

ARTÍCULO

Utilidad de la detección inmunocitoquímica de p16, en el diagnóstico diferencial de lesiones reactivas y neoplásicas en muestras de citología cervical.

Salus

Rula Izzeddin¹, María F. Ladera¹, María J. Hurtado¹, Aldo Reigosa^{1,2}, Marianela Zavala², Cely Mora³, Eddy V. Mora^{2,4}, Carlos Gadea⁴, Mai-Lyng Hung², Carmelina Tino⁴, Gustavo Bracho⁴.

RESUMEN

Recientemente, ha sido identificado p16^{INK4a} como un biomarcador para lesiones neoplásicas cervicales inducidas por VPH y se ha sugerido como ayuda diagnóstica para dichas lesiones. Este estudio se ha realizado con la finalidad de determinar la utilidad de la detección inmunocitoquímica de p16 en el diagnóstico preciso y diferencial entre lesiones reactivas y neoplásicas, a partir de una serie de 40 muestras de citología cervical, incluyendo 21 casos negativos para malignidad, 3 con ASCUS, 13 con LEI-BG y 3 con LEI-AG. Se observó sobreexpresión de p16 en sólo 20% de los casos, sin una correlación significativa con el resultado citológico. Sin embargo, tras hacer la relación de dichos resultados con el diagnóstico histológico respectivo, se comprobaron 2 casos negativos para malignidad, 32 LEI-BG (VPH y/o NIC-I) y 6 LEI-AG (NIC-II y/o NIC-III). Se evidenció que la mayor positividad de p16 (67%) correspondió a los casos con LEI-AG, mientras que sólo 13% de los casos con LEI-BG fueron positivos a la inmunotinción para p16. Esto sugiere que en casos dudosos, el p16 puede ser usado para la confirmación del diagnóstico y además, puede ayudar a predecir la minoría de casos con LEI-BG que presentan mayor riesgo a progresar a LEI-AG y eventualmente a carcinoma invasor.

Palabras clave: p16^{INK4a}, Inmunocitoquímica, ASCUS, LEI-BG, LEI-AG.

ABSTRACT

Use of the immunocytochemical detection of p16 in the differential diagnosis of reactive and neoplastic lesions from cervical smear samples.

Recently, p16^{INK4a} has been identified as a biomarker for neoplastic cervical lesions caused by HPV, and its presence has been proposed as a diagnostic tool for such lesions. Thus, the purpose of this study was to determine the use of the immunocytochemical detection of p16 in the specific and differential diagnosis of reactive and neoplastic lesions. A series of 40 cervical smear samples were used, including 21 cases negative for malignancy, 3 with ASCUS, 13 with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), and 3 with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Only 20% of the cases showed overexpression of p16, with no significant correlation with the cytological result. However, after matching cytological results with their respective histological diagnosis, 2 cases were found to be negative for malignancy, 32 LSIL (HPV and/or CIN-1), and 6 HSIL (CIN-2 and/or CIN-3). It was observed that the highest positive rate of p16 (67%) was in the cases with HSIL, while only 13% of the cases with LSIL were positive for p16 immunostaining. This suggests that p16 can be used to confirm the diagnosis in doubtful cases, and also help predicting the few cases with LSIL that have a higher risk of becoming HSIL and eventually invasive carcinoma.

Key words: p16^{INK4a}, HPV, immunocytochemistry, ASCUS, LSIL, HSIL, CIN

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical es uno de los tipos que más comúnmente afecta a las mujeres alrededor del mundo, con cerca de 510.000 nuevos casos y 288.000 muertes cada año, siendo el segundo después del cáncer de mama en incidencia y mortalidad (1). La incidencia más alta en las estadísticas de cáncer de cuello uterino se encuentra en Latinoamérica y el Caribe, hallándose que en Venezuela 38,3 de cada 100.000 mujeres son afectadas por la enfermedad cada año (2).

Hasta la fecha, los esfuerzos para la prevención del cáncer cervical se han enfocado en la pesquisa de mujeres sexualmente activas por citología cervical con la tinción de Papanicolaou (Pap). Aunque, el Pap ha reducido eficientemente la morbilidad y mortalidad del cáncer cervical en los países desarrollados, éste ocurre todavía con alta frecuencia en las mujeres de los países en vías de desarrollo, debido en parte, a que la evaluación del Pap se basa en técnicas diagnósticas subjetivas, lo cual implica errores humanos (3).

