado una proliferación no controlada (4).

p16^{INK4a} es un inhibidor cinasa dependiente de ciclina que desacelera el ciclo celular mediante la inactivación de las cinasas, involucradas en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) (5). El incremento en la expresión de los oncogenes virales en células displásicas cervicales, puede ser reflejado por un aumento en la expresión de p16^{INK4a} (6). Se sugiere que la sobreexpresión de la proteína p16^{INK4a} indica infección e integración genómica de VPH de

alto riesgo y predice la progresión a lesiones intraepiteliales de alto grado y a carcinoma (7).

p16^{INK4a} ha surgido como un marcador útil de infección por papilomavirus de alto grado, numerosos estudios apoyan el uso de p16^{INK4a} mediante técnicas de inmunohistoquímica para la detección de displasia de alto grado (8).

La reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} es positiva difusa (no focal) en cortes histológicos de muestras cervicales sin displasia; indica la presencia de VPH de alto riesgo. En muestras cervicales con displasia, esta reacción es positiva en la mayor parte de las neoplasias intraepiteliales de alto grado y en algunos casos de bajo grado, especialmente aquellas asociadas a VPH de alto riesgo. La mayor parte de los carcinomas epidermoide, glandulares y de células pequeñas son positivos a la reacción para p16^{INK4a}. En lesiones glandulares cervicales, el estudio de inmunohistoquímica es útil en la distinción entre adenocarcinoma in situ (positivo difuso) y lesiones benignas; entre las que se incluyen metaplasia tuboendometrial y endometriosis, que son negativas o positivas en forma focal. El anticuerpo contra p16^{INK4a} puede ser usando como parte del panel del diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma cervical (positividad difusa) y el adenocarcinoma endometrial tipo endometrioide (negativo o con positividad focal). En vulva la reacción para p16^{INK4a} es positivo en neoplasias intraepitelial vulvar (NIV) asociada a VPH y negativo en NIV no asociada a VPH (9).

En el departamento de microbiología de la Facultad de Medicina de Tailandia, se realizó un estudio para determinar la positividad por inmunohistoquímica para p16^{INK4a} y su relación con la infección por el VPH en citología convencional y líquida; la determinación viral se realizó con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se revisaron 165 casos, a los que se les realizó detección de DNA para VPH. En citología convencional, la positividad a la reacción para p16^{INK4a} se presentó en 0% de los casos sin lesión (0/30), 52.5% en los casos diagnosticados como ASCUS (21/40), 54.3% en los casos de LIEBG (19/35) y en el 100% de las LIEAG (30/30) y los carcinomas epidermoides (30/39). En citología líquida, los resultados fueron comparables pero menos sensibles. Se detectó positividad para VPH, en el 10% de los casos sin lesión, en el 45% de los ASCUS, en el

57.14% de las LIEBG, en el 70% de las LIEAG y en el 86.7% de los carcinomas epidermoides (6). Este estudio sugiere que la determinación mediante técnicas de inmunohistoquímica para p16^{INK4a} en citología convencional es útil y costo efectiva como método para determinar carcinoma cervical mediante la detección de células displásicas infectadas con VPH de alto riesgo.

Klaes, Friedrich y colaboradores, de la Universidad de Heidelberg, observaron sobreexpresión de p16^{INK4a} por inmunohistoquímica en todas las NIC 1 asociadas a VPH de bajo riesgo y en todas NIC 2 y 3. En contraste a esto no se detectó expresión de p16^{INK4a} en epitelio cervical normal, lesiones inflamatorias y lesiones cervicales de bajo grado asociadas a VPH de bajo riesgo. Por lo que concluyeron que p16^{INK4a} es un marcador específico para identificar epitelio cervical displásico tanto en biopsias cervicales como en citología convencional (6).

La Sociedad Americana de Patología Clínica de Chicago Illinois, realizó un estudio comparativo entre la sensibilidad e especificidad de la reacción de inmunohistoquímica para p16^{INK4a} y la captura de híbridos para detectar la presencia de VPH de alto riesgo. Se estudiaron 100 casos con diagnóstico negativo para lesiones intraepiteliales, 100 casos diagnosticados como ASCUS, 100 casos como LIEBG, y 100 de alto grado. La reacción para P16^{INK4a} fue positivo en 78% de las LIEAG, en 42% de las LIEBG y 36% de los ASCUS, mientras que mediante captura de híbrida el 92% fue positivo en LIEAG; 81% en LIEBG y 45% en ASCUS (7). La sensibilidad para lesiones de alto grado fue de 92% para la captura híbridos y 78% para p16^{INK4a}. La especificidad para éstas lesiones fue de 25% para captura de híbridos y de 56% para p16^{INK4a}. Se encontró que la determinación de VPH mediante captura híbrida presentó mayor sensibilidad y p16^{INK4a} presentó mayor especificidad(7).

