

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL "DR. DARÍO FERNÁNDEZ FIERRO"

P16 Y KI67 COMO MARCADORES COMPLEMENTARIOS EN EL
DIAGNÓSTICO DE LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE
CUELLO UTERINO Y SU RELACIÓN CON EL SUBTIPO DE
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES MARTÍNEZ RAMÍREZ

CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

N° REGISTRO ISSSTE: 179.2011



MÉXICO, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AUTORIZACIÓN

DR. NOE CARLOS CRUZ ARANDA

Coordinador de Enseñanza e Investigación
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

DRA. MA. ELENA GARCÍA SANTOS

Asesora de tesis y profesora titular del curso de Anatomía Patológica

DRA. NURIA GISPERT CRUELLS

Jefa del servicio de Anatomía Patológica y
profesor adjunto del curso de Anatomía Patológica

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES MARTÍNEZ RAMÍREZ

Investigadora principal y responsable del protocolo de investigación.
Médico residente del tercer año de Anatomía Patológica

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por su apoyo incondicional, sus consejos y su compañía en todo momento, porque esta etapa más en mi vida es también producto del esfuerzo de ella.

A todas aquellas personas que han formado parte de mi: familia, maestros, amigos, compañeros, porque cada persona que pasa en nuestra vida es única, siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros; habrá los que se llevaron mucho, pero no habrá los que no nos dejaron nada.

INVESTIGADORES Y COLABORADORES

DRA. MA ELENA GARCÍA SANTOS

Asesora de tesis y profesora titular del curso de Anatomía Patológica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

T.H. JOSE EDUARDO FARFAN MORALES

Técnico en histopatología e inmunohistoquímica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

T.H. FRANCISCO JAVIER GARCÍA VÁSQUEZ

Técnico en histopatología
Instituto Nacional de Pediatría

DR. SIGFRIDO GERARDO HUERTA ALVARADO

Jefe de la coordinación de Epidemiología
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

DRA. NURIA GISPERT CRUELLS

Jefa del servicio de Anatomía Patológica y profesora adjunta del curso de Anatomía Patológica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

DRA. MARÍA GABRIELA GIL ROMERO

Médico adscrito al servicio de Anatomía Patológica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

DRA. MONICA RACHELLE RODRÍGUEZ FLORES

Médico residente del segundo año de Anatomía Patológica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

DRA. ZAYRA PAMELA SAID GAYOSSO

Médico residente del tercer año de Anatomía Patológica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

DRA. SANDRA YADIRA REYES GÓMEZ

Médico residente del tercer año de Anatomía Patológica
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

H.T. MARÍA GUADALUPE DÁVILA RETANA

Técnico en Histopatología
Hospital General Dr. "Darío Fernández Fierro"

ÍNDICE

I. Marco teórico.....	6
II. Planteamiento del problema.....	28
III. Justificación.....	29
IV. Hipótesis.....	30
V. Objetivos.....	31
VI. Metodología.....	32
VII. Resultados.....	34
VIII. Análisis de resultados.....	46
IX. Conclusiones.....	49
X. Bibliografía.....	51

I. MARCO TEÓRICO

HISTOLOGÍA DEL CUELLO UTERINO NORMAL

El cuello uterino está tapizado por dos tipos de epitelio, el exocervical que es plano estratificado y el endocervical que es cilíndrico mucosecretor. El sitio de unión de ambos epitelios se llama unión escamo-columnar y es muy variable, ya que está relacionada con la edad y depende en gran parte de la acción de las hormonas ováricas; en las mujeres núbiles, el 28% presenta una ubicación endocervical y en el restante 72% ocupa el exocérnix.¹

Epitelio exocervical

El exocérnix está cubierto por epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Su altura está determinada por la producción endógena de hormonas y depende de la edad y de la estimulación hormonal. Durante la vida reproductiva el epitelio es alto y es bien diferenciado, se compone de una capa basal de células con núcleo elongado perpendicular a la membrana basal, una o más capas de células parabasales, una ancha zona de células intermedias con abundante glucógeno citoplasmático y un recubrimiento de células planas superficiales. Durante la niñez y la posmenopausia, debido a la ausencia de estimulación hormonal el epitelio escamoso es bajo, solo contiene algunas capas de pequeñas células epiteliales poco diferenciadas, el escaso citoplasma carece de glucógeno y la estratificación puede ser apenas visible o estar ausente.²

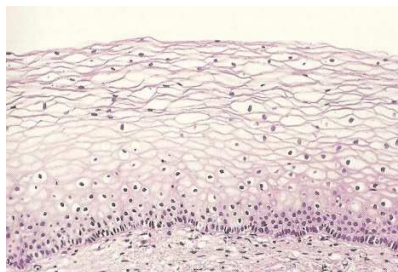


Fig.1 El exocérnix está formado por un epitelio plano estratificado no queratinizado

Las células parabasales tienen un ciclo de recambio de 3 días en comparación con los 30 días que requieren las células basales, con un tiempo promedio de regeneración del epitelio escamoso de 5.7 días, este proceso se puede acortar 30 o 45 horas al administrar estrógenos; mientras que la progesterona inhibe la maduración en las zonas media y alta del epitelio.¹

El proceso fisiológico de la descamación ocurre al exfoliarse células de las capas más superficiales, un factor responsable de la descamación celular es la reducción o desaparición de las proteínas de adhesión celular, siendo la más importante de ellas la E-cadherina que participa en la diferenciación, el soporte y el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos.¹

Estroma. El epitelio exocervical recubre un estroma fibroconectivo rico en vasos capilares y está separado del mismo por una lámina o membrana basal, dicha membrana se compone por lamininas, colágeno IV y V, fibronectina y proteoglicanos y tiene gran importancia en las alteraciones del crecimiento y diferenciación de las células epiteliales.¹

Epitelio Endocervical

El epitelio del canal endocervical es cilíndrico mucosecretor y reviste tanto la superficie como las hendiduras y criptas subyacentes a la mucosa superficial.¹ Una única capa de células epiteliales cilíndricas altas cubre la superficie mucosa y recubre a las glándulas, sus núcleos son pequeños y de localización basal durante la fase proliferativa inicial y el citoplasma es claro con abundante moco sobre todo en la fase proliferativa tardía.²

Debajo del epitelio endocervical a menudo se observa una pequeña capa de células de reserva. Si bien las células de reserva son bipotenciales y en consecuencia pueden producir queratina o mucina, en esencia no son precursoras de las células cilíndricas, las cuales pueden proliferar por sí mismas mediante actividad mitótica.²

Unión escamo-cilíndrica

El punto donde se unen el epitelio escamoso y el epitelio cilíndrico es la unión escamo-cilíndrica. La posición de esta unión es variable debido tanto a la anatomía cervical como a la distribución de las células basales y de reserva subcilíndricas que existen inmediatamente por encima de esta unión. La microanatomía de esta región está gobernada por la progresiva diferenciación de las células de reserva, lo que da lugar a la migración en sentido craneal de la unión escamo-cilíndrica. La porción del epitelio cilíndrico que se ve reemplazada por epitelio escamoso se denomina zona de transformación, la cual es el lugar donde se desarrollan las lesiones precancerosas y los carcinomas escamosos.³

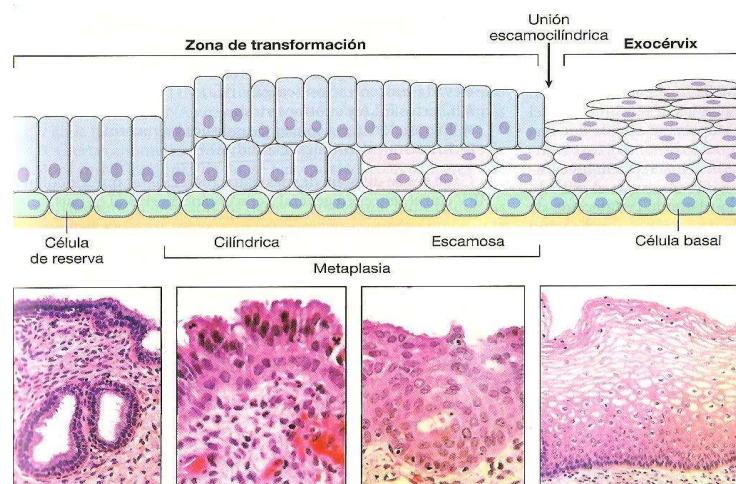


Fig.2 En el diagrama (*superior*), las células de reserva de la zona de hallan en continuidad con las células basales del exocérnix (*derecha*) y pueden sufrir diferenciación cilíndrica y escamosa (metaplasia). Las fotomicrografías en la parte inferior representan (*de izquierda a derecha*) células de reserva quiescentes, células de reserva que sufren metaplasia cilíndrica, células de reserva que sufren metaplasia escamosa y epitelio escamoso exocervical (*derecha*).³

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus de papiloma humano (VPH) se considera el agente causal más importante para el desarrollo de las lesiones escamosas intraepiteliales y carcinoma cervicouterino, por ello, el conocimiento de su biología es fundamental para entender la carcinogénesis cervical.¹

HISTORIA DEL VPH

Los papilomavirus constituyen una familia muy diversa de virus no encapsulados y que se encuentran en la mayoría de especies vertebradas, incluyendo mamíferos, reptiles y aves. Las lesiones verrucosas características de las infecciones cutáneas y mucosas han sido descritas desde tiempos antiguos; sin embargo fueron relacionadas a un agente infeccioso hasta principios de siglo 20 por Ciuffo. La primera identificación de un papilomavirus fue en 1933 en los conejos cola de algodón. En 1956, Koss describió los aspectos morfológicos de las células de las lesiones verrucosas en el cérvix, acuñando el término atipia coilocítica. Sin embargo; pasarían otros 20 años antes de que los investigadores fueran capaces de demostrar que estos cambios morfológicos se asocian a infección por VPH.⁴

La relación entre el VPH y las lesiones premalignas del cuello uterino se estableció en 1976, cuando Meisels y su grupo observaron lesiones planas en la mucosa, con características morfológicas semejantes a las de los condilomas de los genitales externos y la demostración subsiguiente del VPH mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica.⁵

A finales de los 70^s, se caracterizaron los primeros tipos de VPH y en 1981, De Villiers, Gizman y Zur Hausen publicaron la primera clonación del ADN de un VPH. En la siguiente década con el progreso de las técnicas de recombinación de ADN fue posible demostrar el genoma viral del VPH en la mayor parte de las LEI.⁵

TIPOS DE VPH

Los VPH originan una variedad de lesiones proliferativas en la piel y mucosa oral y anogenital. Actualmente han sido clonados más de 100 tipos del VPH y por lo menos 20 de ellos muestran tropismo por el tracto anogenital.^{1,6}

Los virus con afinidad por las mucosas se clasifican según su riesgo de progresión a cáncer: por ejemplo, los tipos 6 y 11 son virus de bajo riesgo, mientras que los tipos 16 y 18 son de alto riesgo; estos cuatro tipos corresponden a dos tercios de los VPH asociados con neoplasias anogenitales. Los virus del papiloma humano de bajo riesgo (VPH-BR) se relacionan principalmente con el condiloma acuminado y las lesiones de bajo grado, en contraste los virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) u oncogénicos se encuentran en todo el espectro de lesiones de alto grado e invasoras. El tipo 16 aparece más asociado con lesiones del epitelio escamoso y el VPH-18 es el tipo más frecuente en las neoplasias glandulares.^{1,7,8}

VPH Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
VPH Bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

La determinación del tipo de VPH permite seleccionar mujeres que tienen riesgo elevado de desarrollar carcinoma cervicouterino o lesiones intraepiteliales escamosas. Principalmente los tipos 16 y 18 se han detectado en más del 99% de lesiones de alto grado y en carcinomas cervicouterinos. Sin embargo, aunque no hay una explicación adecuada al respecto, también existe un 5 a 25% de mujeres con cérvix histológicamente normal y que presentan infección por VPH-AR, de las cuales muy pocas desarrollan lesiones precancerosas y carcinoma invasor.^{8,9}

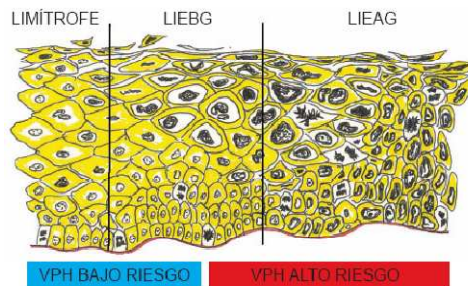


Fig. 3. Esquema que muestra la relación entre la clasificación morfológica y el tipo de VPH.

ESTRUCTURA Y GENOMA DEL VPH

Los papilomavirus se caracterizan por ser virus pequeños, con un virión no envuelto que mide 45-55 nm. de diámetro y una cápside proteica icosaédrica constituida por 72 subunidades o capsómeros. El análisis bioquímico revela que la partícula carece de lípidos y carbohidratos y contiene varias proteínas. La cápside viral está constituida por dos proteínas estructurales diferentes: una proteína principal que da reacción cruzada con todos los VPH, por lo que se considera un antígeno específico de género, y una proteína secundaria que es altamente específica del tipo de VPH y puede ser utilizada para la tipificación inmunohistoquímica.^{1,10}

El VPH cuenta con un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud, contiene 9-10 regiones codificantes que se denominaron marcos de lectura abierta (ORFs, por sus siglas en inglés). Dichas regiones codificantes son segmentos de ADN que contienen secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas no estructurales involucradas en la regulación de las funciones virales y las proteínas estructurales implicadas en la producción de partículas infecciosas. Aquellas que codifican proteínas no estructurales se conocen como genes de expresión temprana o E (early) y las que codifican proteínas estructurales se denominan genes de expresión tardía o L (late) según el tiempo en que son expresados dentro del ciclo de vida viral. Los papilomavirus tienen 7 a 8 genes tempranos y 2 genes tardíos; Además tienen una región no codificante llamada región larga de control o región reguladora principal, la cual contiene las secuencias de regulación en la expresión de todos los genes de las regiones temprana y tardía.^{1,10}

La proteína E1 es importante para el mantenimiento y replicación del genoma viral. E2 participa en la transcripción y replicación del ADN viral, en los tipos de VPH de alto riesgo suprime a E6 y E7. E4 es necesaria para la producción de L2, también rompe las queratinas citoplásmicas causando la condensación de tonofilamentos en la periferia de la célula y el halo perinuclear característicos del coilocito. E5, E6 y E7 participan en la transformación celular. E5 se une a proteínas de membrana del huésped y receptores de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas y es necesaria para la amplificación del genoma viral, también ayuda a prevenir la apoptosis de las células después del daño al ADN y por ultimo facilita la evasión del sistema inmune por células infectadas mediante la alteración de la presentación del antígeno. Las oncoproteínas E6 y E7 estimulan la progresión de ciclo celular induciendo la proliferación de las células basales infectadas para facilitar la replicación del genoma viral.^{4, 11}

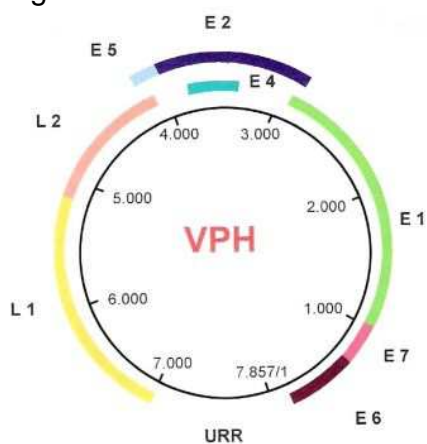


Fig. 4. Genoma del virus del papiloma humano.