¹ Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.
Departamento de Morfofisiopatología.

² Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC),
Valencia, Estado Carabobo.

³ Departamento de Farmacología,
Universidad de Carabobo.

⁴ Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño"
Valencia, Estado Carabobo.

Proyecto financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC).

Correspondencia: Aldo Reigosa

E-mail: areigosa@uc.edu.ve

Tel.: +58-241-8666243

Dirección Postal: Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).
Facultad de Ciencias de la Salud, Av. Universidad, Bárbula,
Valencia, Venezuela

Recibido: Mayo 2008

Aceptado: Octubre 2008

Esta situación es particularmente relevante en el diagnóstico de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) y lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEI-BG), donde se ha reportado gran discrepancia interobservador. Estas limitaciones han creado una fuerte demanda de marcadores específicos y sensibles que objetivamente resuelvan los dilemas diagnósticos (4).

Esta deficiencia podría ser compensada en un futuro, gracias al descubrimiento de una proteína que regula la progresión del ciclo celular denominada p16^{INK4}, un producto del gen supresor de tumores CDKN2A que se encarga de actuar como un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (cdk). Estas últimas, a su vez, inhiben por fosforilación la proteína del retinoblastoma (pRb), la cual en estado hipofosforilado, inhibe el ciclo celular al mantener unidos e inactivos los factores de control de la división celular, impidiendo de esta forma que el ciclo celular progrese desde la fase G1 a la fase S (5).

Recientes estudios han demostrado la sobreexpresión del p16^{INK4A} asociada a ciertas cepas de virus papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), identificados como el mayor agente causal de las neoplasias cervicales; se estima que el volumen de mujeres infectadas por el VPH alrededor del mundo es de cerca de 300 millones, siendo considerada la infección de transmisión sexual más frecuente (6).

En la citología se ha adoptado la terminología propuesta por el sistema Bethesda, actualizado en el 2001, según el cual las alteraciones del epitelio escamoso se denominan lesiones escamosas intraepiteliales (LEI), las cuales se subdividen a su vez en lesiones de bajo grado (LEI-BG) y alto grado (LEI-AG) según su riesgo de progresión a carcinoma invasivo. Además, se reconoce una serie de atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) (7).

Por su parte, en el examen histológico, considerado el método diagnóstico clave de las lesiones preinvasivas de cuello uterino, las lesiones cervicales se clasifican según los criterios de Richart en neoplasias cervicales intraepiteliales (NIC) de grado 1, la expresión morfológica de la infección transitoria por el VPH, y las NIC de grado 2 y 3, que se consideran auténticas neoplasias, en fase preinvasora (8).

Cabe destacar que, a pesar de la asociación existente entre la infección por el VPH y el desarrollo de cáncer cervical, el uso de pruebas para detectar la presencia del ADN del VPH no distingue entre infecciones persistentes y transitorias con el virus. Esto debido a que la infección por VPH evoluciona de forma natural hacia la curación espontánea en la gran mayoría de los casos (más del 90%) sin efectos clínicos deletéreos, particularmente en mujeres jóvenes (6). De este modo, no hay criterios para predecir en cada caso la ulterior persistencia o evolución de los mismos. De allí, que el uso del

marcador p16 se ha sugerido para complementar las pruebas de detección de VPH y como una herramienta adjunta en el diagnóstico de LEI, permitiendo discriminar los grupos con potencial de progresión neoplásica (6,9).

Estos descubrimientos han despertado un gran interés científico alrededor del mundo, evidenciado por numerosos estudios, tal como el realizado en Alemania en el año 2004, por Trunk y col. (10), para lo cual usaron 90 muestras de citologías en base líquida. Se utilizó igualmente la técnica inmunocitoquímica para p16, resultando que en el 10% de los extendidos de pacientes con citologías dudosas, pocas células p16-positivas fueron encontradas, mientras que el 95% de las LEI-AG fueron positivas a la expresión de p16. Concluyendo así, que la inmunotinción para p16 puede ayudar en la interpretación de las muestras citológicas de cuello uterino y facilitar un diagnóstico más preciso.

Igualmente en el año 2004, Sahebali y col. (11) en Bélgica, analizaron los resultados inmunocitoquímicos obtenidos a partir de 291 muestras de citologías cervicales en base líquida, donde los resultados inmunopositivos fueron significativamente más altos para las LEI-BG en comparación a las muestras negativas y más importante aún, los resultados inmunopositivos fueron significativamente más altos para las LEI-AG en comparación a los otros grupos citológicos tales como ASCUS y LEI-BG.