Queiroz y Silva refieren que p16^{INK4a} puede ser usado para identificar células infectadas por VPH, en lesiones preneoplásicas y en carcinomas y reconocer aquellas lesiones con un riesgo aumentado de progresión a lesiones de alto grado (10).

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La sensibilidad de la prueba de Papanicolaou es del 50% con rangos del 37 al 84% y la especificidad es del 98% con rangos del 86-100%, dependiendo del trabajo publicado (11).

p16^{INK4a} es un marcador de las lesiones cervicales inducidas por el VPH de alto grado y de la posible evolución de dichas lesiones (12). Con técnica de inmunohistoquímica es positivo en 92.3% de las LIEAG y el 15.4% de las LIEBG, sin ser detectado en tejidos normales. La sensibilidad de dicha prueba para las lesiones de alto grado es del 100%, la especificidad es del 70.2%, el valor predictivo positivo es del 43.3% y el valor predictivo negativo es del 100%.

La expresión de p16^{INK4a} en lesiones neoplásicas y pre neoplásicas puede ser utilizado para identificar células infectadas con VPH de alto riesgo (12).

La sobreexpresión de p16^{INK4a} ha sido propuesto como biomarcador útil para identificar células epiteliales displásicas en cérvix tanto en cortes histológicos como en citología cervical. La inmunomarcación de p16^{INK4a} puede ser útil para evitar ambigüedades en la interpretación de citologías cervicales y facilitar su diagnóstico (13).

p16^{INK4a} es de utilidad en citologías cervicales para identificar pacientes de alto riesgo que requieran tratamiento temprano (14).

Como herramienta diagnóstica en el laboratorio, p16^{INK4} es útil en biopsias cervicales dirigidas por colposcopio para diagnosticar casos con pruebas citológicas positivas (6).

En el Hospital General de México O. D. se maneja un gran número de pacientes en la Clínica de Displasia. En nuestro medio contamos con publicaciones aisladas sobre la utilidad de la inmunomarcación con p16^{INK4a} (15), lo que nos obligó a buscar estadísticas actuales de la sensibilidad y especificidad de p16^{INK4a} en lesiones de bajo y de alto grado en la citología cervical convencional realizada en nuestro Hospital.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la utilidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en la citología cervical convencional para la interpretación de lesiones intraepiteliales de bajo y de alto grado realizada en el Hospital General de México O.D.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la correlación de la citología cervical convencional con el estudio histopatológico a través de los estadísticos de sensibilidad y especificidad.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de p16^{INK4a} en la citología cervical convencional en lesiones de bajo grado, así como en las de alto grado.
- Describir los valores predictivos positivos y negativos de p16^{INK4a} en la citología convencional para la interpretación de lesiones de bajo y alto grado.

MATERIAL Y METODO.

Diseño del estudio

Se trató de un estudio de validación de prueba diagnóstica, transversal.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Citopatología de la Unidad de Patología del Hospital General de México O.D.

Universo de estudio

Citologías cervicales convencionales de pacientes que acudieron a los Servicios de Colposcopia de Ginecología y de la Clínica de Displasias del Servicio de Oncología del Hospital General de México O. D. recibidas para su interpretación en el Laboratorio de Citopatología.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Citologías cervicales convencionales con el resultado de LIEBG y LIEAG, de buena calidad, fijadas con etanol al 96% y teñidas con Papanicolaou, obtenidas durante el periodo enero 2002 a diciembre 2006 recibidas para su interpretación en el laboratorio de Citopatología con seguimiento histopatológico.

Criterios de exclusión

- Citologías cervical convencionales de baja calidad por inadecuada fijación, mal estado de la laminilla, escaso material y o que hayan sido interpretadas como no satisfactorias.

Criterios de eliminación.

- Citologías cervical convencionales con resultado en la categoría de ASC y que no tengan seguimiento con biopsia.

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES (16).