Funciones de los genes del VPH		
Gen	Categoría funcional	Función primaria
E1	Replicación	Mantenimiento episomal
E2	Replicación, transcripción	Mantenimiento episomal Supresor de E6 y E7
E4	Replicación, transcripción	Producción de L2, destrucción de filamentos de queratina
E5	Replicación, transcripción, transformación	Estimulación de receptores de factores de crecimiento
E6	Replicación, transformación	Regulación positiva del ciclo celular y telomerasa. Regulación negativa de p53
E7	Replicación, transformación	Regulación positiva del ciclo celular y p21 y p27 Regulación negativa de pRb
L1	Ensamblaje viral	Proteína mayor de cápside
L2	Ensamblaje viral	Proteína menor de cápside

CICLO VITAL DEL VPH Y CARCINOGENESIS CERVICAL

El ciclo de vida de los papilomavirus depende del proceso normal de maduración del epitelio escamoso. El primer paso para la infección por el virus del papiloma humano (IVPH) es el contacto de viriones intactos con las células inmaduras del epitelio escamoso. Todo el epitelio escamoso es susceptible de infección por VPH; sin embargo, la zona más vulnerable es la unión escamo-columnar. No se conoce con exactitud cómo se produce la infección, aunque se piensa que esta inicia en la capa basal y que el virus alcanza estas células a través de defectos en la mucosa superficial (erosiones, cervicitis).⁴

El mecanismo de infección implicaría la unión del virus a la superficie de las células diana, la internalización del virus en la célula, la apertura de la cápside y la liberación de ADN vírico en el núcleo de la célula huésped.⁴

Después de la introducción del virus en el epitelio pueden ocurrir dos clases de infecciones: latentes y productivas.⁴

En la infección de tipo latente el ADN viral permanece en el núcleo en su forma circular libre o episomal gracias a E1, el virus se mantiene en la superficie sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos identificables. Por el contrario, en la infección activa o productiva existe una intensa actividad de replicación del ADN viral con generación de viriones, misma que se lleva a cabo principalmente en las células escamosas diferenciadas, esto es, en las capas intermedia y superficial, con producción de proteínas de cápside y síntesis de gran cantidad de ADN viral que inducen cambios celulares característicos en las células infectadas, los cuales son detectables por citología y por histología.¹ Una vez que el genoma viral se ha integrado al ADN de huésped se fragmentan ciertos genes, entre ellos E4, E5 y E2. El fragmento de E2 es insuficiente para suprimir E6 y E7.⁴

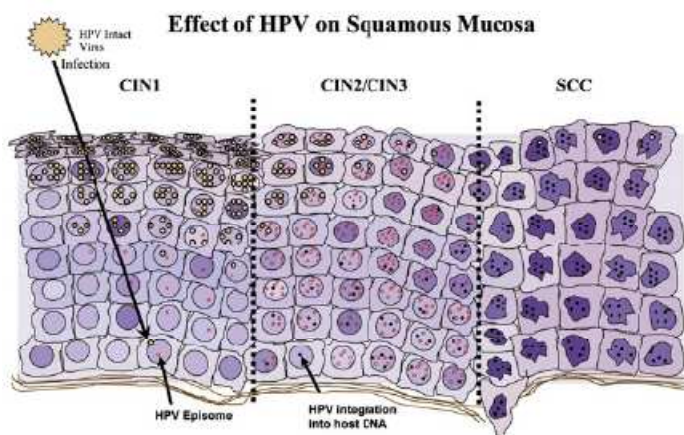


Fig. 5. Efecto del VPH en el epitelio escamoso maduro: CIN 1 se asocia con la forma episomal, ligada a maduración escamosa. La progresión a CIN2/CIN3 y carcinoma invasor es asociada a la integración de ADN en el genoma del huésped.

Proteína E6

E6 es una proteína de 151 aminoácidos que contienen dominios de zinc, durante la infección por VPH juega varios papeles, interfiriendo con varias vías celulares, creando un ambiente favorable para la replicación viral y neutralizando los controles de vigilancia celulares.^{4, 12}

E6 bloquea la apoptosis y promueve la degradación de p53, con la consecuente anulación del control ejercido por p53 sobre el ciclo celular, de manera que la célula no detiene su ciclo celular en respuesta al ADN dañado y tampoco induce apoptosis de las células alteradas, lo que genera inestabilidad genética y permite la acumulación de mutaciones en diversos genes. También inhibe la diferenciación y senescencia celular al estimular la inmortalización, afecta el contacto célula-célula, así como la polaridad celular conduciendo al fenotipo metastásico e invasivo.¹³

De forma similar inactiva otras proteínas proapopticas incluyendo Bax-Bax, de esta manera permite la progresión celular y previene la muerte de las células infectadas.^{4, 12}

La proteína oncosupresora p53 funciona como guardián de la integridad del genoma de la célula huésped, está encargada de que el ciclo celular progrese tras comprobar que el genoma está intacto y ante cualquier daño del ADN se expresara como consecuencia del freno del ciclo celular. Se sabe que p53 es inactivada por la oncoproteína supresora del VPH, E6, la cual se une a p53 y promueve su degradación, por lo que su función se altera durante la infección por VPH AR, sin que se produzca una verdadera mutación del gen. La proteína p53 no se expresa en el epitelio cervical normal, pero si se incrementa con los grados de NIC. Según algunos investigadores, a pesar de que la infección por VPH-AR es la responsable de la sobreexpresión de p53, la expresión de esta proteína no puede considerarse como un factor de valor pronostico.¹⁴

Proteína E7

Es una proteína nuclear de 98 aminoácidos, su extremo amino interacciona con las proteínas blanco, las cuales son importantes reguladoras del ciclo celular, especialmente en la transición G1-S.¹³

La sobreexpresión de E7 en las infecciones por VPH-AR ocasiona degradación de pRb y por lo tanto una sobreexpresión de p16. En tejidos normales, pRb actúa como un regulador negativo de la expresión de p16, cuando E7 inactiva a pRb permite la liberación de E2 y la progresión a través del ciclo celular; sin embargo, la respuesta de la célula huésped es prevenir la entrada a la fase S mediante la regulación y expresión de p16. Aunque existe una sobreexpresión de p16, esta es funcionalmente inactiva como resultado de la degradación de pRb. Las alteraciones en p16/pRb han sido descritas en una gran variedad de cánceres, incluyendo melanoma, glioma, carcinoma de mama, pulmón y próstata.^{4, 12}

Otros genes involucrados

Santin et al., identifico ciertos genes que están alterados en los estadios tempranos del carcinoma cervical, comparado con los queratinocitos normales. De los genes que se sobreexpresan el más importante es el gen 2A inhibidor cinasa dependiente de ciclina, uno de estos productos es la proteína p16. Otro gen sobreexpresado es el B-myb que juega un rol esencial en la progresión del ciclo celular, además contribuye a los efectos carcinogénicos de E7. Prostaglandina E2 sintasa participa en la evasión tumoral mediante la supresión de la inmunidad celular en el huésped. Ciclina B1 y MCMS son otros genes involucrados en el crecimiento y proliferación celular. Los genes de regulación baja son genes supresores tumorales y proteínas involucradas en la homeostasis y apoptosis. Estudios adicionales han identificado genes asociados con la resistencia a la radioterapia, así como genes asociados al potencial metastásico.⁴

La coexpresión de E6 y E7 induce la actividad de la telomerasa, la cual también parece jugar un papel importante en la transformación celular mediada por VPH, la telomerasa facilita la progresión ininterrumpida del ciclo celular.⁴

Por otra parte, es importante interrelacionar los cambios morfológicos que ocurren en el epitelio y que son visibles por microscopía convencional con las alteraciones moleculares que sufren las células infectadas; algunos ejemplos de esto son: crecimiento e hiperchromasia nuclear, como resultado de la síntesis de ADN del huésped mediada por la activación de los genes virales E6 y E7, aclaramiento citoplásmico y los halos perinucleares resultantes de la disrupción de citoqueratinas por expresión de E4.^{1,4}

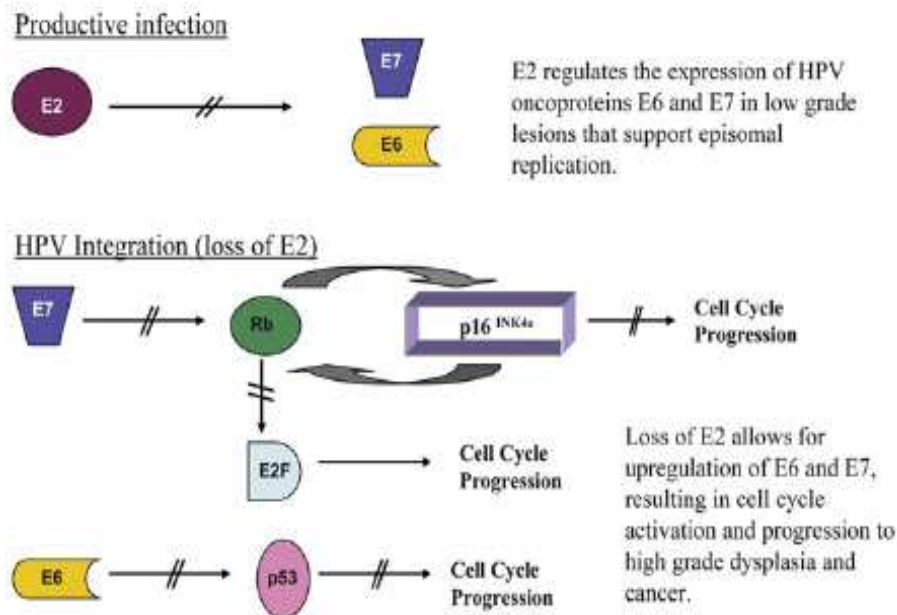


Fig. 6. Función de las proteínas de VPH

LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES

Cuando se afecta el control de la división celular y se pierde gradualmente el control de las funciones básicas, como la diferenciación celular, se produce la transformación neoplásica. Las células retienen su capacidad mitótica, pero no se diferencian adecuadamente conforme ascienden en el epitelio, por lo que dicha proliferación es desordenada.¹³

La historia natural del cáncer cervical implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales llamadas precursoras o premalignas, las cuales son estrictamente intraepiteliales, es decir, se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma.¹³

Histológicamente estas lesiones intraepiteliales se caracterizan por:

- Pérdida de la polaridad
- Ausencia de diferenciación y de maduración
- Alteración en la relación núcleo/citoplasma
- Núcleos hipercromáticos
- Cromatina de distribución anormal
- Mitosis anormales¹³

CLASIFICACION DE LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES

La diversidad de imágenes que muestran las alteraciones premalignas del epitelio escamoso del cuello uterino ha provocado la aparición de por lo menos tres clasificaciones histológicas:¹⁵

- 1) La clasificación de displasias (Reagan, 1953)
- 2) La clasificación de neoplasia intraepitelial cervical o NIC (Richard, 1967)
- 3) La clasificación del sistema Bethesda (1988)¹⁵

En 1953, Reagan introduce el término displasias, que etimológicamente significa "alteración en el desarrollo", y las clasifica en:

Leve, cuando involucra el tercio inferior del epitelio

Moderada, cuando abarca los dos tercios inferiores del epitelio

Severa, cuando afecta la totalidad del espesor del epitelio.¹⁵

En 1961 en el congreso internacional de Viena se definen los términos: Displasia y Carcinoma in situ.¹⁵

Displasia: Todo epitelio escamoso situado sobre la superficie o en las glándulas que muestra alteraciones en la diferenciación, pero sin alcanzar el grado de perturbación que caracteriza al carcinoma in situ.¹⁵

Carcinoma in situ: aquella lesión con pérdida de la diferenciación en todo el espesor del epitelio y que puede extenderse a las glándulas¹⁵

En 1967, Reagan desarrolla el concepto de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) con tres grados progresivos, incluyendo en el grado 3 la displasia grave y el carcinoma in situ de la clasificación anterior. Esta clasificación ha sido considerada bastante adecuada durante más de 20 años y por lo tanto la más utilizada internacionalmente. No obstante, un número creciente de publicaciones señalaron el hecho de la sorprendentemente baja seguridad diagnóstica en la parte menos severa del espectro, tanto en material cito como histológico; se sugirió, por lo tanto, que este sistema de gradación debía ser modificado y sustituido por un sistema binario que segregara los procesos con atípia celular muy discreta de aquellos con atípia franca.¹⁵

Las razones anteriormente expuestas, junto con los avances en el conocimiento de la carcinogénesis cervical y en el diagnóstico citológico, motivaron una reunión en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, en Bethesda (Maryland). Fruto de dicha reunión fue un nuevo sistema de nomenclatura para informes citológicos ginecológicos (Sistema o Clasificación de Bethesda), en el que se unificaron criterios y se adoptaron recomendaciones que la experiencia general acumulada aconsejaba. La parte fundamental de esta nueva clasificación fue la elaboración de un sistema binario para catalogar las anomalías celulares preneoplásicas en el extendido citológico, denominándolas lesiones intraepiteliales escamosas de alto o bajo grado. El término «alto grado» incluye el CIN 2 y CIN 3 de la clasificación de Richard y el término «bajo grado» el CIN 1 y las alteraciones celulares producidas por papilomavirus (VPH). Esta clasificación fue difundida en 1988, mínimamente modificada en 1991 y actualizada recientemente en 2001.¹⁵

El sistema Bethesda divide las lesiones epiteliales escamosas no invasoras en: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) y lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG). Esta terminología refleja la historia natural de la infección por VPH y diferencia las lesiones asociadas a infección aguda en la que el virus permanece en un estado episomal (LIEBG) de aquellas lesiones resultantes de una infección proliferativa en la cual el virus es integrado en el genoma del huésped (LIEAG).¹⁶

Las ventajas del sistema Bethesda son:

- 1) Evita la discordancia entre diferentes patólogos al definir únicamente dos variables
- 2) Mayor utilidad clínica, ya que los médicos deben enfrentarse casi siempre a dos opciones de tratamiento (seguimiento o extirpación)
- 3) Correlación entre los dos grados, el riesgo de progresión y los tipos virales.⁵

La clasificación en solo dos grados es más cercana a la posibilidad real del diagnóstico morfológico y de la terapéutica actual.⁵

