



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y CIRUGÍA

DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS CLÍNICO-QUIRÚRGICAS

TESIS DOCTORAL

“EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN CITOLOGÍA DE  
FROTE CERVICAL E HISTOLOGÍA CON TINCIÓN P16”


DOCTORANDO

ALBERTO GARCÍA GONZÁLEZ

SAN JUAN DE ALICANTE, ALICANTE, ESPAÑA, NOVIEMBRE DE 2015.

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y CIRUGÍA  
DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS CLÍNICO-QUIRÚRGICAS

“EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN CITOLOGÍA DE FROTE CERVICAL E HISTOLOGÍA CON TINCIÓN P16”



Memoria presentada por ALBERTO GARCÍA GONZÁLEZ  
para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Director: prof. Francisco Quereda Seguí

SAN JUAN DE ALICANTE, ALICANTE, ESPAÑA, NOVIEMBRE DE 2015.





SUSANA JIMÉNEZ MORENO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE,

CERTIFICA:

Que, D. *Alberto García González* ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de tesis doctoral titulada "Evaluación clínica de la doble tinción P16 y KI67 en citología de frote cervical e histología con tinción P16" cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo de forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al grado de doctor.

Lo que certifico en Sant Joan d'Alacant a 09 de noviembre de 2015

  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y CIRUGÍA  
Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante  
Telf.: 96 591 94 60 – Fax: 96 591 94 59  
e. electrónico: [cirugia@umh.es](mailto:cirurgia@umh.es)

Francisco Quereda Seguí,

Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Miguel Hernández

CERTIFICA QUE:

El estudio titulado: **EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA DOBLE TINCIÓN P16 Y KI 67 EN CITOLOGÍA DE FROTE CERVICAL E HISTOLOGÍA CON TINCIÓN P16** ha sido realizado íntegramente por **D. Alberto García González** bajo mi supervisión.

Dicho trabajo está concluido y reúne los requisitos para ser defendido públicamente como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en San Juan de Alicante a 16 de Noviembre de 2015



Fdo. Francisco Quereda Seguí

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Quereda Seguí por su tutoría y confianza en la presente Investigación.

A la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC, en especial al Sr. Decano Dr. Jesús Arnulfo Oliva Leal, por su confianza y apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC. En especial a la Dra. Carmen de Tercero, Dra. Elisa Hernández de Rodas y Elder Lay por permitir realizar el procesamiento de las muestras.

Al Instituto Nacional de Cancerología INCAN, en especial a los doctores Dr. Enrique López Sánchez, Dr. Hesler Morales, Dr. Miguel A. Echeverría, Jorge Álvarez y Dr. Guillermo Alfredo Lima, por apoyarme en la obtención y procesamiento de muestras.

Al departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clinic de Barcelona España, en especial al Dr. Jaume Ordi, por su apoyo y tutoría en la evaluación de muestras.

A los Patólogos evaluadores de Guatemala, en especial Dr. Erick Soch y Dr. Orlando Rodas.

A la Secretaría nacional de ciencia y tecnología SENACYT por su apoyo económico.

## DEDICATORIA

A Dios omnisciente, creador del mundo, por su amor y sabiduría.

A Mi esposa Brenda e Hijos Brenda Abigail y Alberto Carlos, por ser mi fuente de inspiración, fortaleza y amor.

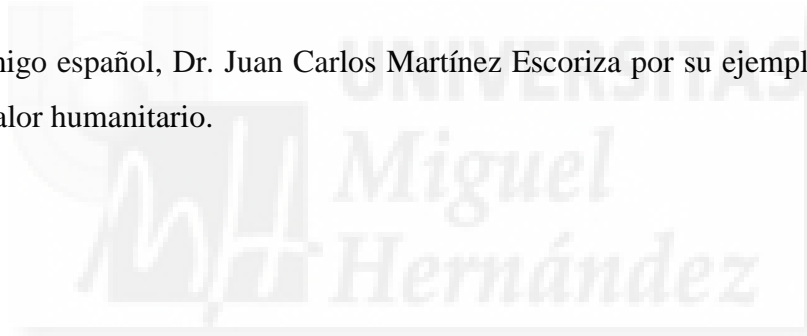
A Mi padre, Mauro Antonio García por su ejemplo de superación y dedicación.