1. LIEAG (lesión intraepitelial de alto grado, Sistema Bethesda): atipias en células intermedias profundas, parabasales y de metaplasia; presentes de forma aisladas, en lámina, en “fila india” o en agregados seudosinciciales; variación del tamaño y morfología nuclear y área citoplasmática más pequeña; la cromatina puede ser laxa o granular en grumos gruesos, y de distribución uniforme; se puede encontrar nucléolo prominente.
2. LIEBG (lesión intraepitelial de bajo grado, Sistema Bethesda): limitada a células superficiales, presentes de forma aislada o en láminas; hay agrandamiento nuclear que supera el triple del tamaño del área del núcleo de una célula intermedia normal, generando un leve aumento de la relación núcleo:citoplasma; hipercromasia nuclear variable, binucleación o multinucleación, cromatina uniforme y granular, bordes citoplásmicos bien definidos; halos citoplásmicos perinucleares de bordes bien definidos (coilocitos).
3. p16^{INK4a}: proteína producto del gen inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa. La reacción de inmunohistoquímica se considera positiva cuando tiñe densamente el borde de la membrana citoplásmica así como de forma irregular e hipercromática el núcleo.
4. NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical, criterios de la Organización Mundial de la Salud): hiperplasia de células basales que se extiende al tercio inferior del epitelio plano estratificado, el cual está desorganizado con anomalías nucleares y citoplásmicas mínimas, hipercomasia nuclear moderada y escasas mitosis; en los dos tercios superiores hay adecuada maduración pero se suele observar cambios morfológicos por la infección del virus (coilocitos).

5. NIC 2 (neoplasia intraepitelial cervical, criterios de la Organización Mundial de la Salud): la hiperplasia de células basales se extiende de la membrana basal al tercio medio del epitelio plano estratificado; no hay diferenciación morfológica por maduración entre las células parabasales e intermedias profundas; las anormalidades nucleares y citoplásmicas son moderadas al igual que el número de mitosis; suele observarse queratinización en la superficie del epitelio o de forma aislada en células individuales intraepiteliales así como coilocitos.

6. NIC 3 (neoplasia intraepitelial cervical, criterios de la Organización Mundial de la Salud): la proliferación de células atípicas se extiende a todo el espesor del epitelio con desorganización de la arquitectura; las anormalidades nucleares y citoplásmicas son marcadas, con irregularidad del contorno nuclear, cromatina en grumos y pérdida de la relación núcleo:citoplasma; hay numerosas mitosis típicas y atípicas; suele observarse queratinización en la superficie del epitelio o de forma aislada en células individuales intraepiteliales así como coilocitos.

7. Carcinoma epidermoide invasor (criterios de la Organización Mundial de la Salud): lesión neoplasia que involucra el total del espesor del epitelio plano estratificado con pérdida de la continuidad de la membrana basal y presencia de células neoplásicas en lámina o aisladas en el estroma, con abundante infiltrado inflamatorio asociado.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.

Todos los especímenes analizados fueron citologías cervicales convencionales colectadas con espátula y/o citobrush fijadas con etanol al 96%.

Selección e identificación de casos:

Se utilizó el material recibido para su interpretación de los Servicios de Colposcopia de Ginecología y de la Clínica de Displasias del Servicio de Oncología del Hospital General de México O. D. Se seleccionaron las citologías cervicales convencionales de forma no aleatorizada teñidas con Papanicolaou e interpretadas previamente por citopatólogos del Servicio de Citopatología con el sistema Bethesda como lesiones intraepiteliales de bajo y como lesiones intraepiteliales de alto grado y con seguimiento histopatológico. Para confirmar la interpretación, se revisaron de nuevo los extendidos por dos patólogos de forma independiente a ciegas; en caso de discrepancia, se realizó un consenso con un tercer patólogo.

Seguimiento histopatológico:

A todas las pacientes seleccionadas por citologías positivas a lesiones intraepiteliales de alto grado se les realizó en su momento biopsia dirigida por Colposcopia y diagnosticadas por patólogos del Servicio de Patología; los diagnósticos emitidos incluyeron: neoplasia intraepitelial cervical 1, 2, 3 y carcinoma invasor (criterios diagnósticos de la Organización Mundial de la Salud). Los cortes histológicos se obtuvieron del archivo de laminillas.

