



Valor de p16 en el cribado y diagnóstico de las lesiones del cérvix uterino

Coordinador

RAFAEL COMINO DELGADO

(Presidente de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia)

Autores

RAFAEL COMINO DELGADO

(Presidente de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia)

JUAN JOSÉ HERNÁNDEZ AGUADO

(Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia)

ÁNGEL SÁNCHEZ DEL RÍO *(Sección de Ginecología Oncológica y Patología Mamaria de la SEGO)*

JAUME ORDI MAJÀ

(Sociedad Española de Anatomía Patológica)



Valor de p16 en el cribado y diagnóstico de las lesiones del cérvix uterino

Tanto en el cribado del cáncer cervical uterino (CCU) mediante citología, como en el estudio histológico de las lesiones precursoras, nos encontramos con casos en los que es muy difícil emitir una opinión diagnóstico-pronóstica acertada, razón por la cual hemos de recurrir a otros marcadores que nos aclaren, en la medida de lo posible, la situación. Nos proponemos pues hacer una revisión y análisis de la bibliografía existente al respecto sobre p16/ki67 para, de forma clara y didáctica, ofrecer al clínico unas recomendaciones que le ayuden a resolver el problema.

Haremos una introducción en la que se revisará, muy brevemente, la infección por VPH y el proceso de carcinogénesis, las lesiones precursoras del cáncer cervical y el cribado.

Posteriormente se analizarán, ya en profundidad, los marcadores inmunohistoquímicos, los mecanismos moleculares de p16/ki67, su utilidad en el cribado y, sobre todo, en el diagnóstico histológico, para acabar emitiendo unas conclusiones y recomendaciones.

Conflicto de intereses: esta revisión ha sido llevada a cabo con el patrocinio de Roche Diagnostics.



Infección por VPH y carcinogénesis cervical.

La infección persistente por determinados tipos de VPH de alto riesgo es causa necesaria para el desarrollo del cáncer cervical, de tal manera que podemos detectar VPH en prácticamente el 100% de los CCU. (Walboomers JM et al 1999).

Los VPH son virus compuestos por una doble cadena de ADN circular de aproximadamente 8.000 pares de bases, envuelta por una cápside proteica icosaédrica. Los genes que codifican proteínas se localizan en una de las dos cadenas.

En función de la frecuencia con que se aíslan unos u otros tipos en lesiones benignas y malignas, se ha propuesto clasificar clínicamente los tipos de VPH en distintos niveles de riesgo:

Alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82.

Bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81.

Alto riesgo potencial: 26, 53, 66. (Bosch F.X et al 1995)

Podemos dividir el genoma viral en tres regiones:

- Región *early*, con varios genes que codifican proteínas involucradas en la replicación del ADN viral, la regulación transcripcional y la transformación celular.
- Región *late*, que codifica las proteínas de la cápside viral.
- LCR (*long control region*) que no contiene genes, pero sí importantes elementos de regulación transcripcionales y replicacionales.

El mecanismo de carcinogénesis por VPH implica la expresión de dos oncogenes virales, E6 y E7. Una vez integrados en el genoma del huésped, intervienen con genes supresores que controlan el ciclo celular. Así E6 se une con p53 e interrumpe el proceso de respuesta celular para reparar los daños

que se produzcan en la cadena de ADN, alterando el proceso de apoptosis. Además, E6 también activa la telomerasa, favoreciendo la inmortalización en las células humanas. E7 causa una proliferación celular no controlada, al unirse a la pRb. (Boccardo E. et al 2010).

Por otro lado, E6 y E7 alteran la inmunidad innata y además pueden inducir inestabilidad genómica, fundamental en el desarrollo de la mayoría de los tumores.

Es interesante constatar que los efectos de E6 y E7 ocurren solamente con VPHs de alto riesgo, pero no con los de bajo riesgo, lo que podría estar relacionado con distintas propiedades biológicas según el tipo de virus, lo que explica, en parte su distinta capacidad oncogénica. (Yugawa T. et al 2009).

Sin embargo, no todas las infecciones con VPHs de alto riesgo persisten o progresan a cáncer cervical, lo que sugiere que, aunque necesaria, la infección por VPHs no es suficiente para inducir el proceso oncogénico. Por lo tanto, se necesita la participación de otros factores relacionados con el medio ambiente o el paciente.

Cofactores específicos investigados incluyen: el tabaco, la multiparidad, el uso de contraceptivos orales, dietas pobres en vitaminas A y C, agentes infecciosos como la Clamidia, virus como el VHS y el VIH.

La comprensión del papel de esos cofactores es el tema de muchas investigaciones sobre la historia natural de la infección por VPH y el CCU.

Lesiones precursoras del cáncer de cérvix uterino.

La acción de los VPH oncogénicos sobre el epitelio cervical uterino, tanto plano poliestratificado (exocérvix) como monoestratificado (endocérvix), con el concurso de los cofactores (tabaco, hormonas esteroides, etc) alteran las células transformándolas en atípicas, y originando así las llamadas lesiones precursoras del cáncer.