A Mi mamá, Rosa María de García por su ejemplo y amor incondicional.

A Mis suegros Carlos y Vilma de Ramírez, por su apoyo y amor.

A Mis Hermanos Mauro, Flor de María, Karola y cuñados Víctor Hugo, Mauricio, Erick, Karen, Julio y Carlos.

A Mi amigo español, Dr. Juan Carlos Martínez Escoriza por su ejemplo profesional y alto valor humanitario.



## INDICE

### Contenido

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. Epidemiología del cáncer de cérvix.....	8
1.1.1. Epidemiología del cáncer del cérvix en latino América. ....	10
1.1.2. Epidemiología del cáncer de cérvix en Guatemala. ....	11
1.2 Virus del papiloma humano, agente causal biológico del cáncer de cérvix.....	12
1.3. Pruebas diagnósticas para la detección de lesiones del cérvix.....	18
1.3.1. Citología .....	18
1.3.2. Colposcopia.....	26
1.3.3. Histología del cérvix .....	30
1.3.4. Pruebas de ADN del VPH.....	32
1.3.5. Inmunotinción de P16 y Ki67 en citología cervical.....	35
1.3.6. Inmunotinción de P16 en histología cervical.....	40
1.4. Tratamiento de lesiones preinvasivas del cérvix.....	42
1.4.1. Conización del cérvix .....	43
1.5. Justificación del estudio. ....	45
2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO. ....	47
2.1. Hipótesis.....	47
2.2. Objetivos del estudio.....	47
2.2.1. Objetivo principal:.....	47
2.2.2. Objetivos secundarios .....	47
2.3. Plan de trabajo.....	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.1. Tipo de estudio, lugar donde se realizó y muestra .....	50
3.2. Los criterios de inclusión .....	50
3.3. Los criterios de exclusión.....	50
3.4. Variables .....	51
3.5. Estrategia Metodológica.....	52

3.5.1 Captación de casos, muestras clínicas y colposcopia con biopsia cervical .....	53
3.5.2. Procesamiento de muestras: inmunotinción de citologías e histologías. ....	54
3.5.3. Interpretación de las muestras de citología e histología.....	54
3.6. Técnica estadística .....	55
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Características generales de las pacientes estudiadas. ....	58
4.2. Resultados de las interpretaciones de citología, histología de biopsias y conos cervicales con tinciones convencionales. ....	58
4.3. Resultados de la interpretación de citologías, biopsias y cono cervicales con tinciones por Inmunohistoquímica. ....	62
A) Las interpretaciones de hallazgos citomorfológicos de frotis del cérvix, procesadas con inmunocitoquímica con P16 y Ki67. ....	62
B) Las interpretaciones de los hallazgos histomorfológicos de biopsias y conos cervicales que fueron procesadas por inmunohistoquímica con P16. ....	64
C) La tinción positiva ó negativa de los frotis del cérvix con P16 y Ki67 según los hallazgos citomorfológicos. ....	65
4.4. Concordancia interobservador de citología cervical con doble tinción y biopsia y de cono cervical con tinción p16.....	66
4.5. Comparación de la interpretación de las citologías dependiendo de tinción (Pap y doble tinción P16 y Ki67) .....	67
4.6. Comparación de la interpretación de las biopsias cervicales según tipo de tinción de hematoxilina eosina y p16.....	68
4.7 Comparación de la interpretación de histología en conos cervicales según tinción hematoxilina eosina y p16.....	70
4.8 Impresión colposcópica, además de su correlación con respecto al diagnóstico final histológico con tinción P16.....	71
4.9 Resultados de lesiones cervicales según rangos de edad y tipo de tinción histológica.....	76
4.10 Correlación de citología con histología con tinción convencional correspondiente.....	78
4.11 Resultado de interpretación de citología con doble tinción P16 y Ki67, y correlación con histología con tinción P16 correspondiente. ....	80