Reacción de inmunohistoquímica:

La reacción de inmunohistoquímica para p16^{INK4a} se hizo en las mismas laminillas de citología cervical convencional interpretadas con el sistema Bethesda, previa decoloración con alcohol ácido por 20 minutos; posteriormente se fijaron con etanol al 50% por 30 minutos. La tinción de p16^{INK4a} se hizo utilizando el Kit Citológico CINtecTM (Dako Bytomation, Glostrup, Dinamarca). La recuperación antigénica se llevó a cabo por 40 minutos a temperatura de 95-99°C en agua.

Previo bloqueo de la actividad peroxidasa endógena, las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario (E6H4) específico para p16^{INK4a} por dos horas. Para la visualización se utiliza diaminobenzidina como cromógeno seguido de hematoxilina como contrastante.

Interpretación de la inmunomarcación de p16^{INK4a}:

Se considero como negativa si menos de tres células displásicas por laminilla presentaban tinción nuclear y/o citoplásmica con diaminobenzidina y positiva en incremento (+, ++ y +++) dependiendo de la intensidad de la tinción nuclear y/o citoplásmica. La interpretación se realizó por dos patólogos de forma independiente a ciegas; en caso de discrepancia, se realizó un consenso con un tercer patólogo.

Se hicieron archivos digitales con las imágenes citológicas de las células problema para posteriormente desteñirlas y realizar la reacción de inmunohistoquímica para p16^{INK4a} en ellas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizaron tablas de contingencia con datos de frecuencia y proporciones en porcentajes y posteriormente se evaluó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou vs. biopsia cervical y de la citología cervical convencional con reacción de inmunohistoquímica para p16^{INK4a} vs. biopsia cervical.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Dado que se trató de un estudio de validación de prueba diagnóstica sobre laminillas de citología cervical convencional y de cortes histológicos de biopsias cervicales, y no se realizaron intervenciones clínicas (la biopsia fueron parte del protocolo de estudio en su momento de las pacientes) se considera un estudio con riesgo menor al mínimo (17).

RESULTADOS.

El total de registros citopatológicos con el resultado de lesión intraepitelial de bajo grado y lesión intraepitelial de alto grado en el periodo comprendido enero 2002 a diciembre 2006 recibidas para su interpretación en el laboratorio de Citopatología fue de 29 casos, todos con estudio histopatológico de seguimiento. Once casos (38%) se interpretaron como LIEBG y 18 (62%) como LIEAG. El rango de edad de las pacientes fue de 21 a 67 años, con una media de de 47.5 años (± 13.2 años). No se obtuvieron más datos clínicos.

Del grupo de casos interpretados como LIEBG por citología cervical convencional, 7 (63.6%) se diagnosticaron como NIC1 y 4 (36.4%) como NIC 3, mientras que del grupo de LIEAG, 4 (22.2%) como NIC1, 1 (5.6%) como NIC2, 9 (50%) como NIC3 y 3 (16.7%) como carcinoma cervicouterino invasor. En uno (5.6%) de los casos, el diagnóstico fue descriptivo como lesión de alto grado sin poder descartar invasión, ya que la muestra era muy pequeña y se encontraba fragmentada para poder descartar invasión; éste fue considerado como NIC 3 (Tabla 1).

Tabla 1. Correlación diagnóstica de la citología cervical convencional con la biopsia cervical.

Interpretación citológica	Diagnóstico histopatológico				Total
	NIC1	NIC2	NIC3	C. Invasor	
LIEBG	63.6 (7)	0	28.6 (4)	0	11
LIEAG	36.4 (4)	100 (1)	71.4 (10*)	100 (3)	19
	11	1	14	3	29

Los datos se presentan como número de casos (porcentaje).

C. Invasor: carcinoma invasor.

*Un diagnóstico descriptivo.

Para poder establecer la validez de la citología cervical convencional como prueba diagnóstica, se agrupó la neoplasia intraepitelial cervical 2 y 3 en neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (NICAG) y la neoplasia intraepitelial cervical 1 como neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NICBG).

La sensibilidad de la citología convencional para interpretar LIEAG en este estudio fue de 0.733 (IC 95% 0.475-0.893) y la especificidad de 0.636 (IC 95% 0.352-0.848), con un valor predictivo positivo de 0.733 (IC 95% 0.510-0.957) y un valor predictivo negativo de 0.636 (IC 95% 0.352-0.921).