Por otro lado, en China en el año 2005, Nieh y col. (12) determinaron la expresión del p16^{INK4a} por inmunocitoquímica en 66 muestras citológicas de cuello uterino con ASCUS, de las cuales 40 (60,6%) resultaron positivas y las otras 26 (39,4%) fueron negativas para p16 y exhibieron predominantemente cambios reactivos. Los resultados indicaron una estrecha asociación entre la expresión de p16 en muestras citológicas categorizadas como ASCUS, con la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales y de cepas de VPH-AR. A la inversa, se demostró una clara asociación entre la no expresión del p16 y la ausencia de lesiones cervicales.

En ese mismo año, fue realizado un estudio similar en Estados Unidos, por Bose y col. (13) quienes investigaron el p16 como un biomarcador sustituto para un subgrupo de neoplasias cervicales asociadas al VPH, utilizando para el mismo 107 muestras citológicas, concluyendo que el mayor índice de positividad (80%) y los niveles más altos de expresión fueron observados en LEI-AG, mientras que en los casos de ASCUS y de LEI-BG la positividad del p16 fue observada en el 21% de las muestras, por lo que el p16 podría actuar como un marcador predictor en la progresión de LEI-BG a LEI-AG.

Más recientemente, Benevolo y col. (14), en el año 2006 en Italia, evaluaron la expresión del p16 como parámetro pre-

dictivo para lesiones cervicales de bajo grado en 100 biopsias cervicales, concluyendo en primer lugar, que el p16 representa un biomarcador específico y sensible para células cervicales infectadas con VPH-AR que podría jugar un papel prioritario en la identificación de estas lesiones; y finalmente que este método aplicado a citologías puede también ser útil como refuerzo para la prueba de VPH en pacientes con un Pap anormal en pesquisa, para detectar las lesiones con mayor riesgo a evolucionar a carcinoma invasor.

Los trabajos referidos fueron realizados en citologías de base líquida, la cual es excepcional en nuestro medio. Por lo tanto, se plantea la interrogante: ¿Puede ser esta prueba efectuada en citologías convencionales, con resultados confiables en nuestro medio?

El objetivo de esta investigación fue determinar la utilidad de la expresión de p16 como biomarcador inmunocitoquímico, en el diagnóstico diferencial entre lesiones reactivas y neoplásicas, a partir de muestras de citología cervical convencionales interpretadas previamente como lesiones escamosas atípicas no clasificadas y lesiones escamosas intraepiteliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una investigación no experimental, descriptiva, exploratoria y correlacional a partir de 40 muestras de citologías de cuello uterino con los siguientes diagnósticos: 21 negativas para malignidad pero con lesiones sospechosas al estudio colposcópico, 3 ASCUS, 13 LEI-BG y 3 LEI-AG. Simultáneamente, a estas mismas pacientes se les evaluó una muestra de biopsia cervical como diagnóstico confirmativo. Estas muestras fueron evaluadas por un citotecnólogo (CT) y varios médicos patólogos (AR, EVM y MZ). Las muestras fueron clasificadas de acuerdo a las recomendaciones del Sistema Bethesda 2001.

Previo consentimiento escrito, a cada una de las pacientes se les tomó dos muestras de citología cervical por el método convencional, y biopsia guiada por colposcopia. Una de las muestras citológicas fue usada para la aplicación de la tinción de Papanicolaou y a la otra se le aplicó la técnica de inmunocitoquímica para la detección de p16^{INK4a} utilizando el CINtec™ p16INK4a Cytology Kit (DakoCytomation®). Al momento de la toma de muestra, éstas se fijaron con spray fijador, el cual fue removido antes de su procesamiento introduciendo las muestras en una solución de etanol al 50% por 10 minutos. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y fueron depositadas en *Buffer* de lavado durante 30 segundos, seguidamente, se introdujeron durante 10 minutos en un recipiente lleno de *Epitope Retrieval Solution* (solución recuperadora de antígeno) precalentado a 93° en baño maría. Se retiró del baño de maría el recipiente conteniendo las muestras