4.12	Citologías de frotis cervical que reaccionaron positivo a la doble tinción P16 Ki67 según diagnóstico histopatológico con tinción P16. ....	81
4.13	Citologías de frotis cervical que reaccionaron negativo a la doble tinción P16 Ki67 según diagnóstico histopatológico con tinción P16. ....	81
4.14	Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de: citología convencional, citología con doble tinción P16 y Ki67 y colposcopia. ....	83
4.15	Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la citología con doble tinción P16 y Ki67 según edad (Menor o mayor de edad de 30 años). ....	84
4.16	Índice de correlación entre citología cervical con doble tinción p16 ki67, histología e impresión colposcópica.....	87
4.17	Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo según reacción de la tinción p16 y Ki67 en citología y p16 en biopsia y cono cervical.....	88
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS. ....	90
6.	CONCLUSIONES.....	97
7.	RECOMENDACIONES Y POSIBLE APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO. ....	98
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
9.	ANEXOS .....	113
	Anexo 1. Cartas de colaboración.....	114
	Anexo 2. Informe por paciente del estudio de citología exfoliativa.....	118
	Anexo 3. Informe de histología.....	119
	Anexo 4. Instrucciones de la toma de muestra del cérvix para citología.....	120
	Anexo 5. Boleta de información a la paciente .....	121
	Anexo 6. Consentimiento informado.....	124
	Anexo 7. Ficha de recolección de datos de colposcopia y estudios.....	125
	Anexo 8. Instrucciones del kit Cintec Plus.....	126
	Anexo 9. Base de datos de pacientes en Excel.....	135
	Anexo10. Atlas de tinciones con inmunohistoquímica de exfoliados y biopsias cervicales. ....	136

## TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura citológica según Sistema Bethesda 2001	21
Tabla 2. Estudios comparativos entre métodos de detección de virus del papiloma humano de alto riesgo según grupos de investigación.	34
Tabla 3. Sensibilidad y especificidad del tinción doble P16/Ki67, de algunos estudios, según Interpretación citomorfológica de lesión escamosa intraepitelial y cáncer.	39
Tabla 4. Objetivo y sus variables, definición, definición operacional escala de medición unidad de medida.	52
Tabla 5. Valores ponderados de citología, impresión colposcópica e histología	57
Tabla 6. Características generales de las pacientes que aceptaron participar en la Unidad de colposcopia INCAN.	60
Tabla 7. Resultados de las interpretaciones citología de frote, biopsia y cono cervical en pacientes que aceptaron participar en Unidad de colposcopia INCAN.	61
Tabla 8. Resultados de la interpretación de citologías de frotis cervicales con inmunotinción P16 y Ki67.	64
Tabla 9. Resultados de la interpretación de biopsias y conos cervicales con inmunotinción P16.	68
Tabla 10. Tinción de las muestras de citología con P16 y Ki67 según las interpretaciones citomorfológicas.	69
Tabla 11. Tinción de muestras de histologías de biopsias y conos cervicales con P16 según las interpretaciones histomorfológicas.	69
Tabla 12. Índices de concordancia interobservador según tipo de muestra interpretada.	70
Tabla 13. Impresión colposcópica.	75
Tabla 14. Impresión colposcópica respecto a diagnóstico final de histopatología con tinción P16.	76
Tabla 15. Resultados de citología con tinción convencional según diagnóstico de biopsia ó cono cervical con tinción H&E.	79
Tabla 16. Resultados de citología con doble tinción según diagnóstico de histología con tinción P16.	82
Tabla 17. Citologías de frotis cervicales que sí reaccionaron a la doble tinción P16Ki67, según resultado final de histología con P16.	83
Tabla 18. Citologías de frotis cervicales sin reacción a la doble tinción, según resultado final de histología con inmunotinción de P16.	85
Tabla 19. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN según interpretación de citología con tinción convencional, con doble tinción P16 Ki67 y colposcopia.	86
Tabla 20. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de doble tinción en citología según grupos de edad	86
Tabla 21. Índices de correlación entre los tipos de citología con tinción Pap, doble tinción e impresión colposcópica.	88
Tabla 22. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la tinción P16 y Ki67 en citología según la tinción P16 en biopsias y en conos cervicales.	89

## FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Estimación de casos con cáncer en hombres y mujeres, a nivel mundial, según tipo de ciudades desarrolladas ó no. ....	9
<i>Figura 2.</i> Incidencia y mortalidad de cáncer del cérvix según regiones del mundo. ....	10
<i>Figura 3.</i> Incidencia del cáncer de cérvix representado en tasa por 100,000 en países de Latino América. ....	11
<i>Figura 4.</i> Registro Hospitalario del INCAN de Guatemala, localizaciones más frecuentes de cáncer en Mujeres. ....	12
<i>Figura 5.</i> Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado que no excluye Alto Grado (ASCH) ....	22
<i>Figura 6.</i> Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS).....	23
<i>Figura 7.</i> Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIBG.....	23
<i>Figura 8.</i> Lesión escamosa intraepitelial de alto grado LEIAG. ....	24
<i>Figura 9.</i> Carcinoma invasivo de células escamosas del cérvix. ....	25
<i>Figura 10.</i> Adenocarcinoma In situ del cérvix.....	25
<i>Figura 11.</i> Adenocarcinoma Endocervical. ....	26
<i>Figura 12.</i> Imágenes de colposcopia en cérvix según hallazgos histomorfológicos. ....	29
<i>Figura 13.</i> Lesiones escamosas intraepitelial de bajo y alto grado en biopsias del cérvix ..... 31	31
<i>Figura 14.</i> Proteína P16 su síntesis y participación en células transformadas. ....	37
<i>Figura 15.</i> Muestras histológicas del cérvix con tinción P16INK4a. ....	41
<i>Figura 16.</i> Flujograma de las actividades realizadas en la investigación. ....	49
<i>Figura 17.</i> Muestras de citologías de frotis cervicales con doble tinción p16ki67 y biopsias de cérvix con tinción P16.....	63
<i>Figura 18.</i> Resultados de citologías cervicales según tipo de tinción. ....	73
<i>Figura 19.</i> Diagnósticos en biopsias cervicales según tinción.....	74
<i>Figura 20.</i> Diagnósticos en conos cervicales según tinción. ....	75
<i>Figura 21.</i> Tipo de lesiones cervicales, diagnosticadas por histomorfología con tinción H&E, según rangos de edad.....	77
<i>Figura 22.</i> Tipo de Lesiones cervicales, diagnosticadas por histomorfología con tinción P16, según rangos de edad. ....	78

## **RESUMEN**

**Introducción:** La citología convencional es un método de cribado de gran rentabilidad pero con falsos positivos y negativos que tienen implicaciones y costes. La tinción de las proteínas P16 y Ki67 en frotis y biopsias del cérvix permiten detectar mejor las células transformadas y podría aumentar la especificidad de la citología cervical para la detección de lesiones intraepiteliales y cáncer invasivo, por lo que merece ser investigada.

**Objetivos:** Evaluar clínicamente la validez y reproducibilidad de la citología con doble tinción P16 y Ki67 en frotis cervicales, y su correlación con los hallazgos colposcópicos e histomorfológicos con tinción P16 en los diferentes tipos de lesiones cervicales de pacientes remitidas para colposcopia al Instituto Nacional de Cancerología de Guatemala por detección de alteraciones citológicas en otros centros.

**Material y Métodos:** Estudio descriptivo transversal. Fueron incluidas 210 pacientes que tenían un resultado de citología convencional anormal (ASCUS, AGUS, ASCH, LEIBG, LEIAG y cáncer invasivo). De cada paciente se obtuvo exfoliado para citología cervical y biopsias dirigidas del cérvix por colposcopia; a 45 pacientes se les realizó conización cervical. Las citologías en frotis fueron procesadas con doble tinción (P16 y Ki67) y los cortes histológicos con la tinción p16. Fueron evaluadas por tres patólogos y un citotecnólogo independientes de modo ciego, y 20 muestras fueron excluidas por acuerdo en su mala calidad y el resto compusieron el grupo de estudio.