Los resultados de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en la citología cervical convencional se muestran en la tabla 2. De los 29 casos, 11 (37.9%) presentaron una reacción intensa, 7 (24.1%) presentaron una reacción moderada y 4 (13.8%) presentaron una reacción débil; en 7 (24.1%) casos no se observó reacción. Se encontró una correlación de la intensidad de la inmunorreacción con la severidad de las lesiones: el 54.5% de las LIEBG tuvieron una intensidad de + o menos, mientras que el 72.2% de las LIEAG una intensidad de ++ o más (figura 1).

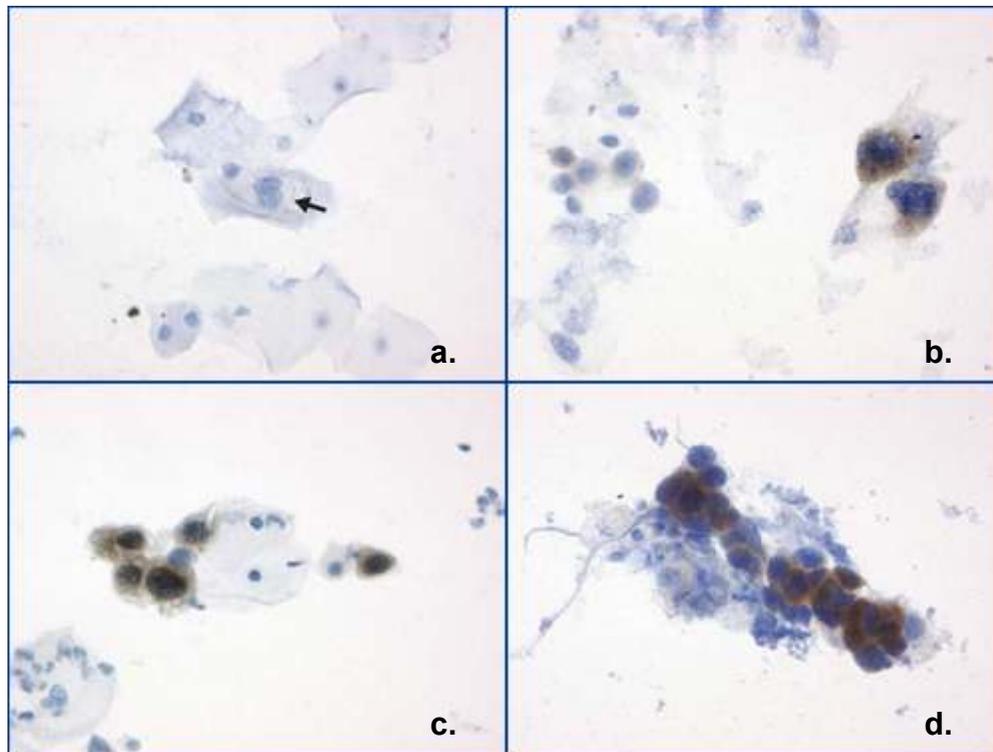


Fig. 1. Intensidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en la citología cervical convencional, la cual se correlaciona con la severidad de la lesión. a. LIEBG intensidad (-). b. LIEAG (+). c. LIEAG (++). d. LIEAG (+++).

Tabla 2. Intensidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en la citología cervical convencional.

Intensidad de la reacción.	Interpretación citológica		Total
	LIEBG	LIEAG	
-	36.3 (4)	16.7 (3)	7
+	18.2 (2)	11.1 (2)	4
++	18.2 (2)	27.8 (5)	7
+++	27.3 (3)	44.4 (8)	11
	11	18	29

Los datos se presentan como número de casos (porcentaje).

Para poder determinar la validez de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} como prueba diagnóstica, se comparó el diagnóstico del estudio histopatológico con la intensidad de la reacción de inmunohistoquímica (tabla 3). Siete casos (63.6%) diagnosticados como NIC1 no presentaron inmunoreacción, mientras que ninguna de las NIC2 o más fueron negativas; por el contrario sólo uno (9.1%) de los casos diagnosticados como NIC1 tuvo una positividad de +++ y 12 (85.7%) de los casos diagnosticados como NIC3 tuvieron una positividad de ++ ó más nuclear y citoplásmica. Con lo que se observó una correlación estadísticamente significativa entre la severidad de la lesión y la inmunoreacción (valor de p de 0.011): la intensidad de la reacción para p16^{INK4a} aumentó con el grado de la lesión intraepitelial en la interpretación citología convencional con el diagnóstico corroborado por estudio histopatológico. Los 3 (100%) casos de carcinoma invasor tuvieron una positividad de +++.