Fueron denominadas en 1961 como “displasias” por un comité de expertos en terminología histológica, (*Bajardi*) que también definió el “Carcinoma in situ” (CIS), o grado más avanzado de dichas lesiones. Pero estas denominaciones no resultaban suficientemente claras y en 1973 *Richart* introdujo, para referirse a lo mismo, el termino de “Neoplasia cervical intraepitelial” (CIN).

Tanto las displasias como el CIN se clasificaban en tres grados: CIN 1 (displasia leve) en que las alteraciones celulares afectan al tercio inferior del epitelio; CIN 2 (displasia moderada) cuando está afectada la mitad -dos tercios inferiores del epitelio; CIN 3 (displasia severa) si se afecta la totalidad del grosor epitelial. La diferencia entre displasia severa y CIS es más teórica que real y desde luego puramente histológica, pues no tiene trascendencia clínica.

Desde el punto de vista citológico también ha habido diversas clasificaciones de las lesiones precursoras, pero desde 2002 seguimos la de Bethesda (*Solomon et al.*) que incluye el LSIL (low grade squamous intraepithelial lesions) y equivaldría a la displasia leve o CIN 1 histológicamente, y el HSIL (High grade squamous intraepithelial lesions) que corresponde a la displasia moderada-severa o CIN 2-3.

Las alteraciones del epitelio endocervical se denominan citológicamente AGC (Atypical

glandular cells). La lesion histológica precursora del adenocarcinoma de cuello seria el adenocarcinoma in situ (AIS).

Recientemente se han publicado las recomendaciones de la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical y del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (*Darragh et al., 2012*) sobre terminología para las lesiones escamosas del tracto ano-genital bajo, relacionadas con el VPH, y que distingue básicamente dos grupos: LSIL (CIN 1) y HSIL (CIN 2-3).

Es difícil conocer la verdadera incidencia y prevalencia de las lesiones precursoras pero aproximadamente entre el 4 y el 7 % de las citologías cervicales muestran alguna alteración (*Insinga et al., 2004*). Los CIN se dan principalmente entre los 20 y 35 años y el cáncer invasor unos 8 a 13 años más tarde. (*Insinga et al., 2004*)

El potencial maligno del CIN 1 es muy escaso, pues la inmensa mayoría regresan espontáneamente, pero el de los CIN 2-3 es bastante mas alto, aunque también pueden regresar, sobre todo el CIN 2 que lo hará, al menos, en el 63 % durante los dos años siguientes, si se trata de adolescentes o mujeres jóvenes (*Moscicki et al., 2010*). Si el HSIL (CIN 2-3) no es tratado puede romper la membrana basal y convertirse en un carcinoma invasor de cuello uterino. Dicho cáncer es el segundo más frecuente en la mujer, en todo el mundo, dándose unos 500.000 nuevos casos anualmente, de los cuales alrededor del 80% ocurren en el tercer mundo. Actualmente se estima que el 85 % de los cánceres de cérvix uterino son escamosos y el 15 % adenocarcinomas.



Cribado

Definimos como cribado a la iniciativa de salud pública por la que se aplica a personas asintomáticas un test previamente validado (eficaz, efectivo y eficiente) para clasificarlas como “probable” o “improbable” en sufrir la enfermedad problema. Una prueba de cribado debe ser sencilla en su uso, cómoda para quien la recibe y reproducible en sus resultados. De ella no debe esperarse un diagnóstico: el objetivo es que su aplicación sistemática reduzca la mortalidad causada por la enfermedad problema en la población estudiada.

Respecto a los programas de cribado de cáncer, en el año 2003 el Consejo de la Unión Europea recomienda a los estados miembros que desarrollen programas de cribado de cáncer de mama, de cuello de útero y de colon y recto. La estrategia del cáncer del SNS en España, actualizada en el año 2013, también recoge la misma recomendación.

Existen distintas formas de cribado, a saber:

Aquel que se realiza de forma aislada con carácter individual (también llamado cribado oportunista) y que se oferta dentro de los servicios de salud a petición del interesado o aprovechando una consulta por otro motivo. En este tipo de cribado, no hay una clara evidencia de los beneficios en salud esperados ni de las consecuencias de los efectos adversos que de ellos derivan. No se garantiza la calidad del proceso en su conjunto, no es posible una evaluación ni del proceso ni de los resultados y su impacto en salud es incierto.

En contraposición, se considera cribado poblacional cuando esta actividad preventiva se aplica a todas las personas residentes en la comunidad, de manera sistemática, con invitación individual de cada persona de la población objetivo y dentro del marco de un programa organizado. Es, por tanto, un proceso organizado e integrado en

el sistema de salud, en el que todas las actividades están planificadas, coordinadas, monitorizadas y evaluadas dentro de un marco de mejora continua de la calidad, garantizando los principios de eficiencia y equidad. El cribado debe ser un proceso continuo y no una prueba puntual.