**Resultados:** Considerando como diagnóstico correcto el obtenido del estudio histológico, la sensibilidad y especificidad para detectar correctamente lesión escamosa intraepitelial de alto grado o cáncer invasivo mediante el estudio citomorfológico del exfoliado cervical con doble tinción fueron 78.95% IC95 (71.03-86.87) y 94.74% (89.06-100) respectivamente; el

valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) fueron 95.74% (91.13-100.0) y 75% (65.82-84.18). La evaluación de las citologías con tinción convencional mostró una sensibilidad y especificidad de 78.64% y 75.85% respectivamente. Los índices de concordancia Kappa ponderado interobservador fueron: entre 0.66-0.83 en la citología con doble tinción, entre 0.80-0.89 en biopsias y entre 0.76-0.90 en conos cervicales, ambos con tinción P16 ( $p < 0.0001$ ). Por otro lado, el análisis de la doble tinción en mujeres mayores de 30 años mostró mejores valores de sensibilidad y VPP de 78.43 y 95.24 respectivamente. La evaluación de la impresión colposcópica respecto a histología con tinción P16 mostró una sensibilidad del 71.93%, especificidad del 86.84%, VPP 89.13% y VPN del 67.35% respecto a histología con tinción P16. Y la mejor correlación se produjo en casos de LEIAG y cáncer cervical invasivo.

Respecto a la correlación positiva o negativa de la doble tinción de citología con el diagnóstico en histología con tinción P16, la sensibilidad y especificidad fueron 74.56% IC95 (66.13–82.99) y 93.42% IC95 (87.19–99.65) respectivamente, con un VPP y VPN 94.44% (89.16-99.73) y 71% (61.61-80.39) respectivamente.

Finalmente, el índice de correlación Tau b Kendall de la citología con doble tinción respecto al resultado final de histología con tinción P16 fue 0.709 y el de la impresión colposcópica 0.434 ( $p < 0.0001$ ).

Conclusiones: La especificidad de la citología cervical con doble tinción es mayor que la de la citología convencional y los falsos positivos son menores, con una sensibilidad comparable. La sensibilidad y VPP fueron mayores en el grupo etario  $> 30$  años. La concordancia entre patólogos fue buena en la interpretación de citologías con doble tinción p16-ki67 y muy buena en biopsias y conos con tinción P16. El mejor índice de correlación lo presentaron la citología con doble tinción y la histología con tinción P16. Nuestros

resultados sugieren que esta prueba podría ser útil para reducir estudios innecesarios y evitar conizaciones por discordancia cito-histológica.



## SUMMARY

**Introduction:** The conventional cytology screening is a highly profitable method but with false positives and negatives that have implications and costs. The staining of Ki67 and P16 protein in smears or biopsies of the cervix extended and allows better detection of transformed cells and may increase the specificity of cytology for detecting cervical intraepithelial lesions and invasive cancer, so it deserves to be investigated.

**Objectives:** To evaluate the validity and reproducibility of clinical cytology by double staining P16 and Ki67 in cervical smears, and its correlation with colposcopic findings and histomorphological stained P16 in different types of cervical injuries in patients referred for colposcopy to the National Cancer Institute of Guatemala by detection of cytological abnormalities in other centers.

**Material and Methods:** Cross-sectional study. They were included in the study 210 patients who had an abnormal conventional cytology results (ASCUS, AGUS, ASC H, LSIL, HSIL and invasive cancer). From every patient obtained an exfoliated for cervical cytology and directed biopsies of the cervix by colposcopy; 45 patients underwent cervical conization. Pap smears were processed with double staining (P16 and Ki67) and histological staining with p16. They were excluded from the study 20 samples for poor quality and each sample was evaluated by three pathologists and independent cytotechnologist of blinded fashion.