La Organización Mundial de la Salud en su Clasificación Histológica Internacional de Tumores en 1975 incorporó la clasificación de displasias. En su penúltima revisión (1994) aceptó indistintamente la nomenclatura de NIC y displasia; sin embargo, a partir del 2003 se aprobó la clasificación de NIC y la de lesiones intraepiteliales escamosas, según la propuesta del sistema Bethesda. Aunque la nomenclatura de este último se propuso para el estudio citopatológico, por razones naturales se incorporó a la histopatológica. La Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA2-1994) estableció de acuerdo con la OMS, denominar a las alteraciones premalignas como displasias o NIC y, a partir de 2007 se incluyó la nomenclatura de Bethesda.⁵

CORRELACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS DE LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DEL CUELLO UTERINO

Reagan, 1953	Richard, 1967	Bethesda, 2001
Displasia Leve	NIC I	LEIBG
Displasia Moderada	NIC II	LEIAG
Displasia Severa	NIC III	LEIAG
Carcinoma in situ	NIC III	LEIAG
NIC = Neoplasia intraepitelial cervical LEIBG = Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIAG = Lesión escamosa intraepitelial de alto grado		

DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO DE LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO GRADO (NIC 1)

Las características morfológicas asociadas con la infección productiva del VPH incluyen:

- Coilocitosis
- Disqueratosis
- Multinucleación
- Hiper Cromasia nuclear
- Irregularidad del contorno de la membrana nuclear ¹⁶

En general el patrón de maduración escamosa se conserva y las mitosis se localizan únicamente a nivel basal y parabasal. Aunque las anomalías citonucleares típicamente afectan todo el espesor del epitelio (de ahí que sean accesibles al Papanicolaou) existe retención de la maduración escamosa y la mayoría de las alteraciones se presentan en el tercio inferior del epitelio.¹⁶

Como el epitelio escamoso es rico en glucógeno, la inflamación y los cambios reactivos en el epitelio pueden imitar coilocitosis y cambios citonucleares como multinucleación, irregularidad en los contornos nucleares e hiper cromasia, todos los cuales pueden llevar a establecer un diagnóstico erróneo de displasia de bajo grado.¹⁶

DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO DE LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE ALTO GRADO (NIC 2 y NIC3)

Características morfológicas:

- Pérdida de la maduración
- Pérdida de la polaridad
- Mitosis anormales
- Atipia citonuclear, que incluye: incremento del radio núcleo/citoplasma (N/C), irregularidad en el contorno nuclear y cromatina gruesa.¹⁶

En la NIC2 la atipia celular abarca dos tercios del epitelio y aun persiste maduración escamosa en el tercio superior. En la NIC 3 la atipia citonuclear abarca la totalidad del espesor del epitelio.¹⁶

El diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical se basa principalmente en la presencia de atipia nuclear y pérdida de la maduración escamosa (polaridad). Estadificar adecuadamente a las NIC es importante para entender el promedio de regresión, persistencia y progresión de las lesiones de bajo grado (NIC 1) y lesiones de alto grado (NIC 2 y 3) ya que su tratamiento y seguimiento clínico es diferente.¹⁶

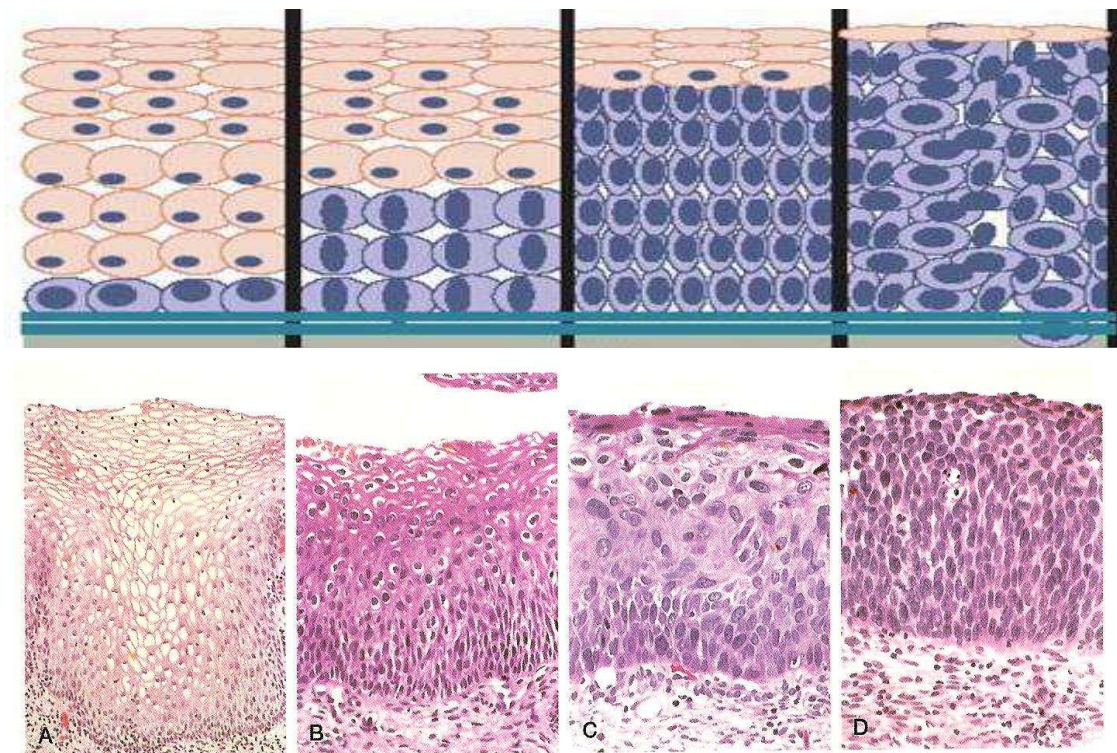


Fig. 7. Espectro de las lesiones escamosas intraepiteliales. A. epitelio escamoso normal con fines comparativos. B NIC I afectación del tercio inferior del epitelio. C NIC II afectación de los dos tercios inferiores del epitelio. D NIC III afectación de la totalidad del espesor del epitelio.³

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS LIEAG (IMITADORES DE LAS LIEAG)

Los principales diagnósticos diferenciales de las LIEAG incluyen: cambios reactivos, hiperplasia de células basales, metaplasia escamosa inmadura, atrofia escamosa y LIEBG.¹⁶

Hiperplasia de células basales. Se caracteriza por engrosamiento de las zonas basal y parabasal con agrandamiento nuclear y basofilia del citoplasma. Por arriba de esta zona engrosada, aun conserva la maduración escamosa y la polaridad, además no hay pleomorfismo nuclear ni hiperchromasia.¹⁶

Atipia reactiva. Se caracteriza por presentar núcleo vesicular y agrandado, nucléolo prominente y aumento de la actividad mitótica. La atipia que se observa en las condiciones reactivas usualmente se restringe a la capa basal y la maduración escamosa se conserva en el epitelio superficial. Sin embargo, en casos difíciles se puede utilizar el marcador p16 para distinguir entre ambas entidades.¹⁶

Atrofia escamosa. Esta entidad se presenta en estados de poca producción de estrógenos como en la menopausia o mujeres que toman anticonceptivos orales con bajos niveles de estrógenos. Se caracteriza por adelgazamiento del epitelio escamoso cervical sin evidencia de diferenciación celular, las células son predominantemente del tipo parabasal, pueden verse hiperchromáticas y monomorfas. El aumento del radio N/C y la carencia de maduración epitelial son los datos que hacen de la atrofia un imitador de la LIEAG; sin embargo, en la atrofia no hay actividad mitótica ni pleomorfismo nuclear, a menos que se asocie a cambios reactivos, en cuyo caso está restringido al tercio inferior del epitelio.¹⁶

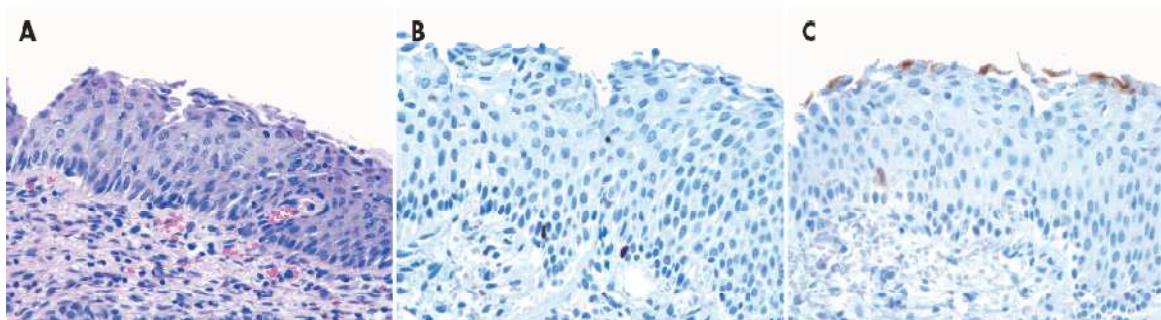


Fig. 8. Atrofia escamosa. A. Tinción con H-E que muestra células basales monomorfas e hiperchromáticas, que carecen de maduración normal. B. Ki67 que muestra positividad focal únicamente en la capa basal. C. p16 con leve positividad en las glándulas endocervicales residuales en la parte superior, las células escamosas son negativas.

Metaplasia escamosa inmadura. Esta variedad resulta de los diferentes estadios de la metaplasia escamosa. Existe un aumento del radio N/C y relativa pérdida de la maduración, pero las células metaplásicas son uniformes, redondas u ovales y con un solo núcleo cuyos contornos son lisos.¹⁶

LEIBG vs LIEAG. Las LEIBG pueden presentar alteraciones citonucleares que se extienden al epitelio superficial, pero el radio N/C no está incrementado de forma significativa como en las LIEAG. Debido a que la displasia cervical representa un espectro continuo de cambios morfológicos, algunas lesiones pueden encontrarse en el límite entre el bajo y el alto grado; en estos casos, se pueden utilizar otras técnicas auxiliares como los marcadores p16 y Ki67 para complementar la interpretación morfológica. Si una lesión presenta características morfológicas entre una NIC1 y una NIC2, podemos hacer el diagnóstico de LIEAG si Ki67 tiene una positividad nuclear intensa en todo el espesor del epitelio y si p16 tiene una positividad nuclear y citoplásmica en dos tercios o todo el espesor del epitelio.¹⁶

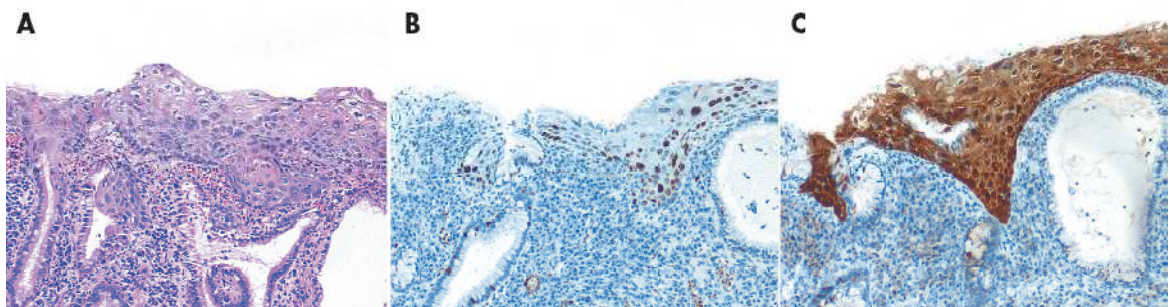


Fig. 9. LEIBG vs LIEAG. A. Tinción con H-E- en la que se observan características morfológicas limítrofes entre NIC I y NIC II. B. Positividad para Ki67 en los dos tercios inferiores del epitelio. C. Positiva nuclear y citoplásmica para p16 en todo el espesor del epitelio¹⁶

LIEAG vs Carcinoma invasor. La evaluación de una posible invasión puede ser extremadamente difícil en biopsias cervicales que presentan características morfológicas de lesión de alto grado sin una cantidad suficiente de estroma subepitelial, especialmente si la biopsia está cortada de forma tangencial o malorientada. La presencia de maduración paradójica en la base del epitelio, incluyendo grandes células atípicas queratinizadas y perlas corneas, pueden sugerir invasión. En diversos estudios se ha encontrado que la presencia de células atípicas y grandes de más de 5 veces el tamaño de las células basales, la presencia de perlas corneas, necrosis y neovascularización son características asociadas a carcinoma invasor.¹⁶

HISTORIA NATURAL DE LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES

La historia natural de la infección depende principalmente del tipo de VPH, del estado inmunitario de la paciente y de su edad. Se ha observado que las mujeres menores de 35 años son más susceptibles de adquirir infecciones genitales con virus oncogénicos, mismas que desaparecen en la mayoría de los casos; al contrario en las mujeres mayores de 35 años comúnmente persiste la lesión con cambios clínicos y morfológicos, además de presentar un mayor riesgo de progresión.¹

La expresión de los oncogenes víricos en la capa basal, parabasal y de reserva genera un daño continuo al genoma del huésped y termina modificando el contenido general del ADN de las células, proceso que se ve reflejado en el alto grado de aneuploidia que presentan estas células. De los clones celulares proliferativos que expresan E6 y E7 se relacionan además clones modificados que poco a poco van perdiendo la capacidad de diferenciarse y transformarse en epitelio escamoso maduro, por lo tanto aumenta el número de células que mantiene el ciclo celular activo. En la histología este proceso explica que la NIC1 se transforme en NIC 2 o NIC 3 y que aumente el espesor de la capa celular que expresa p16.²

En la historia natural de las LEIBG, un número significativo de casos (60 a 80%) presentan regresión espontánea en un periodo de dos años; una cuarta parte persisten como tales; alrededor de 10 a 15% progresan a una lesión de alto grado y solo 1% progresan a carcinoma invasor.¹ No obstante, es casi imposible predecir el porcentaje de regresión definitiva, ya que las NIC 3 confirmadas mediante estudio histopatológico generalmente son resecaadas por completo o son eliminadas como consecuencia del tratamiento.²

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PROGRESION O REGRESION DE LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES

La disparidad entre las tasas de infección por VPH y el desarrollo de carcinoma sugiere la presencia de otros factores predisponentes a la transformación maligna.⁴

Se considera que la carcinogénesis cervical es un proceso compuesto por varios pasos, del cual el VPH es un carcinógeno necesario, pero no suficiente.²

Aunque algunas de las infecciones por VPH son causadas por virus de bajo riesgo cuyas proteínas son incapaces de causar transformación maligna, otros factores podrían explicar porque algunas de estas infecciones progresan, mientras otras tienden a desaparecer sin consecuencias clínicas.⁴

Los factores que intervienen en la regresión o progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales dependen tanto de las características propias del virus, así como de la condición del huésped.¹³

Factores virales: genotipo, integración y carga viral

Factores del huésped: edad, tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, paridad, susceptibilidad genética y respuesta inmune.¹³