La actualización del año 2013 de la Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de salud (SNS) incluye entre sus objetivos la detección precoz de cáncer de cérvix, y para ello recomienda optimizar la realización de citologías en mujeres de riesgo medio-bajo para que se efectúen según los siguientes criterios:

- Población objetivo: mujeres asintomáticas que sean o hayan sido sexualmente activas, con edades comprendidas entre 25 y 65 años.
- Prueba de cribado: citología cervical.
- Intervalo entre exploraciones: el intervalo recomendado será de 3-5 años.

En la actualidad casi todas las Comunidades autónomas (CCAA) realizan cribado de cáncer de cérvix, mayoritariamente de forma oportunista, sin invitación explícita a la población diana, aprovechando el contacto de la interesada con el sistema sanitario.

El tipo de prueba de cribado es la citología de Papanicolau en casi todos los programas y alguno realiza la citología en fase líquida con determinación de VPH.

La U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF) en su guía clínica de 2012 (*Moyer, 2012*) recomienda realizar el cribado de cáncer cervical en las mujeres entre los 21 y 65 años mediante toma de citología (Pap smear) cada 3 años o en mujeres entre 30 y 65 años mediante la realización de test combinado, citología y detección de VPH, cada 5 años. La Sociedad Americana del Cáncer (ACS), la Sociedad Americana de Patología Cervical y Colposcopia (ASCCP), y la Sociedad Americana

de Patólogos Clínicos(ASCP) realizan parecidas recomendaciones en este aspecto (*Saslow D. et al., 2012*). Las últimas recomendaciones de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) del año 2011 también coincide con esta pauta, sólo variando de la misma en la edad de inicio del cribado que la establece a los 3 años del comienzo de las relaciones sexuales y realizando las 2 primeras citologías con intervalo de 1 año. Señala, por otra parte, que en caso de una estrategia poblacional, la edad recomendada de inicio del cribado debería ser los 30 años utilizando conjuntamente la citología convencional y la prueba de VPH por captura híbrida, estableciendo un intervalo entre controles de 5 años en mujeres con ambos resultados negativos. En el caso de mujeres vacunadas recomienda la misma pauta, pero utilizando sólo el test de VPH como prueba primaria, reservando la citología solamente para los casos que resulten positivos; el cribado finalizaría a los 65 años (*Bajo J. et al., 2011*). No obstante AEPCC y SEGO están realizando conjuntamente unas guías sobre prevención del cáncer de cuello uterino, que verán la luz, muy probablemente, a primeros de 2014, como más tarde, y en las que se actualizará el tema.

Se conoce la incapacidad de la citología para distinguir de forma consistente las formas iniciales de las neoplasias intraepiteliales cervicales (CINs) y las distintas clasificaciones utilizadas resultan en un número significativo de errores de cribado. Las ambigüedades diagnósticas pueden generar falsos positivos y conducir a tratamientos innecesarios de lo que ahora reconocemos como infecciones por el VPH agudas comunes que probablemente remitirán. A pesar de estas limitaciones, con el uso de citologías de Papanicolaou en algunos países desarrollados se han logrado reducciones de hasta un 70% en la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino.

Las pruebas de detección del VPH aptas para uso clínico empezaron a comercializarse en los

años 90 y una serie de estudios y ensayos clínicos posteriores han demostrado más allá de cualquier duda razonable que una sola prueba de detección del VPH ofrece una sensibilidad y un valor predictivo negativo significativamente superiores con una pérdida moderada de especificidad para la detección de CIN2+ en comparación con la citología de Papanicolaou convencional. Sin embargo, ha tenido que pasar al menos una década más para que el primer Consejo de Salud de un país europeo haya recomendado a su Ministerio de Sanidad sustituir la citología de Papanicolaou por la prueba de detección del VPH como opción de cribado primaria. Esta recomendación también aporta evidencias que, comparada con varias alternativas, la citología es actualmente la prueba de triaje de elección a la hora de tomar decisiones sobre el manejo de mujeres con resultados positivos para VPHs de alto riesgo (VPHs-AR). Los ensayos controlados y los análisis de modelos desempeñaron un papel fundamental para respaldar esta recomendación histórica basada en evidencias. El uso de herramientas de cribado mejores permitirá que el cribado se inicie en edades mayores (particularmente en las cohortes vacunadas) y que las rondas de cribado sean menos frecuentes, sin que se comprometa la seguridad. Además, el sistema se economizará globalmente en términos de tiempo del personal clínico y de las mujeres, así como también se reducirá el número total de actuaciones médicas requeridas para ofrecer una mejor protección frente al cáncer de cuello uterino (*Bosch X., 2011*). Este, sin duda, será el escenario que de forma inminente será una realidad en relación al cribado del cáncer de cérvix uterino en nuestro entorno.