con la finalidad de dejarlo enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se enjuagó suavemente las muestras con *Buffer* de lavado diluido durante 5 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena, con la colocación de 200 µL de reactivo bloqueador de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno al 3%) sobre la muestra e incubándola durante 5 minutos, se enjuagó y sumergió el portaobjetos con la muestra en *Buffer* de lavado durante 8 minutos. Para llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, se colocó 200 µL de anticuerpo de ratón anti-p16^{INK4a} humano, y se incubó durante 30 minutos, se enjuagó y sumergió la muestra en *Buffer* de lavado durante 5 minutos. Para el revelado de la reacción, se cubrió la muestra con 200 µL de reactivo visualizador (peroxidasa de rábano conjugada con anti-inmoglobulina de ratón) incubándola durante 30 minutos, se enjuagó con *Buffer* de lavado de la manera antes descrita, con la diferencia de que este paso se repitió 3 veces. Se retiró el exceso de buffer y se colocó 200 µL de la solución sustrato-cromógeno (3,3-diaminobencidina con peróxido de hidrógeno al 0,1%) y se incubó durante 5 minutos. Se realizó la contratinción sumergiendo los portaobjetos en un recipiente con hematoxilina de Mayer durante 3 minutos, después de los cuales se lavó suavemente durante 5 minutos en agua corriente. Para terminar, se enjuagó los portaobjetos en agua destilada y se les colocó medio de montaje no acuoso permanente.

Las muestras fueron consideradas positivas al p16 cuando se observó claramente al microscopio óptico, la inmunotinción de color marrón, tanto nuclear como citoplasmática, en más de 10 células anormales (figuras 1-3).



Figura 1. Células con cambios coliocíticos, presentan marcaje citoplasmático, una de ellas (flecha) con atipia y marcaje nuclear al p16 (400x).

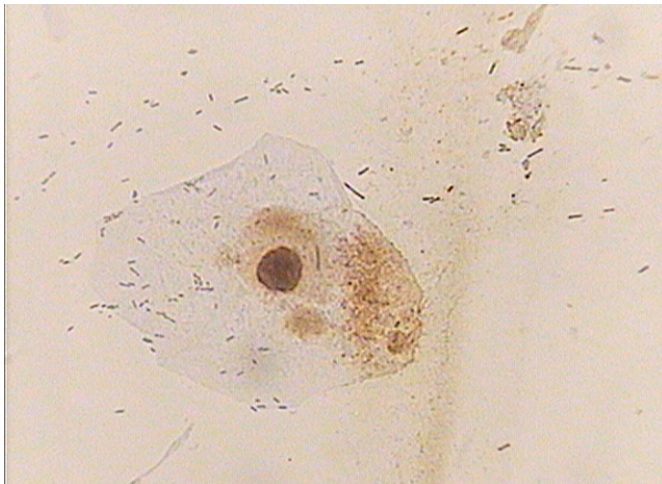


Figura 2. Célula atípica (NIC-1) con marcaje nuclear y citoplasmático focal al p16 (400x).

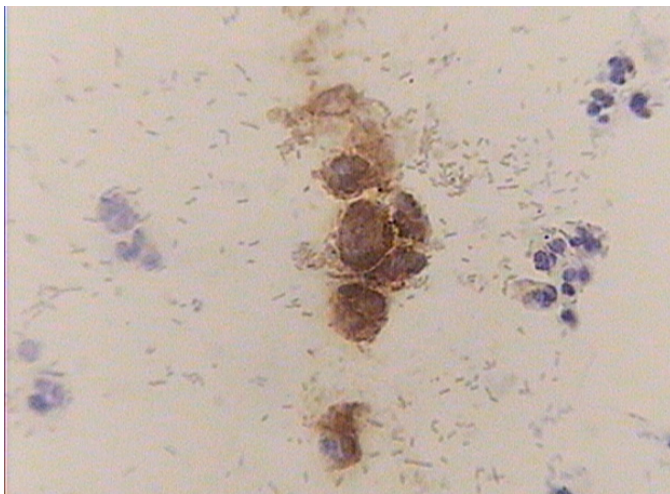


Figura 3. Células atípicas (NIC-3) con marcaje nuclear y citoplasmático al p16 (400x).

Los datos registrados fueron organizados para su interpretación en tablas con distribución de frecuencias absolutas y porcentuales. El análisis estadístico fue realizado con el programa Statistix versión 8.0. Las tablas de frecuencia fueron analizadas usando la prueba exacta de Fisher para evaluar la relación entre las variables categóricas.