Para calcular la sensibilidad y especificidad del estudio de inmunohistoquímica para interpretar LIEAG, se consideró que las NICBG negativas a la inmunoreacción eran los verdaderos negativos, mientras que las NICAG positivas ++ ó +++ eran los verdaderos positivos.

La sensibilidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en la citología cervical convencional para interpretar LIEAG en este estudio, fue de 0.857 (IC 95% 0.586-0.970) y la especificidad de 0.636 (IC 95% 0.352-0.848),

con un valor predictivo positivo de 0.750 (IC 95% 0.538-0.962) y un valor predictivo negativo de 0.778 (IC 95% 0.506-1.00).

Tabla 3. Correlación de la intensidad de la reacción de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} con el diagnóstico histopatológico.

Intensidad de la reacción	Diagnóstico histopatológico			C. Invasor	Total
	NIC1	NIC2	NIC3		
-	63.6 (7)	0	0	0	7
+	18.2 (2)	0	14.3 (2)		4
++	9.1 (1)	100.0 (1)	35.7 (5)		7
+++	9.1 (1)		50.0 (7*)	3	11
	11	1	14	3	29

Los datos se presentan como número de casos (porcentaje).

C. Invasor: carcinoma invasor.

*Un diagnóstico descriptivo.

DISCUSIÓN.

Una buena prueba diagnóstica es la que ofrece resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. El análisis de su validez puede obtenerse calculando los valores de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos.

Resulta obvio que lo ideal sería trabajar con pruebas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, pero esto no siempre es posible. En general, las pruebas de *screening* deben ser de alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos. Por otra parte, la especificidad se refiere, como se señaló previamente, a la probabilidad de que un sujeto sano sea clasificado adecuadamente. En general, las pruebas confirmatorias del diagnóstico deben ser de alta especificidad, para evitar falsos positivos.

El valor predictivo positivo es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo negativo es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano.

La implementación de la prueba de Papanicolaou en los 60s y su uso como una herramienta diagnóstica en la pesquisa del cáncer cervicouterino, trajo una revolución en el manejo clínico de esta enfermedad. Desde entonces la calidad y la confiabilidad de la prueba se han ido mejorando. Dado que el método convencional tiene una limitada sensibilidad, se ha obligado a establecer intervalos de confianza más estrechos en la interpretación de lesiones invasivas, ya que la citología cervical carece de parámetros objetivos, resultando en una amplia variabilidad interobservador que puede causar incertidumbre en el manejo clínico de las pacientes. Este es un problema particularmente entre los límites normal y anormal, donde los reportes de ASCUS o NIC1 requieren de un seguimiento continuo.

Nuevas técnica en el estudio del VPH están aguardando su implementación en el proceso de diagnóstico de la lesiones preneoplásicas y su posible papel en los programas de prevención de cáncer cervicouterino.

La presencia o ausencia del VPH de alto riesgo en la citología cervical puede proporcionar una base para decidir si la lesión observada tiene un potencial preneoplásico o no, si a la paciente se le ofrecerá o no seguimiento ginecológico o continuará en el programa básico de pesquisa. La acumulación de p16^{INK4a} en el núcleo de las células epidermoides indica la pérdida de la función de la proteína del gen del Rb en estas células junto con la expresión del gen E7 de un VPH oncogénico. Esta información puede sustituir el análisis del ADN viral, el cual es más costoso. Se ha reportado (18) que un cuarto de las lesiones de alto grado diagnosticadas por biopsia carecen completamente de reactividad a p16^{INK4a}. Estos representan casos citológicos falsos negativos por ausencia de células diagnósticas en la muestra. Con el estudio de inmunohistoquímica se puede observar la acumulación de p16^{INK4a} en células de la misma citología cervical convencional que han mostrado cambios morfológicos. Esto significa que podemos disminuir los errores asociados a la repetición de la muestra y una posible herramienta para mejorar la evaluación de la citología convencional.