La regresión espontánea de las lesiones cervicales parece ser el resultado de la respuesta inmune del huésped, simultáneamente participan la inmunidad celular y la inmunidad humoral contra los antígenos del VPH. Después de la regresión, el ADN del VPH puede persistir en un estado latente con escasas células en infección productiva, durante esta fase la expresión genética puede estar limitada a E1 y E2, pero la inmunodepresión puede reactivar infecciones latentes o causar progresión y resistencia al tratamiento en infecciones activas. Para mantener la latencia se requiere que el virus evada al sistema inmune, lo cual es posible gracias a que las proteínas de los papilomavirus carecen de inmunogenicidad; además la proteína E5 modifica la presentación antígeno-anticuerpo.⁴

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de carcinoma cervicouterino (cacu) es el número de parejas sexuales, ya sea de la paciente o de su pareja. En un estudio, el 80% de las parejas masculinas de mujeres con NIC 1 presentaban lesiones en pene, muchas de ellas ocasionadas por VPH; estas lesiones podrían causar infecciones de repetición y así influir en el desarrollo de neoplasia.^{4, 18}

Los anticonceptivos orales (ACO) también pueden conferir cierto riesgo. En un estudio se encontró que las mujeres con infección por VPH-AR y que tomaron ACO por 6 años o más, tenían 4 veces más riesgo de desarrollar cacu, que aquellas mujeres con IVPH AR que no tomaban ACO. Estos hallazgos sugirieron que el ambiente hormonal de mujeres infectadas juega un papel importante en la susceptibilidad de la mucosa cervical al desarrollo de malignidad.^{4, 17, 18}

Se ha demostrado que la inflamación crónica del cérvix también aumenta el riesgo de progresión de displasia a carcinoma, encontrándose una correlación positiva con la infección por virus herpes simple 2 y *chlamydia trachomatis*.³ El tabaquismo también se ha reportado como un factor de riesgo relativo ya que algunos productos del metabolismo del tabaco han sido encontrados en las secreciones cervicales. También se sugiere una predisposición genética, basado en las observaciones de que las hijas y hermanas de mujeres con cacu tienen un mayor riesgo del desarrollo de carcinoma.^{4, 18}

FACTORES DE RIESGO PARA CARCINOMA CERVICAL: INFECCIÓN POR VPH, PERSISTENCIA Y TRANSFORMACIÓN MALIGNA

Factor de Riesgo	Infección por VPH	Persistencia y progresión
Múltiples parejas sexuales	+	n.e.
Higiene deficiente	+	n.e.
Pareja masculina sin circuncisión	+	+
Inmunodeficiencias, VIH	+	+
Multiparidad	n.e.	+
Anticonceptivos orales	n.e.	+
Tabaquismo	n.e.	+
ETS, aparte de VPH	n.e.	+
Desnutrición	n.e.	+

ETS = enfermedades de transmisión sexual, especialmente *C. trachomatis*
n.e. = actualmente no hay evidencia de que sea un factor de riesgo

INMUNOHISTOQUÍMICA EN LAS LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES

¿QUÉ ES LA INMUNOHISTOQUÍMICA?

Es una técnica de inmunotinción que se caracteriza por demostrar antígenos presentes en células y tejidos, utiliza infinidad de biomarcadores moleculares capaces de detectar procesos tanto benignos como malignos en diversas muestras histológicas. Permite la visualización de antígenos presentes en los tejidos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo dirigido contra un antígeno específico (anticuerpo primario) y un anticuerpo secundario que hará contacto directo con el primario mediante un complejo enzimático y un sustrato cromógeno, capaces de lograr una activación enzimática a nivel de este último que finalmente producirá una reacción visible en el lugar donde está presente el antígeno.^{2, 3, 19}

Existen diferentes técnicas inmunohistoquímicas, pero todas se basan en el mismo principio: se aplica un anticuerpo monoclonal o policlonal frente al antígeno en estudio sobre un corte de tejido procesado correctamente y se lo marca de algún modo a fin de que sea fácil detectar el lugar de fijación.²

En el método más simple, el marcador se fija directamente a este anticuerpo (primario). Si se opta por una marcación cromogénica se utiliza una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina) y un sustrato cromógeno. Esta enzima actúa sobre el sustrato y lo convierte en un pigmento insoluble que precipita en el lugar del anticuerpo fijado, de modo que revela su ubicación en la célula o el tejido. Si se aplica una coloración de contraste adecuada al corte tisular, es posible localizar con facilidad el antígeno marcado.²

Se utilizan diversas técnicas para que este método sea más versátil y sensible. En el uso convencional del método, al anticuerpo primario no se le marca directa sino indirectamente empleando un anticuerpo secundario marcado dirigido a la parte constante (porción cristalizable) del anticuerpo primario.²

La marcación inmunohistoquímica cromogénica es estable y permite una evaluación directa con microscopio óptico convencional, no es necesario ningún equipo especial.²

APLICACIONES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica tiene diversas aplicaciones en la práctica diaria. Por ejemplo, ayuda a determinar el origen de un tumor determinado. En la mayor parte de los casos, esa determinación depende de la expresión de las proteínas, definida por el tipo de diferenciación y de la ubicación de las proteínas en la célula o el tejido. La aplicación más importante tiene como objetivo definir el diagnóstico diferencial de tumores que podrían ser problemáticos: por ejemplo, diferenciar una NIC de un epitelio reactivo o atrófico. Diversos tipos de datos también parecen indicar que es probable que el uso de anticuerpos específicos mejore la reproductibilidad del diagnóstico histopatológico.²

También se ha utilizado para detectar la presencia de VPH, utilizando un anticuerpo policlonal que reacciona con la proteína principal de la cápside del virus, codificada por la región L1, por lo que el marcaje se detecta exclusivamente en las células diferenciadas del tercio superior del epitelio, fundamentalmente coilocitos, en las que tiene lugar la síntesis de las proteínas estructurales del virus. El uso de este anticuerpo solo es útil en infecciones productivas, como lo demuestra el hecho de que el número de biopsias antígeno positivas disminuye a medida que aumenta la severidad de la lesión.²⁰

En el caso de antígenos relacionados con el ciclo celular como ki67 y p16 son empleados fundamentalmente para evidenciar las células con alta actividad proliferativa que están asociadas con la aparición de lesiones intraepiteliales escamosas del cérvix uterino.¹³

PROTEINA p16

Esta proteína es un producto del gen supresor tumoral p16^{INK4A}CDKN2A que pertenece a la familia de reguladores del ciclo celular, llamados inhibidores de cinasa dependientes de ciclina, ha sido identificada como un biomarcador de transformación en infecciones por VPH. Fisiológicamente p16 bloquea la actividad de CDK4/6 cinasa dependiente de ciclina, actúa en un ciclo de retroalimentación negativa con otro gen supresor tumoral, la proteína Rb, y detiene el ciclo celular en la fase G1-S, de esta forma mantiene la proliferación celular bajo control. Cuando el VPH AR infecta a la célula huésped, la oncoproteína E7 se une y rompe Rb de su unión con el factor de transcripción E2, de tal modo que promueve la progresión del ciclo celular, el ciclo de retroalimentación se pierde y p16 se sobreexpresa y como resultado, la proteína se acumula en el núcleo y citoplasma de las células afectadas y puede ser detectada por técnicas de inmunohistoquímica.^{9, 21,22, 23}

El gen p16 se localiza en el cromosoma 9p21, región en la que pueden producirse alteraciones genéticas diversas. Se han detectado mutaciones en niños con melanoma familiar y adenocarcinoma pancreático y deleciones en melanomas esporádicos, adenocarcinomas relacionados a esófago de Barret, carcinoma de células transicionales de la vejiga y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.^{9, 24,25}

Patrones de inmunoexpresión de p16

La inmunotinción de p16 se expresa con un patrón difuso, intenso, nuclear y citoplasmico en las lesiones escamosas intraepiteliales.^{5, 6} Las lesiones de bajo grado muestran tinción focal a difusa en el tercio inferior del epitelio. Las lesiones de alto grado presentan una tinción intensa y difusa en los dos tercios o todo el espesor del epitelio.^{16, 26}

La heterogeneidad en la inmunotinción puede representar una diferencia en el potencial de agresividad entre las lesiones de bajo grado y tal vez refleja los diferentes estados físicos del virus (episomal, integrado). Es posible que las lesiones de bajo grado expresen en forma intensa p16, lo cual podría sugerir una gran cantidad de VPH integrado y por lo tanto, p16 puede utilizarse como un marcador de riesgo de progresión. De igual forma, los focos de displasia de alto grado que son negativos a p16 pueden representar lesiones que están en proceso de regresión con un potencial de eliminación del virus.^{16, 26}

Algunos estudios han identificado que una variedad de lesiones no asociadas a VPH presentan positividad focal e irregular de p16, tales como metaplasia escamosa, metaplasia tubal, adenocarcinoma endometriode y seroso, por lo tanto, el contexto en que p16 es utilizado y su patrón de distribución e intensidad debe ser considerado antes de confirmar la presencia de una lesión asociada a VPH.²¹

Entre todos los marcadores, p16 sigue siendo el más confiable para la detección de lesiones de alto riesgo. En general la proporción de frotis cervicales y cortes histológicos que sobreexpresan este marcador ha sido demostrado que incrementa con la severidad de las alteraciones cito/histológicas.^{21,27}

P16 se ha analizado en diversos tejidos neoplásicos y se ha relacionado como factor pronóstico, ya que se ha encontrado que la pérdida de la expresión de esta proteína se asocia con mal pronóstico hasta en un 20% de carcinomas gástricos, con invasión o metástasis en melanomas malignos y con mayor riesgo de progresión a carcinoma en lesiones premalignas de cabeza y cuello.⁹

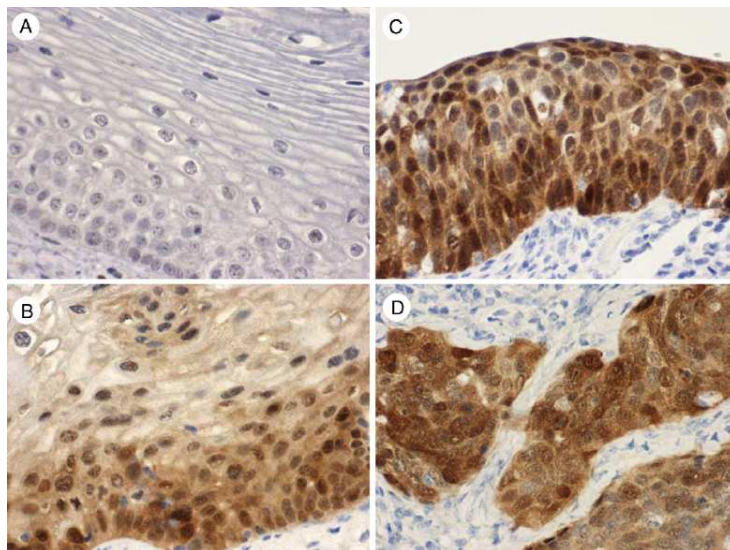


Fig. 10. Diferentes patrones de expresión de p16 en el epitelio exocervical. A Epitelio escamoso normal. B NIC 1. C NIC 3. D Carcinoma escamoso invasor

Ki67

Ki67 es un antígeno que identifica células proliferativas y es expresado en todas las fases del ciclo celular (G1, 2, G2/M). MIB-1 es el anticuerpo monoclonal que detecta a este antígeno en el núcleo de las células en cortes en parafina. La infección por VPH activa la progresión del ciclo celular del huésped con incremento de la cinética celular y este fenómeno se refleja con un incremento en la tinción de MIB-1.^{21, 28}

En condiciones normales hay una expresión de MIB-1 en las células parabasales del epitelio escamoso, por ello, la distinción entre una lesión intraepitelial escamosa y un epitelio no neoplásico se basa en la presencia de MIB-1 en los tercios superior y medio del epitelio. Las lesiones de alto grado usualmente muestran positividad nuclear difusa a través de todas las capas del epitelio, mientras que en las lesiones de bajo solo es positiva en pequeños grupos de células.^{27, 28, 30}

Los falsos positivos incluyen una sobre interpretación positiva en la presencia de un epitelio inflamatorio reactivo y en linfocitos intraepiteliales que también son positivos para MIB-1. También los cortes tangenciales algunas veces pueden dar la impresión de positividad en las células parabasales que se colocan superficialmente, dando lugar a una confusión con una NIC. Además la interpretación también se dificulta en muestras muy pequeñas cuando no se observa todo el espesor del epitelio.^{28, 29}

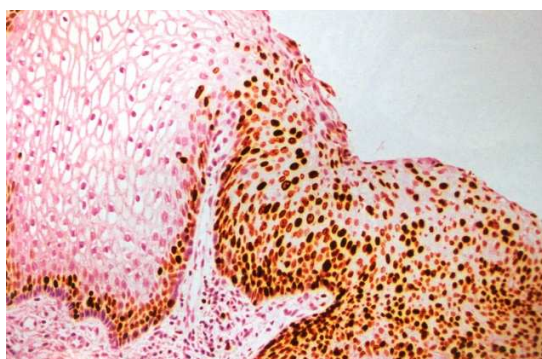


Fig. 11. LEIAG. Se observa inmunoreactividad positiva para MIB-1 presente en el núcleo de las células en todo el espesor del epitelio (*derecha*), mientras que en el epitelio normal la positividad está limitada a la capa basal (*izquierda*)²

El antígeno ki67 detecta células en todas las fases activas del ciclo celular. Se expresa normalmente en las células basales y parabasales del epitelio escamoso. Debido a que se expresa de forma focal en las células basales y parabasales en epitelio atrófico, es de gran ayuda para distinguir entre displasia de alto grado y atrofia. Su interpretación debe ser examinada con precaución al examinar biopsias con lesiones inflamatorias, los especímenes mal orientados también pueden ocasionar problemas en la interpretación, con epitelio superficial denudado o cortes tangenciales. Además los cambios hormonales pueden influir en el nivel de expresión de ki67, ya que la positividad aumenta en las células parabasales durante la fase lútea del ciclo menstrual y durante el embarazo.^{16, 23, 28, 30}

HIBRIDACION IN SITU

Las técnicas de hibridación in situ (HIS) se basan en la detección de secuencias de ácidos nucleicos, ADN o ARN, específicas mediante el uso de sondas marcadas. Las sondas son moléculas de ácidos nucleicos cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de aquella que se quiere detectar. Para el tipado de VPH habitualmente se usan sondas de ADN obtenidas donando el genoma completo de cada tipo de VPH aislado, o una parte de él, en plásmidos bacterianos. A continuación, o bien se marca el plásmido completo, o bien se libera el ADN de VPH del plásmido mediante la adecuada enzima de restricción y se marca después de purificarlo por electroforesis en gel.^{13, 20}

En lugar de identificar antígenos proteínicos como los métodos inmunohistoquímicos, la HIS identifica los ácidos nucleicos. Para ellos, se emplean sondas de ácidos nucleicos en lugar de anticuerpos. Las técnicas microscópicas para visualizar y localizar la marcación son similares a las empleadas para los métodos inmunohistoquímicos.²