RESULTADOS

El total de los casos interpretados como LEI-AG fueron negativos a la inmunotinción para p16^{INK4a}. Una minoría de las muestras categorizadas como negativas para malignidad resultaron positivas para p16, lo cual implica un resultado controversial. Al aplicar la prueba exacta de Fisher, se evidenció que no hubo relación estadísticamente significativa entre la expresión de p16 y los resultados citológicos con un nivel de confianza del 95% (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} distribuido según el resultado citológico

Resultado Citológico	p16 ^{INK4a} expresión				Total	
	Negativo		Positivo			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativo a malignidad	18	85,7	3	14,3	21	52,5
ASCUS	2	66,7	1	33,3	3	7,5
LEI-BG	9	69,2	4	30,8	13	32,5
LEI-AG	3	100	0	0	3	7,5
Total	32	80	8	20	40	100

Los niveles más altos de expresión fueron observados en los casos con lesiones histológicas de alto grado (NIC-II y NIC-III). Asimismo, se observó que el total de las biopsias negativas para malignidad mostraron una tinción negativa al p16. Al aplicar la prueba exacta de Fisher, se evidenció una relación estadísticamente significativa entre el grado de lesión histológica y la expresión de p16 ($p = 0,0108$) (figura 4).

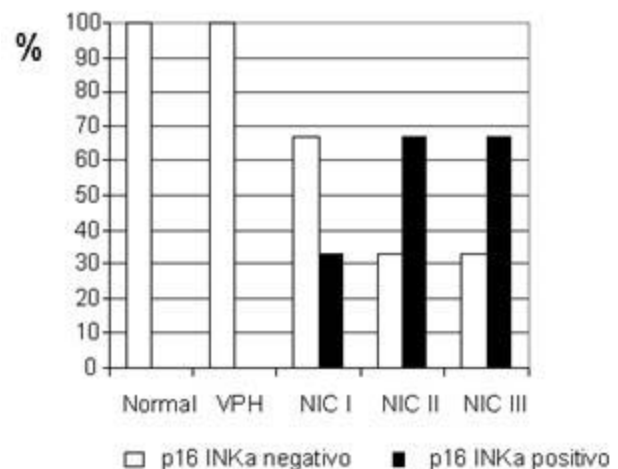


Figura 4. Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} según el diagnóstico histológico.

En la mayoría de los casos con ASCUS se observó una inmunotinción negativa al p16 y tras el análisis de la biopsia se confirmó lesión de bajo grado (NIC-I). Por su parte, uno de los casos resultó ser inmunopositivo para p16 y tras la evaluación de la biopsia correspondiente se evidenció una lesión de alto grado (NIC-III). En una pequeña proporción de los casos con resultado citológico de LEI-BG se observó inmunotinción positiva para p16, de éstos, tres fueron reclasificados como NIC-I y uno como NIC-II. Por su parte, más de la mitad de los casos negativos a la inmunotinción para p16 resultaron ser lesiones compatibles con infección por VPH, tras la evaluación histológica (Tabla 2).

Tabla 2. Reclasificación de los casos con resultado citológico previo de ASCUS y LEI-BG, relacionando la expresión de p16 con el diagnóstico histológico respectivo.

Resultado citológico	Expresión de p16			Diagnóstico histológico						Total	
		VPH		NIC-I		NIC-II		NIC-III			
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
ASCUS	Negativo	0	0	2	66,7	0	0	0	0	2	12,5
	Positivo	0	0	0	0	0	0	1	33,3	1	6,2
LEI-BG	Negativo	7	53,8	2	15,4	0	0	0	0	9	56,3
	Positivo	0	0	3	23,1	1	7,7	0	0	4	25
Total		7	43,8	7	43,8	1	6,2	1	6,2	16	100

Tabla 3. Relación entre los resultados citológicos y los diagnósticos histológicos respectivos

	Resultado biopsia											
Resultados de citologías	Normal		LEI-BG				LEI-AG				Total	
			VPH		NIC-I		NIC-II		NIC-III			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Neg. malignidad	2	9,5	12	57,1	5	23,8	1	4,8	1	4,8	21	52,5
ASCUS	0	0	0	0	2	66,7	0	0	1	33,3	3	7,5
LEI-BG	0	0	7	53,8	5	38,5	1	7,7	0	0	13	32,5
LEI-AG	0	0	1	33,3	1	33,3	0	0	1	33,3	3	7,5
Total	2	5	20	50	13	32,5	2	5	3	7,5	40	100