Marcadores inmunohistoquímicos en el diagnóstico y cribado de las lesiones cervicales

En los últimos años se ha observado que las infecciones oncogénicas por VPH se asocian a la expresión de algunas moléculas celulares relacionadas con la replicación, la transcripción, la reparación del ADN, la apoptosis, la proliferación y la invasión y la metástasis. Se ha propuesto que algunas de estas moléculas podrían utilizarse como biomarcadores de lesión y/o de progresión. Entre los candidatos que han mostrado una utilidad potencial en el cribado y/o el diagnóstico se incluyen CDKN2A-p16, topoisomerasa 2 alfa (TOP2A), la proteína 2 del mantenimiento de minicromosomas (MCM2), y Ki67 (*Santin et al, 2005; Williams et al 1998*). Los marcadores moleculares que han demostrado una mayor utilidad y en los que, por tanto, esta revisión se va a centrar de forma exhaustiva son p16 y Ki67.

Dos son las principales limitaciones del diagnóstico histológico en la evaluación de las lesiones intraepiteliales escamosas: la importante variación inter e intra-observador en su diagnóstico y la necesidad de identificación de las lesiones de bajo grado que presentan un verdadero potencial de progresión. En la evaluación citológica, además de los problemas planteados para la biopsia, se suma la baja sensibilidad del examen morfológico convencional de la citología.

Mecanismos moleculares de acción de p16 y de Ki67

La proteína p16, codificada por el gen supresor CDKN2A (MTS1, INK4A) situado en el cromosoma 9p21, es una proteína de las células humanas que actúa como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk), desacelerando el ciclo celular mediante la inactivación de la función de los complejos cdk4- y cdk6-ciclina D. Estos complejos regulan el punto de control de la fase G1 del ciclo celular mediante la fosforilación y

la subsiguiente inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb), lo cual libera el factor de transcripción E2F y permite a la célula entrar en la fase S. En el CCU, pRb está funcionalmente inactivada desde las fases iniciales de la carcinogénesis cervical al unírsele la oncoproteína E7 del VPH. Se ha demostrado la existencia de una correlación recíproca entre pRb y p16, razón por la cual existe una fuerte sobreexpresión de p16 tanto en los carcinomas como en las lesiones premalignas del cérvix uterino, relacionados todos ellos con la infección por VPH. Esta sobreexpresión de p16 es mucho mayor de lo esperado por sólo la alteración de pRb, especulándose con que puedan existir otros mecanismos de sobreexpresión mediados por la infección por VPH aún desconocidos. La sobreexpresión de p16 es fácilmente detectable por tinción inmunohistoquímica y ha sido propuesta como un marcador biológico que puede permitir identificar de forma inequívoca las células con cambio displásico o maligno inducido por VPH, mejorando así la especificidad diagnóstica y solucionando los problemas existentes de variabilidad inter e intra-observador.

Ki67 es un antígeno que identifica las células en proliferación y es expresado en todas las fases del ciclo celular.

Utilidad de p16 y Ki67 en el diagnóstico histológico

A pesar de que se considera el estándar de oro en el que se basan las conductas clínicas actuales, el estudio histológico de las lesiones intraepiteliales de cuello uterino presenta una notable variabilidad inter e intraobservador (*Malpica y cols, 2005*). En prácticamente todos los trabajos la concordancia diagnóstica es mayor en los extremos del espectro (biopsias negativas, CIN3 y CCU), mientras que la discordancia es más elevada en las lesiones intermedias (CIN1 y, especialmente CIN2). Dado que según los criterios clínicos actuales el tratamiento está indicado en aquellas pacientes con CIN2 o más (CIN2+), y que éste es precisamente el

diagnóstico con una mayor variabilidad inter- e intra-observador, en los últimos años se han propuesto diferentes marcadores para aumentar la concordancia diagnóstica en estas lesiones. Tres son las condiciones que debería tener un buen marcador para ser útil en la práctica diaria: 1) una elevada sensibilidad para CIN2+ y/o CIN3+; 2) una alta especificidad, y 3) ser fácil de evaluar y reproducible.

Las evidencias existentes sobre la utilidad de la sobreexpresión de p16 para reducir la variabilidad diagnóstica en lesiones preinvasivas e invasivas de cuello uterino son muy numerosas, de modo que se puede afirmar que se trata de una herramienta sumamente útil no sólo en el diagnóstico de lesiones de cérvix sino en el manejo posterior de las mismas, aportando un elemento objetivo con escasa variabilidad interobservador. La sobreexpresión de p16 es altamente específica de las lesiones displásicas, particularmente de las de alto grado, las cuales son prácticamente siempre positivas, mientras que es negativa en la inmensa mayoría de las lesiones reactivas. Un aspecto importante a tener en cuenta es que la forma de valorar p16INK4a se ha refinado en los últimos años. En la actualidad se considera únicamente como sobreexpresión una positividad difusa en células basales y parabasales (es decir, en el tercio inferior del epitelio) en un área epitelial, aunque ésta pueda ser pequeña. Por el contrario, tanto la negatividad absoluta como la positividad parcheada, irregular o en damero para este marcador se consideran como ausencia de sobreexpresión. Aunque ésta última forma de positividad es frecuente en lesiones de bajo grado, puede observarse también en algunos epitelios cervicales normales. La inclusión de casos con positividad parcheada o irregular explica, al menos en parte, la existencia en algunos trabajos de positivities para p16 cercanas o incluso superiores al 10%. En la tabla 1 se resumen los valores de sensibilidad y especificidad de p16 para CIN2+ y CIN3+ referidos en los diferentes trabajos publicados. Prácticamente todos los