Para detectar el ADN, las sondas de ácidos nucleicos se dejan fijar a la secuencia de ADN en cuestión. La sonda se une con la digoxigenina, que puede detectarse con un anticuerpo anti-digoxigenina ligado a una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina). Esa enzima convierte el sustrato cromogénico en un pigmento insoluble, que precipita en la sonda de ADN fijada, lo que marca su presencia y ubicación en la secuencia de ADN.²

Se han utilizado una gran variedad de técnicas de hibridación para tipar el VPH presente en muestras ginecológicas. Algunas de estas técnicas requieren aislamiento del ADN celular, mientras que otras se realizan sobre cortes de tejido o células procedentes de citologías ginecológicas. Entre las técnicas se encuentran:^{13, 20}

Southern Blot: en la que el ADN de la muestra se extrae y se digiere con una enzima, los fragmentos se separan mediante electroforesis, el ADN se desnaturaliza y se transfiere a filtros para finalmente hibridarse con las sondas.^{13, 20}

Dot Blot: se desarrolló para facilitar el análisis rápido de un gran número de muestras. La diferencia principal con el Southern blot consiste en que el ADN se coloca directamente sobre el filtro en el que se llevará a cabo la hibridación.^{13, 20}

La HIS en tejido presenta varias ventajas con respecto a las técnicas anteriores sobre todo cuando se emplea marcaje no radioactivo: permite la realización de estudios retrospectivos sobre material fijado en formol e incluido en parafina, da información sobre la localización de los ácidos nucleicos de VPH en el tejido y permite la detección de ADN de VPH en muestras que resultan negativas por Southern blot en las que hay sólo un número muy reducido de células infectadas con un número elevado de copias.^{13, 20}

HIBRIDACION IN SITU EN TEJIDO

La hibridación *in situ* en tejido se diferencia de las técnicas anteriores en que no es necesario extraer el ADN celular, sino que la hibridación se realiza directamente sobre cortes del tejido. Este método aporta, por lo tanto, información adicional sobre la distribución topográfica de los ácidos nucleicos de VPH en una lesión.^{13, 20}

Varios factores influyen en los resultados obtenidos con esta técnica:

1. Fijación del tejido: El fijador ideal para realizar técnicas de HIS ha de conservar histológicamente el tejido lo mejor posible y evitar la degradación de los ácidos nucleicos virales; en este sentido, los mejores resultados se obtienen con paraformaldehído.^{13, 20}

2. Adherencia del tejido al portaobjetos: Dado que esta técnica se realiza directamente sobre cortes del tejido es fundamental que éstos no se despeguen del portaobjetos a lo largo del proceso.^{13, 20}

3. Digestión enzimática del tejido: El pretratamiento enzimático del tejido antes de realizar la hibridación es un punto clave para optimizar los resultados obtenidos con esta técnica. La finalidad de esta digestión enzimática es permeabilizar el tejido y liberar al ADN de su unión a proteínas de manera que las sondas puedan alcanzar perfectamente sus secuencias diana.^{13, 20}

4. Hibridación: Las sondas se emplean diluidas en una mezcla de hibridación de composición compleja. En ella se incluyen agentes que bloquean las uniones no específicas de las sondas al tejido, que aumentan la concentración efectiva de la sonda, acelerando la hibridación.^{13, 20}

5. Lavado de posthibridación: Este es un paso fundamental en el que se fijan las condiciones de “permisividad” de la técnica. Están implicados tres parámetros: fuerza iónica del tampón empleado en el lavado, concentración de formamida en el mismo y temperatura a la que se realiza.^{13, 20}

6. Detección del dúplex sonda-secuencia diana: El método de detección del híbrido va a depender del tipo de marcaje de la sonda empleada. Cuando se emplean sondas marcadas con biotina la detección del dúplex se realiza con un complejo avidina-biotina-enzima más el correspondiente par sustrato/cromógeno, con lo que se obtiene una reacción coloreada. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.^{13, 20}

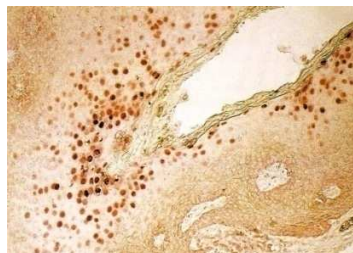


Fig. 12. NIC II. Hibridación *in situ* con sonda de ADN para VPH 6/11

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una relación muy estrecha entre el carcinoma escamoso de cérvix y sus lesiones precursoras con la infección por el virus del papiloma humano, el cual es considerado como el principal factor de riesgo para desarrollar este carcinoma.

El VPH puede detectarse en biopsias y muestras citológicas de cuello uterino a través de las alteraciones morfológicas que provoca en las células escamosas (coilocitosis) y del tipo de lesión asociada a su presencia; el estudio histopatológico se considera el patrón de referencia (estándar de oro) en el cual el clínico se basa para planificar el tratamiento de cada paciente; sin embargo, existen casos en los que el diagnóstico histopatológico preciso es subjetivo y susceptible de opiniones variadas entre los observadores, hecho que ha incitado la búsqueda de técnicas alternativas como la inmunohistoquímica para ayudar a establecer un valor pronóstico más confiable.

Se han propuesto diversos marcadores que nos ayudan a mejorar la objetividad en el diagnóstico de lesiones escamosas intraepiteliales, entre los cuales se encuentran la proteína p16, la cual permite distinguir cambios reactivos de displasias, siendo positivo en estas últimas y Ki67 que determina el grado de proliferación celular. Es por ello, que en este estudio se pretende conocer ¿Cuál es la aportación de los estudios de inmunohistoquímica específicamente p16 y Ki67 para el diagnóstico objetivo de las lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino? en las biopsias de cérvix realizadas en un hospital de segundo nivel en el periodo comprendido del 01 de enero al 31 de diciembre del 2010.

III. JUSTIFICACIÓN

El carcinoma cervicouterino es uno de los principales problemas de salud pública en gran parte de los países subdesarrollados, en México representa una de las primeras causas de muerte por cáncer en la población femenina; a pesar de que su mortalidad ha disminuido en los últimos años gracias a la citología cervicovaginal que detecta lesiones cervicales tempranas, el índice de falsos positivos y negativos así como la falta de reproducibilidad intra e interobservador han llevado a investigar marcadores más objetivos para la identificación de células displásicas.

El diagnóstico de la infección por VPH se realiza mediante la identificación morfológica de los cambios patognomónicos producidos por este virus en las células escamosas de tipo superficial. Sin embargo, aunque la presencia inequívoca de coilocitos indica infección vírica productiva con una gran especificidad, desde el punto de vista histológico, es un método muy poco sensible, puesto que la mayoría de las LEIAG y carcinomas escamosos invasores no evidencian estos cambios morfológicos y el diagnóstico preciso se torna subjetivo y susceptible a variaciones entre observadores, por lo tanto, la detección y gradación de los NIC usando solamente tinciones de H-E es limitada y poco reproducible cuando estas lesiones coexisten con cambios reactivos, atrofia, especímenes muy pequeños y cortes tangenciales.

La sola distinción morfológica entre las LEIAG no convencionales y sus imitadores en ocasiones puede ser todo un desafío, por esa razón muchos investigadores han buscado marcadores con alta especificidad y sensibilidad para lograr más objetividad en el diagnóstico de estas lesiones^{9,4}. El uso de p16, un inhibidor de proliferación celular se considera un buen marcador de células escamosas displásicas y de infección por VPH de alto riesgo, diversos estudios han demostrado que mejora la concordancia interobservador. Ki67 es un marcador de proliferación celular que se asocia con el grado de displasia cervical por lo que también se le considera un marcador pronóstico. Así también, es de suma importancia la tipificación del subtipo de VPH, ya que esto aportará mayor objetividad y ayudará a seleccionar a individuos con alto riesgo de progresión de la enfermedad.

La distinción entre un LEIBG y una LEIAG que se realiza con H-E debe realizarse con mucho cuidado debido a las posibles consecuencias y diferencias en el manejo entre una y otra.⁵ La importancia del diagnóstico adecuado es crucial para el manejo óptimo de la paciente y en caso necesario interrumpir la historia natural de la enfermedad. Así una mayor especificidad en el método de diagnóstico es la meta deseada para prevenir resultados falsos positivos y evitar que la paciente sea sometida a un tratamiento innecesario que además de incrementar los costos médicos también somete a la paciente a un estrés psicológico.

IV. HIPÓTESIS

El estudio histopatológico continua siendo el estándar de oro en el diagnóstico y gradificación de las lesiones escamosas intraepiteliales; sin embargo, existen casos en los que el diagnóstico preciso se torna subjetivo y susceptible de opiniones variadas entre los observadores, además en diversos estudios se ha demostrado que muchas pacientes que son VPH positivas no tienen evidencia de displasia por citología o histología, estos hechos han incitado la búsqueda de técnicas complementarias como la inmunohistoquímica.

Entre los marcadores de inmunohistoquímica auxiliares para el diagnóstico de lesiones escamosas intraepiteliales se encuentran p16 y ki67.

P16 es un biomarcador de transformación en infecciones por VPH que puede ser de utilidad en el diagnóstico de neoplasia cervical ya que tiene una relación directa entre su expresión, los VPH de alto riesgo y el grado de displasia, por lo tanto, podría representar un marcador específico y sensible de neoplasia cervical. Ki67 se expresa en las células en proliferación y por lo tanto podría ser un marcador indirecto de displasia

El uso correcto de estos marcadores junto con la interpretación morfológica mejoraría la certeza diagnóstica y disminuiría significativamente la variabilidad interobservador.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir la relación entre el diagnóstico histológico de las lesiones escamosas intraepiteliales del cuello uterino con la expresión inmunohistoquímica de los marcadores p16, Ki67 y VPH para aportar mayor objetividad al estudio histopatológico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Describir la relación entre el patrón de expresión de p16 con el grado de lesión intraepitelial cervical.

Describir la relación entre el patrón de expresión de Ki67 con el grado de lesión intraepitelial cervical.

Describir la relación entre el patrón de expresión de antiVPH con el grado de lesión intraepitelial cervical.

Determinar la relación existente entre la expresión de p16 con el subtipo de VPH y el diagnóstico histopatológico.

Conocer las ventajas y desventajas del uso de técnicas de inmunohistoquímica en el diagnóstico histopatológico de lesiones intraepiteliales escamosas cervicales.

Describir la utilidad de este conjunto de técnicas en el diagnóstico de las lesiones intraepiteliales escamosas cervicales y su relevancia en el diagnóstico y pronóstico de dichas lesiones en un hospital de segundo nivel de atención.

VI. METODOLOGÍA

Del archivo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” se seleccionó la totalidad de las biopsias y productos de conización de cuello uterino diagnosticados como lesión intraepitelial escamosa de bajo y alto grado, en el periodo comprendido del 01 de noviembre del 2010 al 30 de mayo del 2011.

Con los bloques de parafina de las muestras seleccionadas y mediante arreglos manuales de tejido de los sitios más representativos se realizaron técnicas de inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos p16, Ki67 y VPH, así como hibridación in situ para tipificar el subtipo de VPH.

PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE MICROARREGLOS

De las laminillas previamente teñidas con hematoxilina-eosina se seleccionó en cada una el lugar de punción y se reincluyó el epitelio de la lesión en un nuevo bloque de parafina, hasta conformar un nuevo bloque con distintas muestras. Quedando distribuidas como se muestra en el siguiente esquema:

Bloque ·Nº _____					
	A	B	C	D	E
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

Los microarreglos se realizaron en un total de 8 bloques, los cuales en su conjunto contenían las 168 muestras a estudiar, y a partir de estos se realizaron cortes de tres micras de espesor y posteriormente las tinciones de inmunohistoquímica con p16, ki67 y VPH.

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCION DE INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Hacer cortes de 3 micras
2. Llevar las laminas al horno para desparafinar a 60°C durante una hora mínimo
3. Pasar las laminas por xilol durante 5 minutos (repetir este paso tres veces)
4. Pasar las láminas por alcoholes de manera decreciente (100%, 90%, 80%, 70%) durante 5 minutos cada uno
5. Lavar con agua destilada
6. Llevar las laminas al peróxido de hidrogeno H₂O₂ al 3% durante 5 minutos (bloquear peroxidasa endógena)
7. Lavar con TBS durante 5 minutos
8. Llevar las laminas al citrato buffer en una vapórela tipo oster durante 45 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente. Se recomienda evitar cambios bruscos de temperatura después de la recuperación antigénica ya que provocaría un daño a nivel de epítomos de cada tejido
9. Lavar con TBS durante 5 minutos
10. Bloquear los tejidos con abidina durante 10 minutos. Lavar con TBS
11. Bloquear los tejidos con biotina durante 10 minutos. Lavar con TBS
12. Utilizar power block durante 10 minutos
13. Decantar, no lavar
14. Aplicar el anticuerpo primario e incubar en la cámara húmeda de 45-60 minutos
15. Lavar con TBS durante 5 minutos
16. Aplicar el anticuerpo secundario LINK y dejar incubando 10 minutos
17. Lavar con TBS durante 5 minutos
18. Realizar la reacción final con sustrato cromógeno diaminobenzidina –sol. DAB-
19. Revelar al microscopio y cuando el tejido toma la tonalidad característica se debe cortar el efecto con agua destilada
20. Contrastar con hematoxilina de Harris durante 2 a 5 minutos
21. Deshidratar, aclarar y montar.