En este estudio, la expresión de p16^{INK4a} estuvo ausente en las células normales, con una reacción positiva importante en las células atípicas, en concordancia con reportes previos (5). Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la severidad de la lesión y la inmunorreacción; la intensidad de la reacción para p16^{INK4a} aumentó con el grado de la lesión intraepitelial en la citología convencional. Cuando la inmunorreacción para p16^{INK4a} en las NICAG fue de +, asumimos que las condiciones de conservación y fijación de las células atípicas no fueron adecuadas para la inmunohistoquímica. Por otra parte, se consideró que la reacción negativa de las NICBG fue debido a la regresión de las mismas. Esto se establece teóricamente por la correlación de la inmunorreacción para p16^{INK4a} y la integración del ADN viral. Idealmente, la acumulación de p16^{INK4a} demuestra la transformación oncogénica por los VPH de alto riesgo, sin embargo, la ausencia de la inmunorreacción no excluye una infección con potencial oncogénico a largo plazo.

Un posible uso de la inmunoreacción para p16^{INK4a} en el contexto del diagnóstico de pesquisa del cáncer cervicouterino al encontrar células atípicas en la citología cervical convencional es confirmar el potencial preneoplásico de las lesiones y dejar sólo las negativas a estudios de ADN viral más costosos. Otro posible uso es disminuir los falsos negativos al detectar células positivas para p16^{INK4a}, que con la tinción convencional de Papanicolaou no fueron detectadas.

Se sabe, que la mayoría de las lesiones intraepiteliales de alto grado tendrán una regresión espontánea y es factible que la no expresión de p16^{INK4a} sea más específica para determinar las lesiones sin potencial invasivo. Sin embargo, la sensibilidad de la inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal para p16^{INK4a} en lesiones de alto grado en citología convencional no puede reemplazar las técnicas de biología molecular para demostrar el ADN viral.

En conclusión, la demostración de la acumulación de p16^{INK4a} en el núcleo de las células epidermoides es una manera eficaz de enfatizar la presencia de displasia y esta inmunoreacción se puede aplicar en la citología cervical convencional. Es posible que esta técnica no solo mejore la interpretación de las células preneoplásicas, sino que también distinga las atipias preneoplásicas de las reactivas.

BIBLIOGRAFIA.

1. CONAPO, INEGI 2006.
2. Kahn JA, Lan D, Kahn RS. Sociodemographic Factors Associated With High-Risk Human Papillomavirus Infection. *Obstet Gynecol* 2007;110:87–95.
3. Ault K A. Epidemiology and Nature History of Human Papillomavirus Infectios in the Female Genital Tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006, 1-5.
4. Alonso P, Lazcano E, Hernández M. 2005. Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. 2ª ed Editorial médica Panamericana
5. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nidl I, et al. Overexpression of p16^{INK4a} as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squemous. *Int J Gynecol Cancer*.2006;16(1):347-53.
6. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U. Overexpression of p16^{INK4a} as a specific marker for displastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*.2001;92 (2):276-84.
7. Holladay EB, Logan S, Arnold J, Knesel B, Smith GD. A comparison of the clinical utility of p16^{INK4a} inmunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/neoplasia. *Cancer*.2006;108(6):451-61.
8. Kalof AN, Cooper K. p16^{INK4a} inmunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol*.2006;13 (4): 190-4.
9. ONeill Cj, McCluggage WG. p16^{INK4a} expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2006;13(1):8-15.

10. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, et al. P 16^{INK4a} expresión as a potencial prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(2):77-83.
11. Agency for Health Care Policy and Research (AHCPR). *Evaluation of Cervical Cytology. EvidenceReport/Technology Assessment, No. 5.* Rockville, MD. (1999).
12. Eleuterio J, Giraldo PC, Goncalves AK, Cavalcante DI. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16^{INK4a} and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86 (1):94-8.
13. . Trunk MJ, Dallenbach-HellwegG, Ridder R, Petry KU et al. Morphologic characteristics of p16^{INK4a}-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol.*2004;48(6):771-82.
14. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyioes B et al. Usefulness of combining testing for p16^{INK4a} protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol.* 2006; 103 (1)62-6.
15. Canedo PAM, Alcántara VA, Ortiz HC. Expresión de p16^{INK4a} en biopsias de cérvix uterino. Utilidad en el diagnóstico diferencial entre cervicitis crónica reactiva, neoplasia intraepitelial cervical de bajo y alto grado y carcinoma invasor. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 2006; 51 (2): 49-57.
16. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization: <http://screening.iarc.fr/atlasglossdef>.
17. Comisión Nacional de Bioética: <http://cnb-mexico.salud.gob.mx/>.
18. Noman I, Brismar S, Zhu J et al. p16^{INK4a} immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: Is it feasible for clinical use. *Int J Oncol* 2007; 31:1339-1343.