estudios (Bergeron *et al*, 2010; Dijkstra *et al*, 2010; Galgano *et al*, 2010; Horn *et al*, 2008; Klaes *et al*, 2002; McCluggage, 2007; Negri *et al*, 2004; 2008; Ordi *et al*, 2009) han demostrado que la adición de p16 a la tinción rutinaria de hematoxilina eosina aumenta notablemente la concordancia interobservador en cuanto a la presencia o ausencia de lesión y el grado de consenso en la gradación de dichas lesiones. La tinción es particularmente útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones no neoplásicas tales como las inflamatorias o los cambios celulares asociados a la atrofia y las lesiones verdaderamente premalignas, en la identificación de lesiones pequeñas o escasamente representadas en la muestra y en la evaluación de legados endocervicales.

La identificación de Ki67 ha venido utilizándose como apoyo del diagnóstico histológico convencional en casos dudosos, estableciéndose una relación directa entre la presencia o no de lesión intraepitelial y su grado y la extensión de células positivas. Así, los epitelios sin lesión presentan solo células positivas en el estrato basal, las lesiones de bajo grado muestran células positivas en el tercio inferior o en la mitad del epitelio, y las de alto grado positividad difusa en todos los estratos epiteliales desde el basal al superficial. Sin embargo, se trata de un marcador poco específico en la detección de lesiones víricas, pues su expresión aumenta en cuadros reactivos epiteliales (inflamación) y puede verse en linfocitos intraepiteliales, todos ellos posibles falsos positivos que dificultan su interpretación. En un reciente trabajo Galgano y cols (Galgano *et al*, 2010) comparan la sensibilidad de p16, con Ki67 (y también con el antígeno L1 de VPH), observando que p16 presenta los mejores resultados. En este mismo trabajo, los autores indican que la tinción doble con p16 y Ki67 en histología no aporta ventajas con respecto a la tinción exclusiva con p16.

La proteína 2 del mantenimiento de minicromosomas (MCM2) y la topoisomerasa II



(TOP II) se encuentran sobreexpresadas en los procesos que presentan una inducción de la fase S del ciclo celular aberrante, circunstancia existente en células infectadas por el VPH. Utilizados de forma aislada presentan una sensibilidad cercana al 80% con una especificidad del 75% (*Badr et al, 2008*). Utilizados de forma combinada presentan una mejora de sus prestaciones individuales. Esta combinación está comercializada con el nombre de ProExC. En los trabajos en los que se comparan p16 y ProExC, tanto la sensibilidad como la especificidad del primero son algo superiores a las del segundo (*Badr et al 2008; Guo et al, 2011*). La utilización simultánea de ambos marcadores no mejora tampoco las prestaciones de los marcadores utilizados de forma aislada (*Badr et al 2008; Guo et al, 2011*).

Cdc6 y Mcm5 son dos novedosos antígenos relacionados con la proliferación celular, equiparables a Ki67, pero carecen de especificidad, por cuanto no distinguen las células proliferantes displásicas y no displásicas. El antígeno nm23 tiene una sensibilidad cercana al 80%, pero una especificidad inferior al 40% por lo que tampoco resulta de utilidad (*Benevolo et al, 2010*).

Por último, aunque VPH es el agente causal de todas las lesiones escamosas del cérvix y que éste es siempre detectable mediante técnicas muy sensibles como las basadas en la PCR, los diferentes tests comerciales basados en hibridación in situ, por su especificidad relativamente baja para VPH, presentan porcentajes de positividad para CIN2-3 entre un 55 y un 70% que los hace poco útiles en la práctica.

Si bien la mayoría de los carcinomas de cérvix derivan de lesiones intraepiteliales, sólo una minoría de éstas progresará a carcinoma invasor. Ello es particularmente notorio para las lesiones de bajo grado, de las que sólo un mínimo porcentaje va a progresar, mientras que la mayoría (hasta un 85%), regresará espontáneamente. Por ello, las

guías clínicas actuales contemplan el seguimiento sin tratamiento de estas pacientes. La morfología no aporta información alguna sobre el riesgo de progresión de estas lesiones por lo que sería de gran interés disponer de un marcador capaz de identificar las lesiones de bajo grado con capacidad de progresión. Algunos trabajos recientes han indicado que p16 puede proporcionar información pronóstica en estas lesiones. Hariri y cols. (*Hariri et al, 2007*) y del Pino y cols. (del Pino et al, 2009) han analizado el posible valor predictivo de la determinación de p16 en lesiones intraepiteliales de bajo grado. En ambos estudios la ausencia de sobreexpresión de la proteína p16 identificaba un grupo de lesiones de bajo grado con mínima o nula capacidad de progresión. En los dos trabajos, todas las lesiones de bajo grado que progresaron a CIN 2-3 mostraron positividad para p16 en la biopsia de CIN1. No obstante, solo un porcentaje de las lesiones de CIN1 positivas para p16 progresaron. Estos resultados, aunque pendientes de confirmación en series más amplias, sugieren que p16 podría ser un importante marcador pronóstico en el manejo de lesiones intraepiteliales de bajo grado.