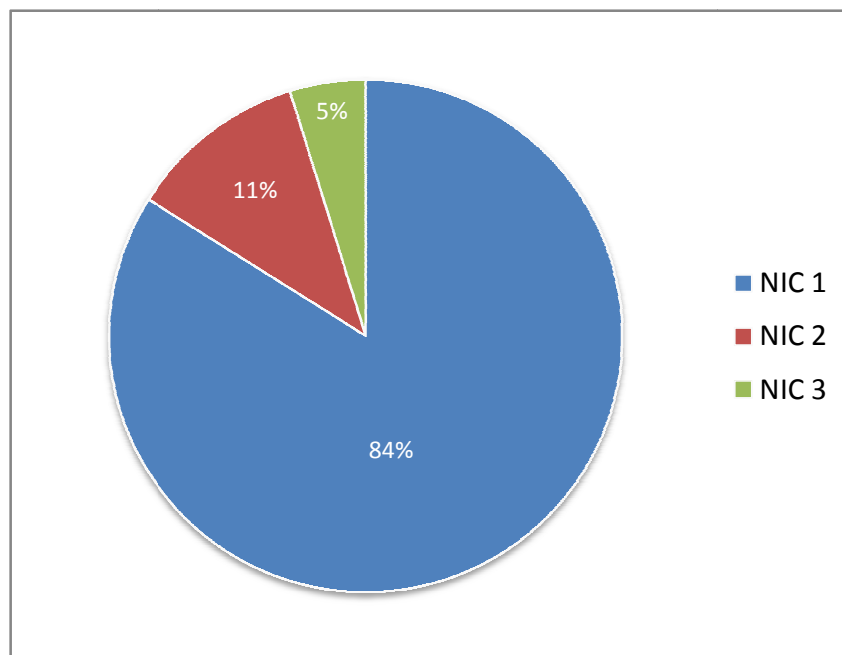
VII. RESULTADOS

En total se obtuvieron 168 muestras, distribuidas de la siguiente manera:

TOTAL DE BIOPSIAS ESTUDIADAS. DIAGNÓSTICO CON H-E

	Frecuencia	Porcentaje %
NIC 1	141	84
NIC 2	19	11
NIC 3	8	5
TOTAL	168	100

TOTAL DE BIOPSIAS ESTUDIADAS. DIAGNÓSTICO CON H-E



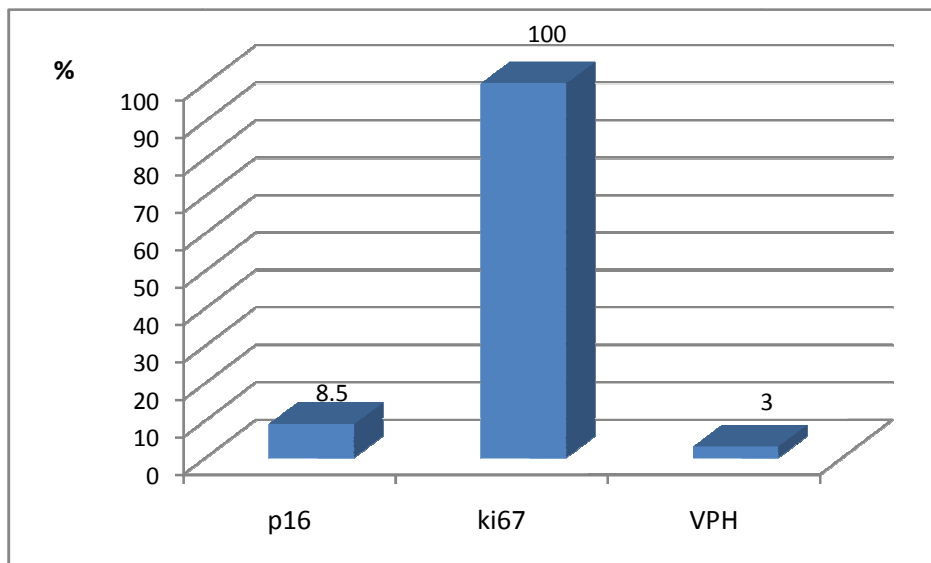
A continuación se desglosarán los resultados de acuerdo al tipo de lesión escamosa intraepitelial y se expresarán en porcentajes, de esta forma, se tomará en cuenta que el 100% de NIC 1 son 141, el 100% de NIC 2 son 19 y el 100% de NIC3 son 8.

RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO GRADO (NIC1)

BIOPSIAS NIC 1 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA

	Frecuencia	Porcentaje %
p16	12	8.5
Ki67	141	100
VPH	4	3

BIOPSIAS NIC 1 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA

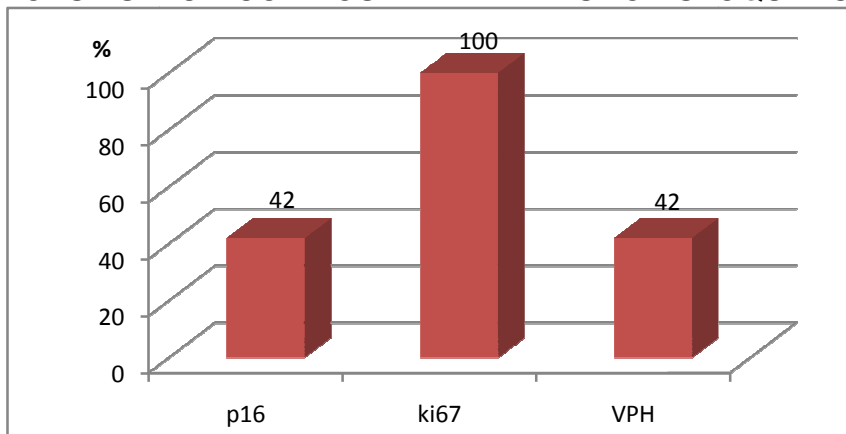


RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE ALTO GRADO (NIC2 y NIC3)

BIOPSIAS NIC 2 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA

	Frecuencia	Porcentaje %
p16	8	42
Ki67	19	100
VPH	8	42

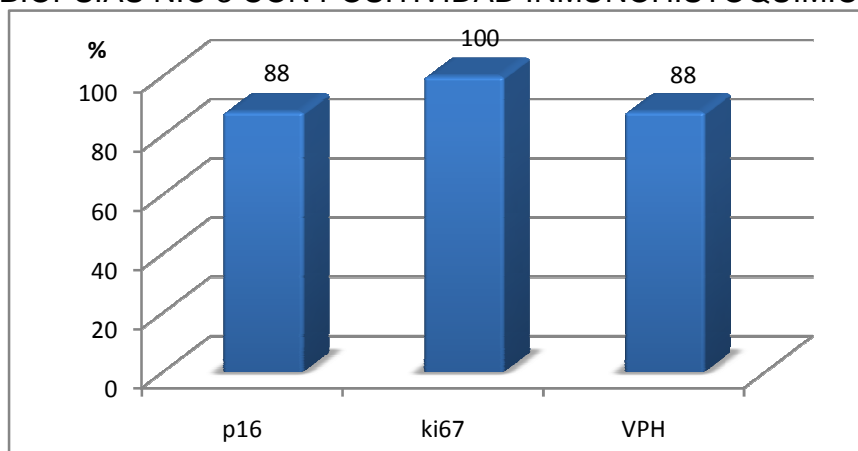
BIOPSIAS NIC 2 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA



BIOPSIAS NIC 3 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA

	Frecuencia	Porcentaje %
p16	7	88
Ki67	8	100
VPH	7	88

BIOPSIAS NIC 3 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA

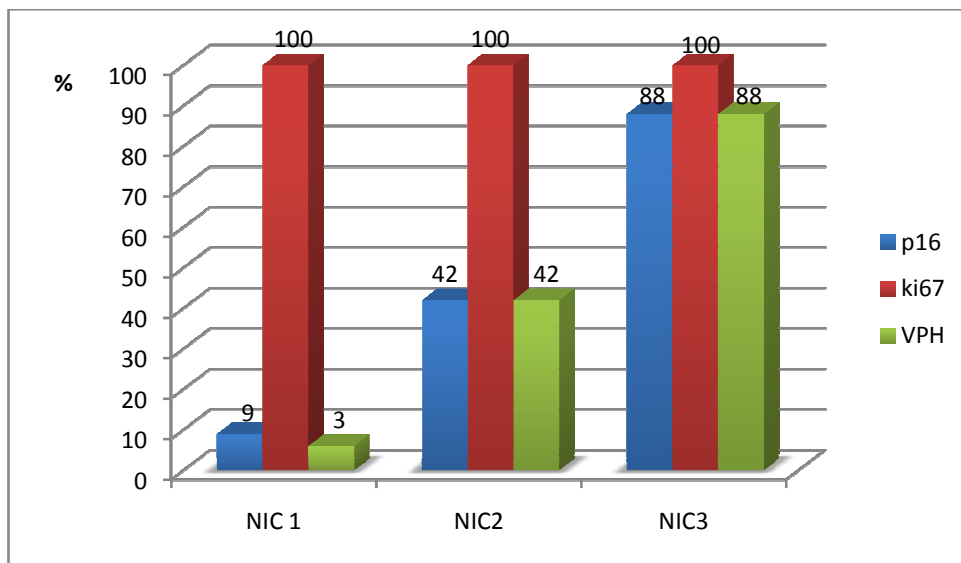


RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

BIOPSIAS NIC1, NIC2 Y NIC 3 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA

	NIC1		NIC2		NIC3	
	Fx	%	Fx	%	Fx	%
P16	12	9	8	42	7	88
Ki67	141	100	19	100	8	100
VPH	4	3	8	42	7	88

BIOPSIAS NIC1, NIC2 Y NIC 3 CON POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA



PATRONES DE EXPRESIÓN DE p16 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

A los resultados se les otorgo un valor numérico para facilitar su análisis, a saber:

0 = Negativo

1 = Marcación positiva nuclear y/o citoplásmica en el tercio basal del epitelio

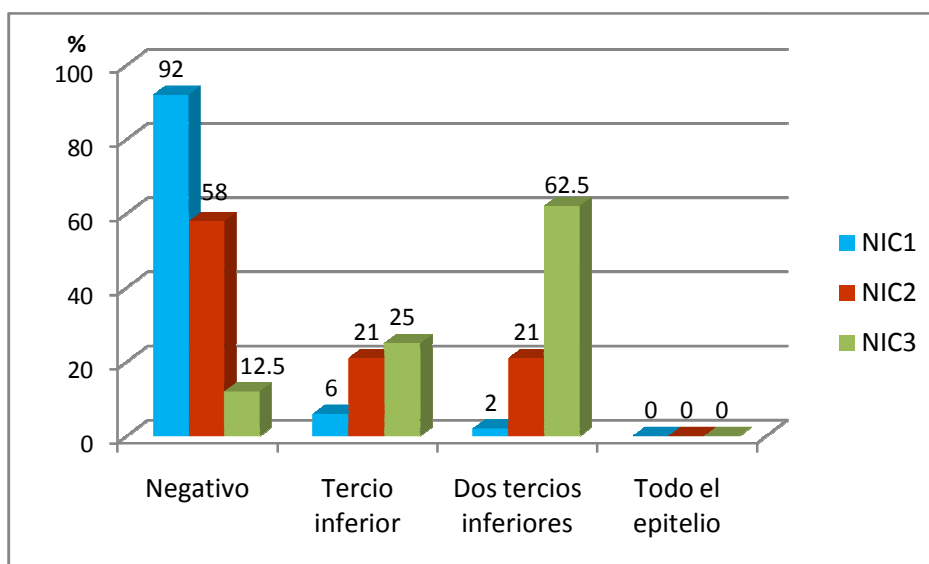
2 = Marcación positiva nuclear y/o citoplásmica en los dos tercios basales del epitelio

3 = Marcación positiva nuclear y/o citoplásmica en todo el espesor del epitelio

EXPRESIÓN DE p16 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

	NIC1		NIC2		NIC3	
	Fx	%	Fx	%	Fx	%
0	129	92	11	58	1	12.5
1	9	6	4	21	2	25
2	3	2	4	21	5	62.5
3	0	0	0	0	0	0

EXPRESIÓN DE p16 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO



PATRONES DE EXPRESIÓN DE ki67 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

A los resultados se les otorgo un valor numérico para facilitar su análisis, a saber:

0 = Negativo

1 = Marcación positiva nuclear solo en el estrato basal y parabasal

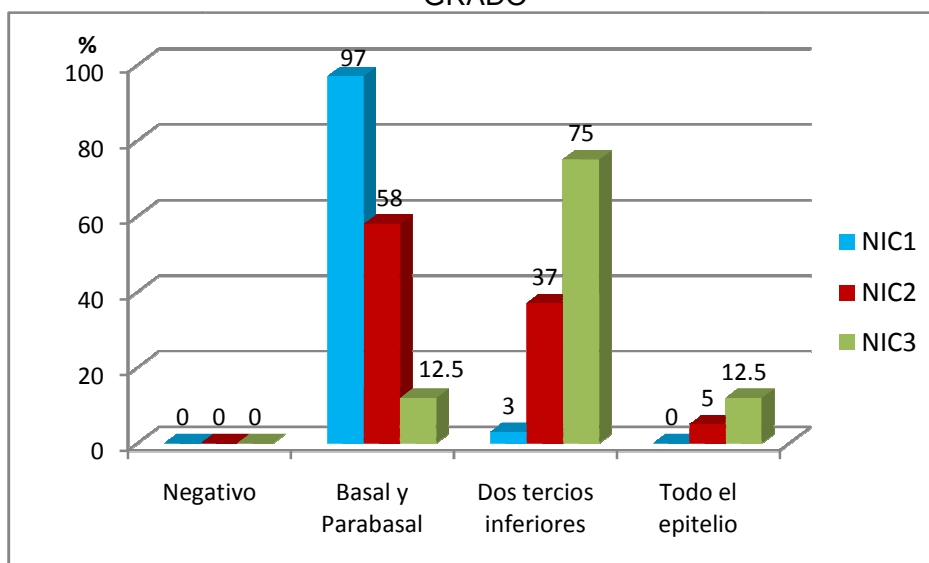
2 = Marcación positiva nuclear en los dos tercios basales del epitelio

3 = Marcación positiva nuclear en todo el espesor del epitelio

EXPRESIÓN DE ki67 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

	NIC1		NIC2		NIC3	
	Fx	%	Fx	%	Fx	%
0	0	0	0	0	0	0
1	137	97	11	58	1	12.5
2	4	3	7	37	6	75
3	0	0	1	5	1	12.5
Total	141	100	19	100	8	100

EXPRESIÓN DE ki67 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO



PATRONES DE EXPRESIÓN DE VPH EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

A los resultados se les otorgo un valor numérico para facilitar su análisis, a saber:

0 = Negativo

1 = Marcación positiva en menos del 25% de células escamosas

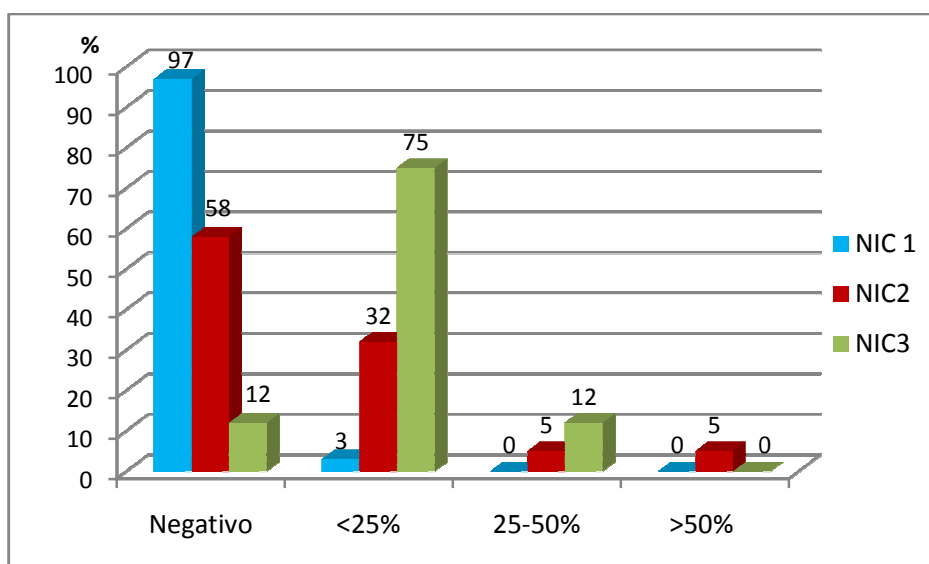
2 = Marcación positiva entre 25 a 50% de células escamosas