Se aprecia que en más de la mitad de los casos con resultados negativos para malignidad en citología. Al analizar las biopsias respectivas se observaron lesiones compatibles con VPH, mientras que una pequeña proporción resultaron ser NIC-II y NIC-III. Además, una alta proporción de los casos interpretados como LEI-BG por citología, presentaron lesiones compatibles con VPH al analizar la biopsia. Por su parte, los casos clasificados como lesiones de alto grado por citología, en 66,7% (2/3) resultaron tener lesiones de bajo grado (VPH y NIC-I), mientras que uno de los casos coincidió con NIC-III, tras la evaluación histológica.

DISCUSIÓN

En base a ambos datos, morfológicos e inmunocitoquímicos, pudo ser establecida una asociación entre la inmunotinción positiva y negativa de p16 en células atípicas y la presencia o ausencia de lesiones significativas, evidenciadas por el seguimiento de las biopsias respectivas de cada paciente.

En este estudio, se demostró que 85,7% (18/21) de los casos con resultados citológicos negativos para malignidad fueron negativos a la inmunotinción de p16, mientras que, 14,3% (3/21) de los mismos casos resultaron ser p16 inmunopositi-

vos. De estos últimos, tras el estudio histológico respectivo, dos resultaron ser lesiones de alto grado (NIC-II y NIC-III) y la otra una lesión de bajo grado (NIC-I). Estos resultados corroboran la utilidad del p16 como marcador para la detección de lesiones significativas en casos dudosos y como marcador de riesgo potencial para el progreso de las lesiones.

Dichos resultados, concuerdan con lo publicado por Bose y col. (13), quienes reportaron que un 87% de los casos negativos para malignidad resultaron ser negativos para la expresión de p16. Igualmente, con el trabajo de Nieh y col. (12) en el cual se evidenció una clara asociación entre la falta de expresión de p16 y la ausencia de lesiones cervicales, lo cual indica un elevado valor predictivo negativo de p16 como marcador de lesiones neoplásicas.

Con respecto a los tres casos de ASCUS estudiados, se obtuvo que 2/3 (66,7%) resultaron negativos para p16 y tras el análisis de la biopsia se confirmó en ambos casos la presencia de una lesión de bajo grado (NIC-I), lo cual sugiere que dichos casos podrían favorablemente regresar de manera espontánea debido al aclaramiento de la infección por VPH, dado que el mismo precede a la remisión de los cambios citológicos, es decir, que la ausencia de la inmunotinción de p16 podría constituir un indicador de buen pronóstico (15).

Por su parte, el otro caso de ASCUS, fue inmunopositivo para p16, lo cual resultó muy relevante, dado que la evaluación histológica correspondiente, confirmó la presencia de una lesión de alto grado (NIC-III). Esto coincide con la investigación realizada por Nieh y col. (12) donde determinaron la utilidad pronóstica de la expresión de p16 en estos casos, llegando a la conclusión de que la expresión de esta proteína es un indicador de la actividad patogénica del VPH-AR, por lo que lo consideran un biomarcador objetivo para la clarificación de las muestras categorizadas como ASCUS.

Por otro lado, de las muestras citológicas con LEI-BG evaluadas, la mayoría 69,2% (9/13) resultaron negativas para inmunotinción de p16, lo cual concuerda con lo reportado por un estudio realizado por Bose y col. (13) donde se obtuvo que el 79% de los casos con LEI-BG resultaron ser negativos a la inmunotinción para p16. Esto coincide con el hecho de que aproximadamente un 70% de las citologías con LEI-BG remitirán por aclaramiento de la infección por VPH (16).

Asimismo, tras realizarse la relación con el diagnóstico histológico correspondiente a dichas muestras, se confirmó la presencia de LEI-BG en todas ellas, donde en 7 de los casos se observó la presencia única de cambios coilocíticos compatibles con la infección por VPH y en tres de los casos se evidenció la presencia de NIC-I, indicativo de que se pudiera tratar de infecciones por cepas de VPH de bajo riesgo (VPH-BR) sin significancia clínica o por cepas VPH-AR no integrado al genoma celular, es decir una infección transitoria con una lesión que remitirá espontáneamente, sin riesgo de progresión (17).