Utilidad de p16 y Ki67 en el cribado

Como se ha expresado anteriormente, el test de Papanicolaou, el método más común de cribado del CCU ha demostrado una sensibilidad limitada para el diagnóstico de HSIL y CCU. Además, dicho test, detecta a un elevado número de mujeres con lesiones ASC-US y LSIL que tienen un riesgo muy bajo de progression a HSIL y CCU (*Fahey et al, 1995, Stoler et al, 2001*). Por otra parte, el reconocimiento de que la infección por VPH es un factor necesario para el desarrollo del CCU está conllevando a un cambio en el paradigma de los programas de cribado con un uso cada vez más extendido de los tests de detección de VPH en el cribado primario.

De este modo, aunque los tests de VPH son muy sensibles para la detección de lesiones cervicales premalignas, no puede discriminar entre las frecuentes infecciones transitorias y las verdaderas lesiones premalignas, mucho menos prevalentes (*Schiffman et al, 2010*).

La p16 como marcador único aumenta la sensibilidad y la especificidad de la citología convencional para la detección de lesiones premalignas, en comparación con la citología convencional (*Carozzi et al, 2006; 2008; 2013*). Sin embargo, la frecuente presencia de células normales positivas para p16 obliga a utilizar criterios morfológicos (*Denton et al, 2010*). Por ello, recientemente se ha propuesto que la detección simultánea de p16, marcador de antiproliferación, y Ki67, un marcador de proliferación, en una misma célula epitelial cervical podrían ser, en citología, marcadores subrogados de la desregulación del ciclo celular secundaria a la infección transformante por VPH. La principal ventaja de esta tinción dual p16/Ki67 es que no precisa de interpretación morfológica de las características nucleares, y se considera como positiva para el test cualquier citología con al menos una célula con positividad dual (tinción marrón citoplasmática para p16 y tinción roja nuclear para Ki67). Debido a estas ventajas, p16 aislada para citología ha sido retirada del mercado y solamente es posible utilizar la citada tinción dual.

Dicha tinción dual p16/Ki67 en las extensiones citológicas ha mostrado ser uno de los tests más prometedores para identificar lesiones cervicales premalignas (*Schmidt et al, 2011; Petry et al, 2011; Loghavi et al, 2012, Wentzensen et al, 2012; Edgerton et al, 2013; Dona et al, 2012; Waldstrom et al, 2013; Zappacosta et al, 2013; Ikenberg et al, 2013; Ordi et al, 2013*) considerándose como test positivo la presencia de una o más células que expresen ambos biomarcadores. En la actualidad se han publicado nueve estudios valorando este test en citología, con algunas diferencias notables en los criterios de

inclusión de las pacientes. En la mayoría de estos estudios el test ha demostrado una sensibilidad y especificidad muy altas, próximas respectivamente al 90% y al 80%. La sensibilidad del test es muy alta en muestras preparadas con ThinPrep y parece reducirse en extensiones convencionales y extensiones preparadas con SurePath (*Ikenberg et al, 2013*). En la tabla 2 se muestran las sensibilidades y especificidades de la tinción dual para HSIL (CIN 2+) de todos los estudios publicados hasta la fecha en la literatura.

La tinción dual p16/Ki67 ha demostrado ser particularmente útil en el triage de las pacientes con citología de ASCUS y LSIL o en las pacientes con test de VPH positiva con citología negativa. El test presenta una sensibilidad y especificidad muy altas entre las mujeres mayores de 30 años, pero en menores de 30 años, grupo particularmente conflictivo, dada la frecuencia de alteraciones citológicas leves y de infecciones por VPH transitorias en este grupo de edad el rendimiento es excelente. En uno de los estudios publicados la adición de criterios morfológicos a la valoración inmunohistoquímica incrementa de forma notable la especificidad de la técnica. Esta estrategia puede ser especialmente útil en mujeres jóvenes (*Ordi et al, 2013*).