**Results:** Considering the correct diagnosis as obtained from the histological study, the sensitivity and specificity for detecting squamous intraepithelial lesion of high grade or invasive cancer correctly by exfoliated cervical cytomorphologic study with double staining was 78.95% CI95% (71.03-86.87) and 94.74% (89.06-100) respectively; the positive predictive value (PPV) and negative (NPV) were 95.74% (91.13-100.0) and 75% (65.82-84.18) respectively. The conventional Pap smear staining was evaluated, whose sensitivity and specificity were 78.64% and 75.85% respectively. The interobserver weighted Kappa concordance indexes were: between 0.66 to 0.83 in the cytology with double staining,

among 0.80 to 0.89 in biopsies and amongst 0.76 to 0.90 in cervical cones, both with stained P16 ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, the analysis of double staining in women over 30 years showed better sensitivity values and PPV 78.43 and 95.24 respectively. The evaluation of colposcopic impression regard a histology with staining P16 showed a sensitivity of 71.93%, specificity 86.84%, PPV 89.13% and NPV of 67.35% about histology with staining P16. And the best correlation was in cases of HSIL and invasive cervical cancer.

Also was evaluated the positive or negative correlation of the double staining of cytological diagnosis in regard to histology with staining P16; The sensitivity and specificity were 74.56% CI 95 (66.13-82.99) and 93.42% CI 95 (87.19-99.65) respectively and 94.44% PPV and NPV CI 95% (89.16-99.73) and 71% CI 95% (61.61-80.39) respectively.

Finally, the Tau b Kendall correlation index to the cytology with double staining respect to the final result of histology with staining P16 was 0.709 and of the colposcopic impression was 0.434 ( $p < 0.0001$ ).

Conclusions: The specificity of cervical cytology with double staining is greater than the conventional cytology and lower are the false positives, with comparable sensitivity. The sensitivity. and PPV was higher in the age group  $> 30$  years. The concordance between pathologists was good in the interpretation of the cytology with double staining p16-ki67 very good at biopsies and cones with staining P16. The best correlation index showed the double staining cytology and histology staining P16. Our results suggest that this test could be useful to reduce and avoid unnecessary studies conizations by cyto-histologic discordance.



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer del cérvix es un problema de salud pública en países en vía de desarrollo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 casos nuevos en el mundo, y es la causa de 190,000 muertes anuales, de las cuales el 78 % ocurre en países en vía de desarrollo.

América Central ocupa la sexta región de mayor frecuencia de diagnóstico de cáncer del cérvix, siendo la incidencia de 23.5 y la mortalidad de 8.9 por 100,000 habitantes(1). Pero dentro de ella, en Guatemala se ha reportado que la tasa de incidencia del cáncer del cérvix es de 39,6 por 100,000 habitantes y la mortalidad es de 16.8 por 100,000 muertes, considerándose por tanto país de incidencia elevada.(2)

En los países denominados desarrollados y en desarrollo, el cáncer de cuello uterino ha cedido su lugar como el principal tipo de cáncer al cáncer de mama, que ahora es el cáncer más frecuente en la mujer; sólo en el África subsahariana, América Central, sur centro de Asia y Melanesi sigue actualmente siendo el principal cáncer que afecta a las mujeres.(3)

En Guatemala, como en la mayoría de países, el método de cribado para detección de lesiones preinvasivas y cáncer de cérvix utilizado frecuentemente es la citología convencional. Y el Instituto Nacional de Cancerología INCAN es el mayor centro de referencia para detección y tratamiento del cáncer de cérvix; anualmente son atendidas un promedio de 250 pacientes en la Unidad de colposcopia con resultado de citología con lesiones preinvasivas, para efectuar biopsia y en ciertos casos conización cervical con asa diatérmica o histerectomía.