3 = Marcación positiva en más del 50% de células escamosas

EXPRESIÓN DE VPH EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

	NIC1		NIC2		NIC3	
	Fx	%	Fx	%	Fx	%
0	137	97	11	58	1	12.5
1	4	3	6	32	6	75
2	0	0	1	5	1	12.5
3	0	0	1	5	0	0
Total	141	100	19	100	8	100

EXPRESIÓN DE VPH EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO

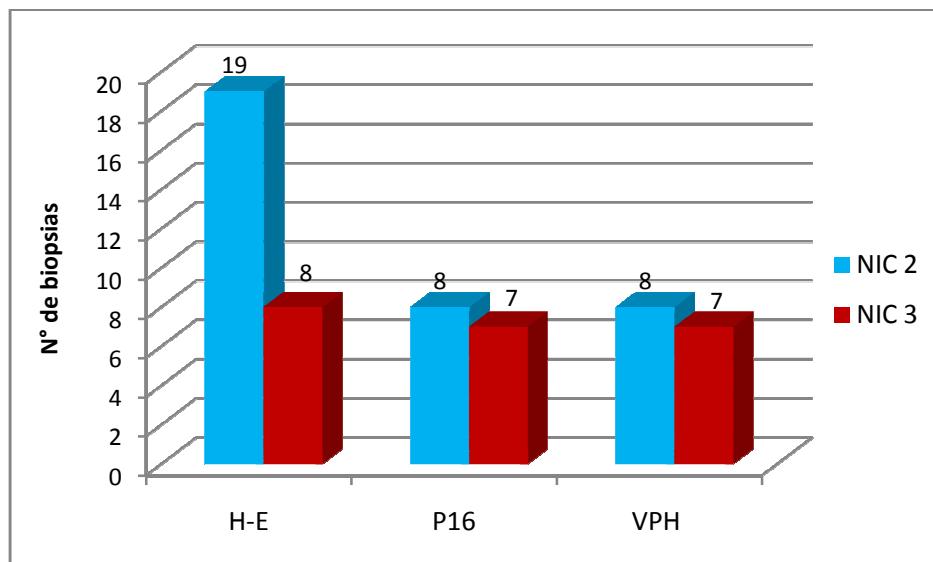


EXPRESIÓN DE MARCADORES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE ALTO GRADO

EXPRESIÓN DE P16 Y VPH MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN NIC 2 Y NIC 3

	H-E	P16	VPH
NIC 2	19	8	8
NIC 3	8	7	7

EXPRESIÓN DE P16 Y VPH MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN NIC 2 Y NIC 3



Correlacionando los datos del diagnóstico histológico con H-E y los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica, utilizando el test estadístico de chi cuadrada, se obtuvieron los siguientes resultados:

$P = 0.05$ para la asociación entre la expresión de p16 y el grado de NIC

$P = 0.05$ para la asociación entre la expresión de VPH y el grado de NIC

$P = 0.01$ para la asociación entre la expresión de p16 y la positividad a VPH en lesiones de alto grado.

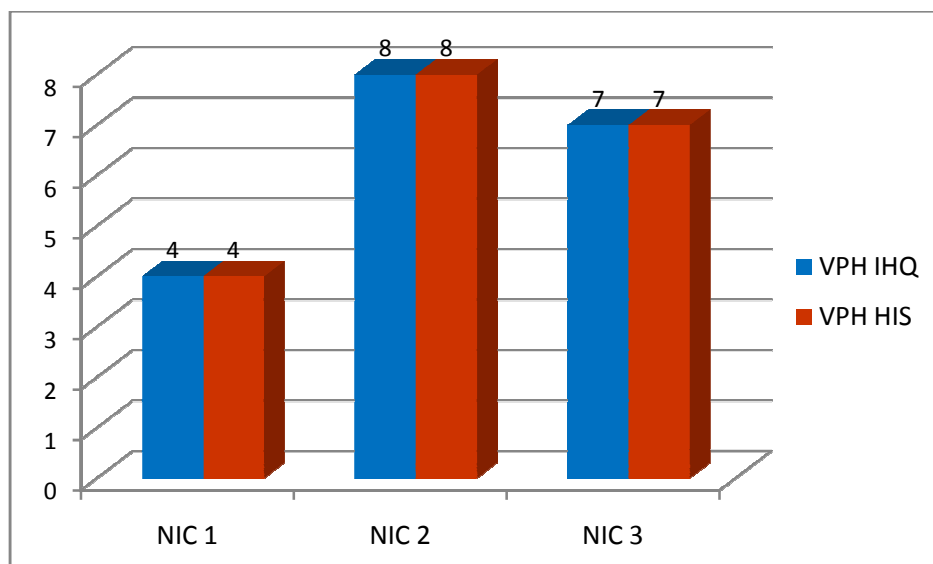
RESULTADOS DE HIBRIDACIÓN IN SITU PARA VPH

POSITIVIDAD PARA VPH MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA COMPARADA CON HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDA DE AMPLIO ESPECTRO

Diagnóstico histológico H-E	Positividad para VPH IHQ	Positividad para VPH HIS
NIC 1	4	4
NIC 2	8	8
NIC 3	7	7

$p = 0.01$

POSITIVIDAD PARA VPH MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA COMPARADA CON HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDA DE AMPLIO ESPECTRO



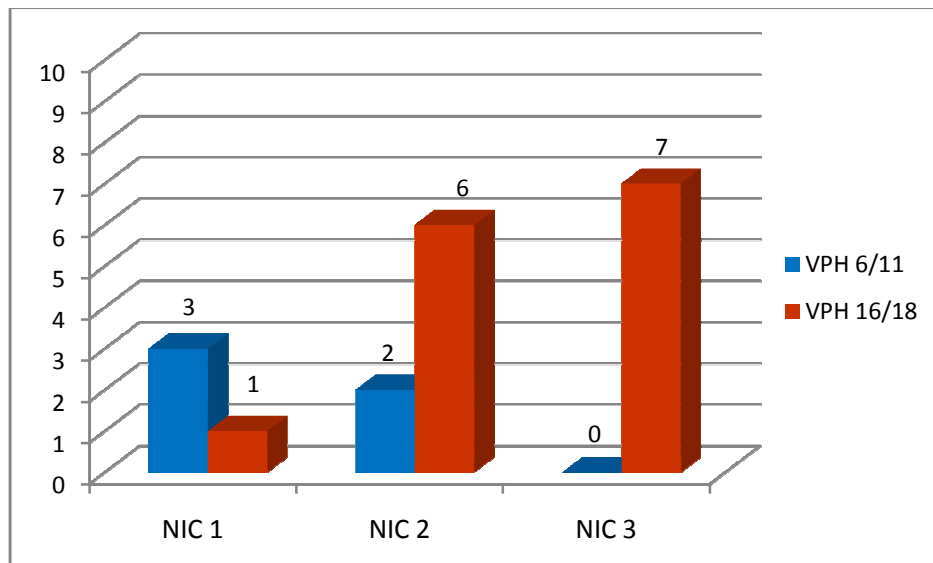
$p = 0.01$

TIPIFICACIÓN DE VPH MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU

SUBTIPO DE VPH MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS DE BAJO Y ALTO RIESGO

	HIS Sonda de bajo riesgo VPH 6/11	HIS Sonda de alto riesgo VPH 16/18
NIC 1	3	1
NIC 2	2	6
NIC 3	0	7

SUBTIPO DE VPH MEDIANTE HIBRIDACION IN SITU CON SONDAS DE BAJO Y ALTO RIESGO



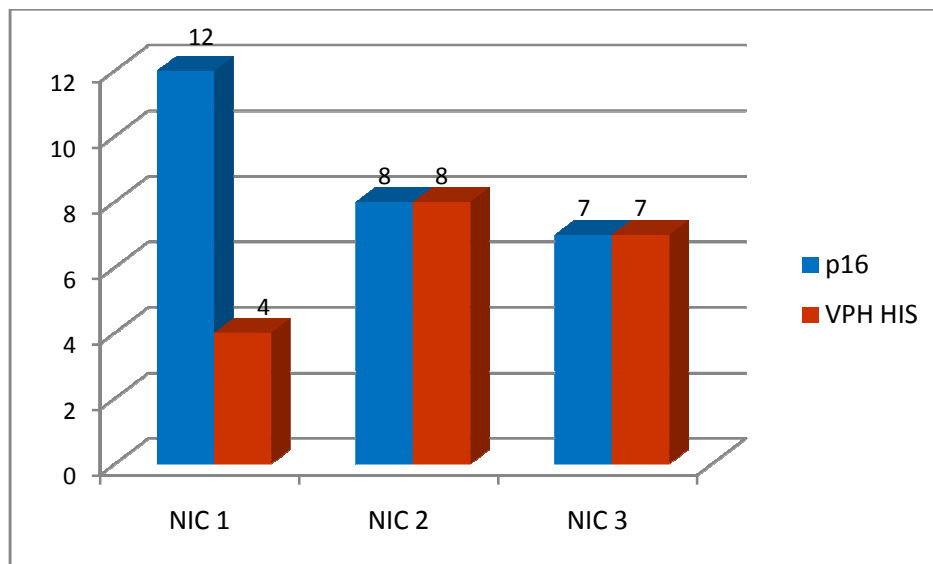
POSITIVIDAD PARA VPH CON HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDA DE AMPLIO ESPECTRO COMPARADA CON POSITIVIDAD PARA P16 CON INMUNOHISTOQUÍMICA

RELACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS PARA P16 MEDIANTE IHQ COMPARADA CON MUESTRAS POSITIVAS PARA VPH MEDIANTE HIS

Diagnóstico histológico H-E	Positividad para p16 IHQ	Positividad para VPH IHS
NIC 1	12	4
NIC 2	8	8
NIC 3	7	7

p = 0.04

RELACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS PARA P16 MEDIANTE IHQ COMPARADA CON MUESTRAS POSITIVAS PARA VPH MEDIANTE HIS



p = 0.04

A continuación se muestra una serie de fotomicrografías con algunos de los casos representativos de este estudio.

CASO # 20. NIC 1

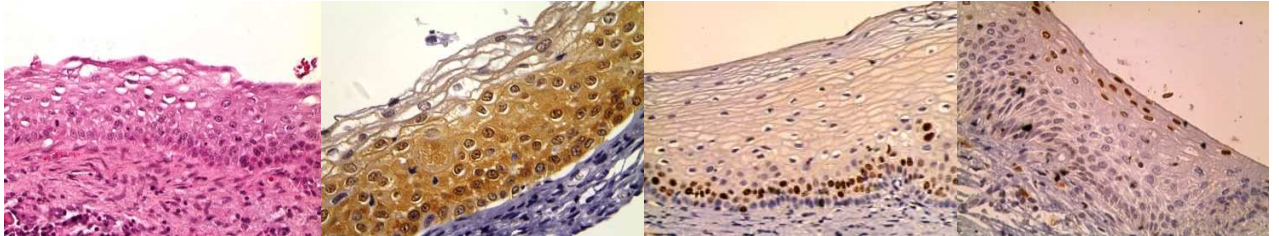


Fig. 1. A. H-E NIC 1 30x. **B.** p16 tinción positiva nuclear y citoplásmica en dos tercios del epitelio, 30x. **C.** ki67 positividad nuclear en el estrato parabasal, 30x. **D.** positividad nuclear para VPH, 30x.

CASO # 110. NIC 2

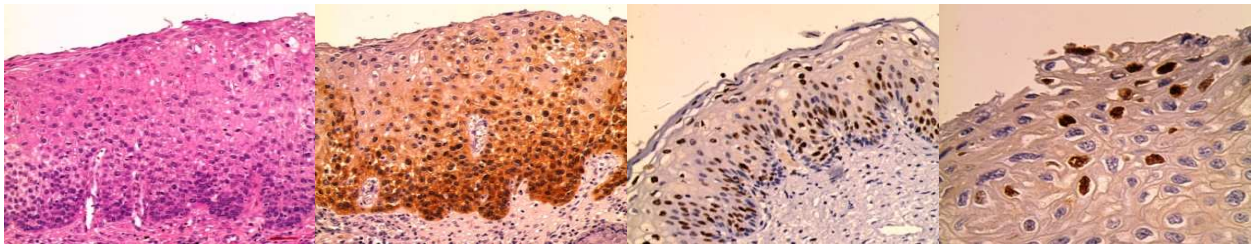


Fig. 2. A. H-E NIC 2 30x. **B.** p16 tinción positiva nuclear y citoplásmica en dos tercios del epitelio, 30x. **C.** ki67 positividad nuclear en todo el espesor del epitelio, 30x. **D.** positividad nuclear para VPH, 40x.

CASO # 11. NIC 3

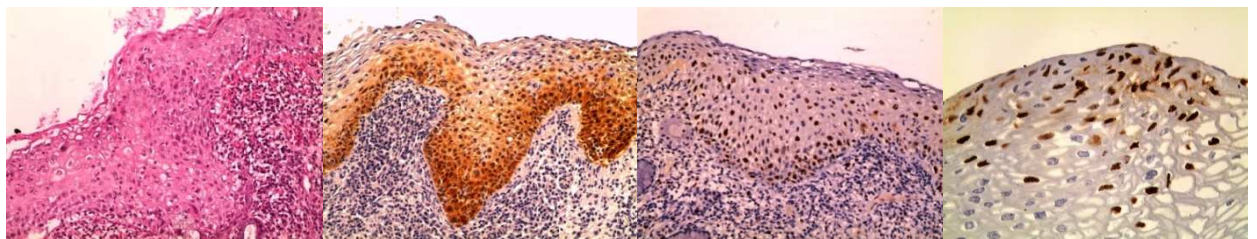


Fig. 3. A. H-E NIC 3 30x. **B.** p16 tinción positiva nuclear y citoplásmica en todo el espesor del epitelio, 30x. **C.** ki67 positividad nuclear en todo el espesor del epitelio, 30x. **D.** positividad nuclear para VPH, 40x.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 168 biopsias de cérvix teñidas con hematoxilina y eosina.

141 biopsias tenían diagnóstico de NIC1, de las cuales 12 (8.5%) mostraron inmunohistoquímica positiva para p16, 141 (100%) mostraron positividad para ki67, 4 (3%) mostraron positividad para VPH.

De las 19 biopsias diagnosticadas como NIC2, 8 (42%) de ellas mostraron inmunohistoquímica positiva para p16, 19 (100%) mostraron positividad para ki67 y 8 (42%) mostraron positividad para VPH.

De las 8 muestras con el diagnóstico de NIC3, 7 (88%) de ellas mostraron inmunohistoquímica positiva para p16, 8 (100%) mostraron positividad para ki67 y 7 (88%) mostraron positividad para VPH.

Para valorar la inmunoexpresión de p16 se tomo en cuenta que la tinción fuera tanto nuclear como citoplásmica, así mismo también se agrego un valor numérico dependiendo del tercio del epitelio escamoso en donde se presentara la expresión.

Respecto a las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado el 92% de estas no presentaron expresión para p16, lo cual era esperado ya que p16 suele expresarse mayormente en lesiones de alto grado; una posible explicación para la poca expresión de p16 en lesiones de bajo grado puede ser que cierto porcentaje son causadas por VPH de bajo riesgo, debido a que la afinidad de la proteína E7 a Rb es menor en los tipos de bajo riesgo, no habrá sobreexpresión de p16.