De este modo, los casos con LEI-BG, donde se evalúe la inmunotinción de p16, pueden ser útiles en la discriminación entre infecciones por subtipos de VPH-AR integrados al ADN de la célula hospedadora (inmunopositivo a p16), de aquellas con subtipos de VPH-AR no integrados y de infecciones por cepas de VPH de bajo riesgo (inmunonegativos a p16) (17). Por su parte, 4/13 (30,8%) de las citologías interpretadas con LEI-BG fueron inmunopositivas. De estas últimas, tres fueron diagnosticadas por evaluación histológica como NIC-I y la otra como NIC-II, lo cual sugiere que se trata de lesiones que muy probablemente progresarán a estadios más avanzados. Mientras que 12,5% (4/32) de los casos con diagnósticos histológicos de LEI-BG (VPH y NIC-I) resultaron positivos a la inmunotinción de p16, lo cual pudiera sustentarse con lo publicado por Schenck (16), quien reporta que alrededor del 15% de las LEI-BG progresarán a lesiones de alto grado.

Por otro lado, todos los casos con resultados de LEI-AG por citología dieron negativos a la inmunotinción del p16, en contraposición con lo reportado por numerosos estudios, tal como el de Trunk y col. (10) donde en un 95% de las citologías con LEI-AG resultaron ser inmunopositivas a p16. Estos resultados controversiales arrojados por el presente estudio,

podieron explicarse por un error en la toma de muestra o en la interpretación de las citologías, lo cual es muy frecuente en la práctica diaria (18).

Una posible causa de error pudiera atribuirse a que uno de los casos correspondía a una mujer de la tercera edad, posmenopáusica, en quienes la presencia de células atróficas es común, lo cual pudo conducir a la confusión diagnóstica y al resultado falso positivo citológico. Esto se evidenció por el diagnóstico histológico de dicha paciente, el cual resultó una lesión de bajo grado (NIC-I), lo cual explica la inmunotinción negativa de p16.

Asimismo, tras el análisis histológico del otro caso con resultado citológico de LEI-AG, se confirmó la presencia única de cambios coilocíticos compatibles con una infección por VPH, lo cual evidencia un resultado citológico falso positivo que justifica la inmunotinción negativa de p16 en este caso, indicando que se trata realmente de una lesión benigna que podría remitir espontáneamente por aclaramiento de la infección.

Por el contrario, en el tercer caso de LEI-AG, se observó una concordancia entre el resultado citológico y el diagnóstico histológico (NIC-III). Sin embargo, la inmunotinción de p16 resultó negativa, pudiendo deberse a una baja celularidad y/o a una pobre contratinción del extendido observado, lo que pudo haber conducido a un déficit de células inmunopositivas. Esto, concuerda con el estudio hecho por Sahebali y col. (19) quienes trabajaron con 200 muestras, 13 de las cuales presentaron baja celularidad y pobre contratinción, siendo excluidas del estudio al dificultar su evaluación.

En contraste a los resultados citológicos con LEI-AG, la mayoría de los casos 4/6 (67%) con diagnóstico histológico de LEI-AG (NIC-II y NIC-III) fueron inmunopositivos para p16, lo cual se explicaría por los falsos resultados arrojados por el análisis citológico. La inmunopositividad de p16 en estos casos indica que a dichas pacientes se les debe llevar a cabo un tratamiento (conización) lo antes posible, para evitar que el carcinoma in situ se vuelva invasor (6). Así, se evidenció una relación directamente proporcional entre la expresión de p16 y el grado de lesión histológica.

Los resultados del presente estudio soportan los datos de reportes previos. Se evidenció que la tinción inmunocitoquímica de p16 puede ayudar a distinguir entre lesiones malignas y reactivas, cuando los resultados citológicos dudosos fueron correlacionados con los de biopsia.

En conclusión, el valor de la inmunotinción de p16 como una técnica adjunta en la interpretación citológica para mejorar la exactitud y precisión diagnóstica es evidente según los resultados de este estudio. El uso de este parámetro podría ayudar a reducir la variabilidad intra/interobservador en la

interpretación de las muestras. Los resultados revelan que la tinción inmunocitoquímica de p16 puede aplicarse exitosamente a las muestras de citologías convencionales, para disminuir los porcentajes de falsos negativos que en diferentes reportes varían entre 0 - 70% (8,12,15,16). En contraste, la técnica de citología en base líquida arroja un menor porcentaje de dichos casos (20).