Estudio	Año	Para CIN2+		Para CIN3+	
		Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
Klaes et al.	2002	100%	71%	100%	62%
Wang et al.	2004	81%	95%	100%	95%
Hariri y Oster	2007	100%	72%	-	-
Kong et al.	2007	82%	100%	-	-
Ordi et al.	2009	99%	89%	-	-
Benevolo et al.	2010	96%	66%	-	-
Galgano et al.	2010	87%	83%	99%	74%
Guo et al.	2011	79%	85%	90%	71%

Tabla 1.
Sensibilidad y especificidad de p16INK4a para CIN2+ y CIN3+ en diferentes trabajos publicados en la literatura

Autor	Año	Preservación	Citología de referencia	n	Sensibilidad	Especificidad
Schmidt et al.	2011	ThinPrep	ASCUS &LSIL	776	92,2	80,6
Petry et al.	2011	ThinPrep	HPV+, Pap-	132	91,9	82,1
Wentzensen et al.	2012	ThinPrep	ASCUS, HPV+ & LSIL+	625	85,5	59,4
Waldstrom et al.	2013	ThinPrep	LSIL	469	88,5	51,3
Loghavi et al.	2012	ThinPrep	ASCUS &LSIL	188	97,0	53,0
Edgerton et al.	2013	Surepath	ASCUS	67	64,0	53,0
Zappacosta et al.	2013	ThinPrep	LSIL, HPV+	405	62,3	76,8
Ikenberg et al.	2013	Conventional	Screening	27.349	85,0	95,7
Ikenberg et al.	2013	Surepath	Screening	27.349	83,9	94,9
Ikenberg et al.	2013	ThinPrep	Screening	27.349	91,4	94,8
Ordi et al.	2013	ThinPrep	ASCUS+	1.123	90,9	72,1

Tabla 2.
Sensibilidad y especificidad de la tinción dual p16/Ki67 para la detección de neoplasia cervical intraepitelial de grado 2 o más en las series publicadas

LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; ASCUS: células escamosas atípicas de significado desconocido; VPH: virus de papiloma humano

Conclusiones

Entre los diferentes marcadores descritos p16 es el que mayores ventajas presenta, pues puede ser utilizado como ayuda diagnóstica complementaria a la morfología, con sensibilidad y especificidad superiores a los del resto de marcadores. Además, su positividad o negatividad puede proporcionar información pronóstica de gran relevancia en el manejo de pacientes con lesiones de bajo grado.

Como se ha comentado, debe considerarse únicamente como positivo la tinción continua y difusa de las células de los estratos basal y parabasal del epitelio escamoso estratificado cervical, haya o no tinción de los estratos epiteliales más superficiales. Por el contrario, cualquier otro resultado (ausencia de tinción o tinción de células aisladas o de pequeños grupos celulares, o la tinción exclusiva de los estratos epiteliales superficiales) debe considerarse como negativo.

En conclusión:

1. Actúa como herramienta de seguridad en el diagnóstico histológico rutinario. Pone de manifiesto focos lesionales de pequeño tamaño y lesiones artefactadas u ocultas que pueden pasar desapercibidas con las técnicas de rutina.
2. Facilita el diagnóstico diferencial entre los simuladores de lesión cervical (metaplasia escamosa inmadura, cambios celulares asociados a atrofia e inflamación) y las verdaderas lesiones intraepiteliales de alto grado
3. La expresión simultánea de p16 y Ki67 en una misma célula es signo inequívoco de haber sido transformada por la infección por VPH-AR reduciendo significativamente la variabilidad interobservador en la lectura citológica.
4. La expresión simultánea de p16 y Ki67 en una misma célula presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de CIN 2+.

5. La expresión simultánea de p16 y Ki67 en una misma célula ha demostrado su utilidad y eficacia en el triage de ASCUS y LSIL citológicos así como en pacientes VPH-AR positivas.

Recomendaciones

Basándonos en las conclusiones anteriormente expuestas puede recomendarse:

1. Utilizar el test dual para el triage de citologías informadas como ASCUS, L-SIL.
2. En pacientes mayores de 30 años con test VPH positivo utilizar el test dual como prueba de triage y en menores de 30 años como test primario de cribado.



Bibliografía

Alemany L, Pérez C, Tous S, Llombart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, Guarch R, Andújar M, Pelayo A, Alejo M, Ordi J, Klaustermeier J, Velasco J, Guimerà N, Clavero O, Castellsagué X, Quint W, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S; Spanish study group RIS HPV TT. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol.* 2012; 124:512-7.

Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S. BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:899-906.

Bajardi, F.-Symposium on malignant cervical lesions (nomenclature of the atypical epithelium)., *Acta Cytol.*, 1961; 5: 344-8.

Bajo J, Cortes J, Garrido R, Miranda P, Xercavins J, Vidart J.A. Recomendaciones para el diagnóstico precoz y el cribado de cáncer de cuello de útero. En Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia ed. "Recomendaciones para la organización de un Servicio de Obstetricia y Ginecología". SEGO Ltd, 2011. 105-120.

Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, Marandino F, Muti P, Carosi M, Rollo F, Ronchetti L, Mariani L, Vocaturo G, Vocaturo A. Comparative evaluation of nm23 and p16 expression as biomarkers of high-risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia 2(+) lesions of the uterine cervix. *Histopathology.* 2010;57:580-6

Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010; 133:395-406.

Boccardo E, Lepique A.P., Virilla LL. The role of inflammation in HPV Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010; 31:1905-12.

Bosch X. El largo recorrido desde la citología Papanicolaou hasta las pruebas de detección del VPH y lo que vendrá a continuación. *HPV Today*, 2011; 24:2.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of Human Papilloma Virus in cervical cancer: A worldwide perspective. *International Biological Study on cervical Cancer (IBSCC) Study group J. Natl Cancer INST* 1995; 87:796-802.

Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, Becattini V, Cariaggi MP, Pontenani G, Sani C, Ciatto S. Role of p16-INK4A expression in identifying CIN 2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer cytopathology* 2006; 108: 119-23.

Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14:168-76.

Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14:168-76.

Creagh T, Bridger JE, Kupek E, et al. - Pathologist variation in reporting cervical borderline epithelial abnormalities and cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*;1995; 48: 59-60.

Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:1266-97

Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of the LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol.* 2013;32:76-115

De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usbutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barrion V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11:1048-56.

Del Pino M, García S, Fusté V, et al. - Value of p16INK4a as a marker of progresión/regresión in cervical intraepitelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol*;2009; 201: 488.e1-7.

Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol* 2010;134:12-21.

Dijkstra MG, Heideman DA, de Roy SC, et al.- p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol.* 2010; 63:972-77.

Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol* 2012; 126:198-202.

Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS(R) testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed SurePath(R) preparations. *Diagn Cytopathol* 2013 ;41:35-40.

Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995;141:680-9.

Galgano MT, Castle PE, Arkins KA et al.-Using biomarkers as objective standars in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*;2010; 34: 1077-1087.

Guo M, Baruch AC, Silva EG, Jan YJ, Lin E, Sneige N, Deavers MT. Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2011;135:212-20

Hariri J, Øster A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Patholl.*-2007; 26:223-8.

Horn LC, Reichert A, Oster A, et al. . Immunostaining for p16INK4a used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*,-2008; 32: 502-12.

Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al. Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:1550-7

Insinga,RP. Glass, AG. Rush, BB:. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population based study., *Am.J. Obstet. Gynecol.*, 2004; 191: 105-13.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al.- P16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia.*Am J Surg Pathol*;2002; 26:1389-99.

Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, et al. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:33-43.

Loghavi S, Walts AE, Bose S. CINtec(R) plus dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol* 2012; 26;10.

Malpica A, Matisic JP, Niekirk DV, et al. Kappa statistics to measure interrater and intrarater agreement for 1790 cervical biopsy specimens among twelve pathologists: qualitative histopathologic analysis and methodologic issues. *Gynecol Oncol*; 2005;99(3 Suppl 1):S38-52.

McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic in cervical pathology. *Pathology*, 2007; 39:97-111.

McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2008; 9:425-34.

Moscicki, Ab. Ma, Ywibbelsman, C. Darragh,Tm. Powers, A. Farfhat, S. et al.-Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women., *Obstet. Gynecol.*, 2010; 116: 1373-80

Moyer,va..Screening for cervical cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement., *Ann. Intern. Med.*, 2012; 156:880-91

Negri G, Bellisano G, Zannoni GF, et al. . p16 ink4a and HPV L1 immunohistochemistry is helpful forestimating the behavior of low-grade dysplastic lesions of the cervix uteri. *Am J Surg Pathol.*-2008;; 32:1715-20.

Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. - p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri, *Virchows Arch*,2004; 445:616-620.



Ordi J, García S, del Pino M, et al. p16INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol.* 2009;; 28: 90-97.

Ordi J, Sagasta A, Munmany M, et al. Usefulness of p16/Ki67 Immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol* 2013; in press

Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Luthge A, Bergeron C, et al. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* 2011;121:505-9.

Richart, RM.- Cervical intraepithelial neoplasia., *Pathol. Ann.*, 1973; 8: 301-28

Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cane S, Bellone S, et al. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005; 331:269-91.

Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2010; 116:177-85.

Saslow, D. Solomon, D. Lawson, H. Killackey, M. Kulasingam, S. Cain, J. et al.-American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *CA Cancer J Clin*, 2012; 62: 147-72

Sayed K, Korourian S, Ellison DA et al. - Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. *J Low Genit Tract Dis*;2007; 11; 141-14.

Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005;337:76-84

Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2010;116:177-85.

Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol* 2011;119:158-66.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-9.

Stoler MH.- Toward objective cervical cancer screening: maybe the eyes do have it. *Am J Clin Pathol*; 2010;134:5-6.

Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001 ;285:1500-5.

Walboomers J.M, Jacobs M.V., Manos M.M., et al. Human Papilloma Virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.

Waldstrom M, Christensen RK, Ornskov D. Evaluation of p16(INK4a) /Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol* 2013; 121:136-45.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, et al. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2407-14.

Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res* 2012;18:4154-62.

Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ;95:14932-7.

Yugawa T, con kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by High Risk Human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev. Med Virol*. 2009; 19:97-113

Zappacosta R, Caraceni D, Ciccocioppo L, Rotondo T, Capanna S, Gatta DM, et al. Implementing specificity of HPV-DNA primary screening in a successful organised cervical cancer prevention programme. *Gynecol Oncol* 2013;128:427-32.

Zur Hausen H.- Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*; 2002;2: 342-50.

Impresión y distribución por gentileza de