También tenemos que en 4 de los 19 casos de NIC2 hubo expresión en los dos tercios inferiores del epitelio. Respecto a los NIC 3 un caso no mostro positividad, 2 casos mostraron positividad en los dos tercios inferiores y 5 casos (62.5%) mostraron positividad en todo el espesor del epitelio, todo esto demuestra que su expresión incrementa de acuerdo a la severidad de las alteraciones histológicas.

Esta heterogeneidad en la inmunoexpresión de p16 puede representar una diferencia en el potencial de agresividad entre las lesiones de bajo grado y como se ha comentado en la literatura tal vez refleja los diferentes estados físicos del virus (episomal, integrado); de tal modo que se puede sugerir que los 12 casos de las NIC1 que expresaron de forma intensa p16 probablemente tengan una gran cantidad de VPH integrado y por lo tanto tengan mayor riesgo de progresión. Así también hubo un caso de NIC3 que fue negativo a p16, lo cual nos podría sugerir que esta lesión se encuentra en una fase de regresión y/o eliminación del virus.

Para valorar la positividad de ki67 se tomo en cuenta que hubiera tinción a nivel del núcleo y también se asignó un valor numérico dependiendo del estrato del epitelio en el cual se presentara la positividad.

Todas las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado presentaron positividad para ki67, el 97% de estas presentaron positividad únicamente en el estrato basal/parabasal, mientras que 3% presentaron positividad en los dos tercios inferiores del epitelio. Como se comento previamente, ki67 es un marcador de proliferación celular por lo que era de esperarse que fuera positivo en la totalidad de las muestras estudiadas, por lo menos en el estrato basal/parabasal, ya que el epitelio exocervical se encuentra en un proceso constante de regeneración.

Respecto a las lesiones de alto grado, tuvimos que de las NIC 2, ki67 fue positivo en el estrato basal/parabasal en 11 casos (58%), se expreso hasta el tercio medio en 7 casos (37%) y fue positivo en todo el espesor del epitelio en un caso (5%). En los NIC 3, ki67 se expreso en el estrato basal/parabasal en un caso (12.5%), en los dos tercios inferiores en 6 casos (75%) y en todo el espesor del epitelio en un caso (12.5%). Estos resultados fueron concordantes, pues de acuerdo a lo revisado en la literatura, se esperaba que la expresión de ki67 se presentara en los tercios medio y superior del epitelio en las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado, ya que la infección por VPH activa la progresión del ciclo celular del huésped.

Para valorar la expresión inmunohistoquímica del antígeno para VPH se tomaron en cuenta dos parámetros, primero que hubiera una intensa expresión nuclear y segundo, el porcentaje de células del epitelio plano en que se expresaba.

Así obtuvimos que en el 97% de las NIC1 no hubo expresión de VPH y en 3% de estas fue positiva en menos del 25% de las células. En 58% de las NIC 2 fue negativo, en 32% de expreso en menos del 25% de las células, en 5% se expreso entre el 25-50% de las células y en 5% de expreso en más del 50% de las células. Respecto a los NIC 3 en un caso no hubo expresión de VPH, en el 75% se expreso en menos del 25% de las células, en el 12.5% se expreso entre el 25-50% de las células.

De acuerdo a los resultados anteriores se puede sugerir que de las 141 NIC1 diagnosticadas con HE, al menos 4 de ellas tienen un gran riesgo de progresión a lesión de alto grado ya que presentaron intensa positividad para todas las tinciones de inmunohistoquímica realizadas. Mientras que un caso de los NIC 3 fue negativo tanto para p16 como para VPH y ki67 solamente lo expreso en el estrato basal/parabasal.

Correlacionando los datos del diagnóstico histológico con H-E y los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica, utilizando el test estadístico de chi cuadrada, se obtuvieron los siguientes resultados:

$P = 0.05$ para la asociación entre la expresión de p16 y el grado de NIC

$P = 0.05$ para la asociación entre la expresión de VPH y el grado de NIC

$P = 0.01$ para la asociación entre la expresión de p16 y la positividad a VPH en lesiones de alto grado.

Respecto a los resultados obtenidos mediante la hibridación in situ en tejido, primero se realizó con una sonda de amplio espectro, así obtuvimos que todas las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado que fueron positivas para VPH mediante inmunohistoquímica, también fueron positivas para VPH mediante hibridación in situ con sonda de amplio espectro, de esta forma correlacionamos los datos y aplicamos el test estadístico de chi cuadrada y se obtuvo una $p = 0.01$, lo que indica que la asociación es estadísticamente significativa, esto representa una seguridad del 99% de que existe una asociación entre la positividad para VPH mediante inmunohistoquímica y la positividad para VPH mediante hibridación in situ.

Posteriormente se realizó la tipificación del subtipo de virus, utilizando dos sondas, una de bajo riesgo (VPH 6/11) y una de alto riesgo (VPH 16/18), con lo que obtuvimos que de las cuatro NIC 1 que fueron positivas a VPH con sonda de amplio espectro, tres fueron positivas a VPH 6/11 y una fue positiva a VPH 16/18, lo cual es un dato de suma importancia, ya que esta última tiene un gran riesgo de progresar a carcinoma y sin embargo, no se le brindó el tratamiento adecuado, ya que recordemos que las lesiones de bajo grado se mantienen en observación, además si correlacionamos con la expresión de marcadores de inmunohistoquímica, tenemos que dicha biopsia mostró una positividad intensa y difusa para p16 en los dos tercios inferiores del epitelio, lo cual nos sugiere que existe una relación entre la intensidad de la expresión de p16 y la presencia de VPH de alto riesgo.

Es por ello, que se realizó una comparativa entre todas las lesiones de bajo y alto grado que expresaron p16, con las lesiones que fueron positivas para VPH mediante hibridación in situ, de esta forma obtuvimos que todas las NIC 2 y NIC 3 que expresaron p16 también fueron positivas para VPH mediante HIS, mientras que de las 12 NIC 1 que expresaron p16, solo 4 fueron positivas para VPH mediante HIS; a estos datos se les aplicó el test estadístico de chi cuadrada, obteniendo una $p = 0.04$, lo que indica que la asociación es estadísticamente significativa, esto representa una seguridad del 96% de que existe una asociación entre la expresión de p16 mediante inmunohistoquímica y la positividad para VPH mediante hibridación in situ y no solo es producto del azar.

IX. CONCLUSIONES

El estudio histopatológico continua siendo el estándar de oro en el diagnóstico y gradificación de las lesiones escamosas intraepiteliales de cérvix, sin embargo, la importante variabilidad interobservador ha llevado a la búsqueda de nuevos biomarcadores que ayuden a disminuir la variabilidad interobservador y a mejorar la certeza diagnóstica en lesiones escamosas intraepiteliales.

La sobreexpresión de p16 ha demostrado ser de gran utilidad en la distinción entre procesos reactivos, displásicos y carcinomas in situ. Existe relación directamente proporcional entre la sobreexpresión de p16 (tanto en intensidad de tinción como en el tercio del epitelio ocupado por células positivas) y el grado de lesión intraepitelial cervical, es decir, las LEIAG y carcinomas tienden a mostrar mayor sobreexpresión con una intensidad de marcación de 3+ y ocupando todo el espesor del epitelio cervical. También se ha encontrado una relación entre la intensidad de la expresión de p16 y los VPH de alto riesgo, por lo tanto, p16 representa un marcador específico y sensible de neoplasia cervical.

Ki67 también ha demostrado ser de utilidad en el diagnóstico de neoplasias cervicales. Si una lesión presenta características morfológicas intermedias entre NIC1 y NIC2, podemos hacer el diagnóstico de LIEAG si Ki67 presenta una intensa positividad nuclear que se extiende al tercio superior del epitelio y si p16 presenta positividad nuclear y citoplásmica en al menos dos tercios del epitelio.

Debido a que ki67 se expresa en todas las células en proliferación, incluyendo lesiones inflamatorias o reactivas, no es un marcador específico de neoplasia o infección por VPH, pero si puede ser un marcador indirecto.

Cuando recurrimos a marcadores auxiliares en lesiones difíciles de cérvix siempre utilizamos ambos marcadores en conjunto con las características morfológicas. Ninguna prueba auxiliar es 100% sensible y específica, es por ello que nosotros sugerimos el uso en conjunto de p16 y ki67 en lesiones que son morfológicamente sospechosas de NIC, además su uso en conjunto con ISH para VPH ha demostrado que mejora la certeza diagnóstica y disminuye significativamente la variabilidad interobservador.

En este estudio hemos podido observar, en concordancia con otros trabajos, una alta asociación entre la sobreexpresión de p16 y la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales de cérvix, además de una estrecha asociación entre la sobreexpresión de p16 y los VPH de alto riesgo, con lo anterior, podemos concluir que los marcadores de inmunohistoquímica pueden disminuir la variabilidad interobservador y con ello aportar un grado mayor de objetividad al diagnóstico histopatológico, además de que serían una herramienta útil para seleccionar grupos de individuos de alto riesgo de progresión de la enfermedad.

La importancia del uso de este conjunto de técnicas radica en emitir un diagnóstico correcto, ya que el tratamiento es diferente dependiendo si se trata de una lesión de bajo grado o de una lesión de alto grado. Una paciente con diagnóstico de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado diagnosticada solo con HE, no amerita manejo, sino únicamente vigilancia, cuando en realidad podría tener altas posibilidades de progresar a una lesión de alto grado y eventualmente carcinoma invasor, tal es el caso de 12 de las pacientes en este estudio, que tenían diagnóstico de NIC 1 con HE, pero que tuvieron sobreexpresión de p16 y 4 de ellas presentaron positividad para VPH, es decir, que se trata de pacientes con altas probabilidades de desarrollar una lesión de alto grado y que no recibieron manejo.

Por el contrario, también emitir un sobrediagnóstico trae importantes consecuencias para las pacientes, desde el punto de vista económico, hasta sexual, social y psicológico; en este estudio se encontró que una paciente con diagnóstico de NIC3 mediante HE no presentó expresión con ninguna de las tinciones de inmunohistoquímica, además tuvo negatividad para VPH; también de las 19 pacientes con NIC 2, solo 8 presentaron positividad para p16 y VPH; esto quiere decir, que se dio manejo a pacientes que no lo ameritaban. Es por ello, que la trascendencia de este estudio en la práctica diaria es decidir el tratamiento adecuado para cada paciente y evitar las consecuencias de un sobre o un subdiagnóstico.

La utilización de marcadores de inmunohistoquímica junto con la interpretación morfológica, juegan un papel importante en el diagnóstico de lesiones escamosas intraepiteliales; estos marcadores cada vez son más importantes para emitir un diagnóstico correcto y su uso es cada vez más viable para la mayoría de los laboratorios de patología, pues requieren de una técnica confiable y reproducible, además de que económicamente son accesibles (su costo es menor al de un sobretratamiento) y evita las consecuencias de un subdiagnóstico.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso P y cols. Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. México, Editorial Medica Panamericana, 2005; 2ª ed. 1-7, 57-62.
2. Dallenbach G. Histopatología de cuello uterino, atlas a color. Buenos Aires, Ediciones Journal, 2006; 2ª ed. 8-31, 86-91.
3. Kumar. Robins y Cotran, Patología estructural y funcional. España, Elsevier, 7ª ed. 1064-1066, 1076-1082.
4. Thomison J. Human Papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Human Pathology 2008; 39, 154-166.
5. De la Torre F. Lesión premaligna escamosa del cuello uterino, un enfoque actualizado. Patología 2008; 46(4): 332-342.
6. Pinto A. Molecular markers of early cervical neoplasia. Mini-symposium: Pathology of the uterine cervix. Diagnostic Histopathology 16:10 2010: 445-453.
7. Conesa-Zamora P. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, ki-67, cyclin D1, p53 and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma. Am J Clin Pathol 2009; 132: 378-390.
8. Jordan L. Pathology of the cervix: Recent developments. Clinical Oncology 2004; 16: 248-254.
9. Canedo A. Expresión de p16INK4a en biopsias de cervix uterino. Utilidad en el diagnóstico diferencial entre cervicitis crónica reactiva, neoplasia intraepitelial cervical de bajo y alto grado y carcinoma invasor. An Med Mex 2006; 51 (2): 49-57.
10. García J. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. Invest Clin 2010; 51 (2): 193-208.

11. García A. Inmunohistoquímica de la proteína p16INK4a en biopsias y extendidos cervicovaginales y su relación con VPH por PCR. *Medicina* 2008; 68: 428-432.
12. Feng W. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. *Modern Pathology* 2007, 20: 961-966.
13. Gómez F. Estudio de la infección por virus del papiloma humano en biopsias del tracto genital femenino inferior mediante técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ. *Univ Comp Mad* 1994: 7-60.
14. García J. Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y cáncer cervical. Revisión. *Invest Clin* 2009; 50 (2): 241-250.
15. LaCruz C. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda). *Rev Es Patol* 2003; 36 (1): 5-10.
16. 4. Kalof A. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 2007; 60: 449-455.
17. Hernández D. Association between high risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecologic Oncology* 2003: 310-317.
18. Lerma E. Factores que intervienen en la diseminación del cáncer de cuello uterino. *Rev Esp Patol* 2005; 38(4): 201-206.
19. Jorge D. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología* 2007; 45 (3): 126-140.
20. Hernández R. Análisis de la presencia de la molécula co-estimuladora CD68 Y de Interleucina 6 en lesiones NIC I, II y III en una población abierta del estado de Chihuahua. *Inst Polit Nac* 2007: 1-15.
21. Melo A. Estudio comparativo de detección del virus del papiloma humano en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev Med Chile* 2005; 133: 639-644.

22. Melo A. Tipificación del virus del papiloma humano en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la región IX Chile. Rev Med Chile 2003; 131: 1382-1390.
23. Agoff N. P16 INK4a Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with ki-67 expression and detection of high risk HPV types. Mod Pathol 2003; 16(7): 665-673.
24. Walts A. p16, ki-67 and BD ProEx C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Human Pathology 2009; 40: 957-964.
25. Curiel J. Biopsia del cuello uterino ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico? Utilidad de p16 INK4a para lograrlo. Ginecol Obstet Mex 2007; 75(10): 615-620.
26. Gurrola C. P16INK4a inmunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. Gynecologic Oncology 2008; 11: 120-124.
27. 16. Van Niekerk D. P16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: Methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing. Gynecologic Oncology 2007; 107: 233-240.
28. Panjkovic M. Ki-67 expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Arch Oncol 2006; 14(1-2) 23-25.
29. Cabibi D. Histological Features and ki-67 index in cervical atypical lesions. Am J Infect Dis 2008; 4(3): 193-199.
30. Archila M. Antígenos de VPH en lesiones intraepiteliales escamosas. Inmunohistoquímica con p16ink4a, viroactiv y ki67. Repert de med y cir 2008; 17 (3):136-144.