Por lo tanto, además de ofrecer resultados más objetivos y reducir las interpretaciones falsas negativas y falsas positivas, también ayuda a predecir cuales ASCUS y LEI-BG presentan mayor riesgo de progresión a lesiones clínicas significativas, brindando mayor efectividad al seguimiento y tratamiento de las pacientes, evitando el sobretratamiento de las mujeres con citología de LEI-BG sin significancia clínica y aplicación del tratamiento oportuno a las mujeres con LEI-AG, para impedir la progresión a carcinoma invasor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Franco A, Anschau F, Minghelli S. P16^{INK4A} expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp and Mol Path* 2006; 80:192-6.
2. Bermúdez, A. Can we do the same in the developing world?. *Gynecol Oncol* 2005; 99:192-6.
3. Von Knebel, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38:2229-42.
4. Nieh S, Chen S, Chu T, Lai H, Fu E. Expression of p16^{INK4A} in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91:201-8.
5. Toro M, Llombart-Bosch A. Sobreexpresión de p16 INK4A en carcinoma epidermoide de cuello uterino. Disponible en: http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajo=159&tipo=2&tema=3111/11/2005. Consulta: 2006, Marzo 17.
6. Puig-Tintoré L, Cortés J, Castellsague X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S, Alonso I, Cararach M, Vidart J, Alba A, Martínez-Escoriza J, Coll C, Vilaplana E, Hardisson D, Bosch X. Prevención del cáncer de cuello uterino, ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet y Ginecol* 2006; 49:55-62.
7. Martínez, S. Bethesda actualizado, Andina Ortiz D Editores. Barcelona: Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia 2005; 76-83.
8. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D. p16^{INK4A} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:1389-99.
9. Longatto A, Utagawa M, Kasumi N, Miranda S, Namiyama G, Takami C, da Cunha G, Almeida M, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, da Gloria M Sakamoto M, Alves V, Syrjanen K. Immunocytochemical expression of p16^{INK4A} and Ki-67 in Cytologically Negative and Equivocal Pap Smears Positive for Oncogenic Human Papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:118-24.
10. Trunk M, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Petry K, Ikenberg H, Schneider V, von Knebel M. Morphologic characteristics of p16^{INK4A}-positive cells in cervical cytology samples. *Act Cytol* 2004; 48:771-82.
11. Sahebali S, Depuydt C, Segers K, Moeneclaey L, Vereecken A, Van Marck E, Bogers J. P16^{INK4A} as adjunct marker in Liquid-Based Cervical Cytology. *Int J Cancer* 2004; 108:871-6.
12. Nieh S, Chen S, Chu T, Lai H, Lin Y, Fu E, Gau C. Is p16^{INK4A} expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; 97:35-40.
13. Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E. P16^{INK4A} Is a Surrogate Biomarker for a Subset of Human Papilloma Virus-Associated Dysplasias of the Uterine Cervix as Determined on the Pap Smear. *Diagn Cytopathol* 2005. 32:21-4.
14. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso R, Vocaturo A. Immunohistochemical expression of p16^{INK4A} is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006; 19:384-91.
15. Nobbenhuis M, Helmerhorst T, van den Brule A, Rozendaal L, Voorhorst F, Bezemer P, Verheijen R, Meijer C. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001; 358:1782-93.
16. Schenck U. Management of the patient with an abnormal cervical smear. En: European guidelines for quality assurance in cervical screening. 2003. Disponible en http://www.cancer-network.de/cervical/sp_index.htm. Consulta: 2007, Septiembre 10.
17. Dray M, Russel P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, Carter J, Cheerale B. P16^{INK4A} as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Anatom Pathol* 2005; 37:112-24.
18. Weintraub J, Morabia A. Efficacy of a liquid-based thin layer method for cervical cancer screening in a population with a low incidence of cervical cancer. *Diagn Cytopathol* 2000; 22:52-9.
19. Sahebali S, Depuydt C, Segers K, Boulet G, Arbyn M, Moeneclaey L, Vereecken A, Van Marck E, Bogers J. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer* 2006; 118:1254-60.
20. Strander B, Andersson-Ellström A, Milsom I, Radberg T, Ryd W. Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program: a prospective randomized study. *Cancer* 2007; 111:285-91.