Es bien conocido que las lesiones preinvasivas del cérvix tienen el potencial de producir cáncer invasivo, siendo la tasa de progresión del 1% para lesiones escamosas

intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y de 34% para lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG). (4)

Por ello, los esfuerzos de salud pública para disminuir los índices tanto de incidencia como de mortalidad en los diferentes países, se han basado en la realización de jornadas y campañas para ofrecer la citología exfoliativa del cérvix, test conocido como Papanicolaou, siendo esta una prueba de cribado con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 60%. (5)

La estrategia suele basarse en general en el empleo de la citología convencional como primer escalón para la detección de las lesiones preinvasivas del cérvix, y al tener resultados anormales se confirma o descarta el diagnóstico con el estudio histológico de biopsia obtenida bajo visión colposcópica. (6)

La citología por tanto no es un método de diagnóstico sino de rastreo, y se ha reportado que la discrepancia entre el resultado de la citología y de la histología, es mayor en lesiones de bajo grado con respecto a las de alto grado, siendo 83.6% y 16.4% respectivamente (7). De ellas, se estima que el 67 % suceden por error en la interpretación y 33% por la calidad de muestra o toma de la muestra.

Por ello se han investigado y utilizado biomarcadores capaces de identificar células que estén transformándose, o sea que estén en proceso de neoplasia. Las células transformadas están afectadas por virus del papiloma humano de alto riesgo VPHAR, que como más adelante describiremos es el principal agente facilitador o causante del cáncer de cérvix, y estos marcadores detectan con mayor sensibilidad y especificidad a LEIBG y LEIAG. Y de hecho, por ejemplo, se ha descrito que la doble tinción P16 Ki67 en la citología mejora el rendimiento y precisión de la citología convencional y alcanza una sensibilidad del 95,1% y una especificidad del 82%. (8)

Y es que, por un lado la interpretación de la citología de los exfoliados cervicales puede estar afectada por la observación de imágenes celulares dudosas en ocasiones; y por otro lado, la limitada especificidad de la citología tradicional hace que en algunos casos no permita identificar o discriminar los casos verdaderos sanos. Todo ello reduce el rendimiento del cribado y por tanto también de la consecución del objetivo relevante para la salud pública, la detección precoz de las lesiones precursoras que con el tratamiento oportuno conduce a evitar el cáncer de cérvix en muchos casos.

Además, la discrepancia o falta de correlación de la citología convencional con respecto a la colposcopia y/o histología obliga al clínico a realizar conizaciones cervicales que a veces son innecesarias, debido a que los resultados finales en pieza final o cono cervical son negativos, o sea que no se evidencia lesión cervical. Y ello supone un elevado coste económico, de empleo de recursos y de afectación de mujeres (ansiedad y riesgo de complicaciones y secuelas) sin ningún efecto positivo.

### 1.1. Epidemiología del cáncer de cérvix.

Como hemos descrito, en países en desarrollo el cáncer de cérvix es el segundo diagnóstico más frecuente y tercera causa de muerte por enfermedad de cáncer en las mujeres. De hecho, hubo un estimado de 444,500 nuevos casos de cáncer de cuello de útero y 230,200 muertes en países en desarrollo en 2012 (ver fig. 1).

Según la región, las tasas de incidencia más altas se registran en el África subsahariana, América Latina y el Caribe, y Melanesia; la tasa más baja se encuentra en Asia occidental, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte. Y casi el 90% de las muertes por cáncer de cuello uterino se produjo en las siguientes partes del mundo: 60.100 muertes en África, 28.600 en América Latina y el Caribe y 144.400 en Asia. India, el segundo país más

poblado del mundo, presentó el 25% de las muertes por cáncer de cuello uterino (67.500 muertes).

En resumen, el cáncer de cérvix es mucho más común en los países en desarrollo, donde ocurre el 85% del total de casos de muertes por cáncer cervical.

Y el cáncer cervical alcanza el 15% del total de cánceres en la mujer, con un riesgo, antes de los 65 años, del 1.5% en los países desarrollados. En la fig. 2 se observa que América Central ocupa la sexta región, siendo la incidencia de 23.5 y mortalidad de 8.9 por 100,000 habitantes con diagnóstico de cáncer de cérvix. (9)

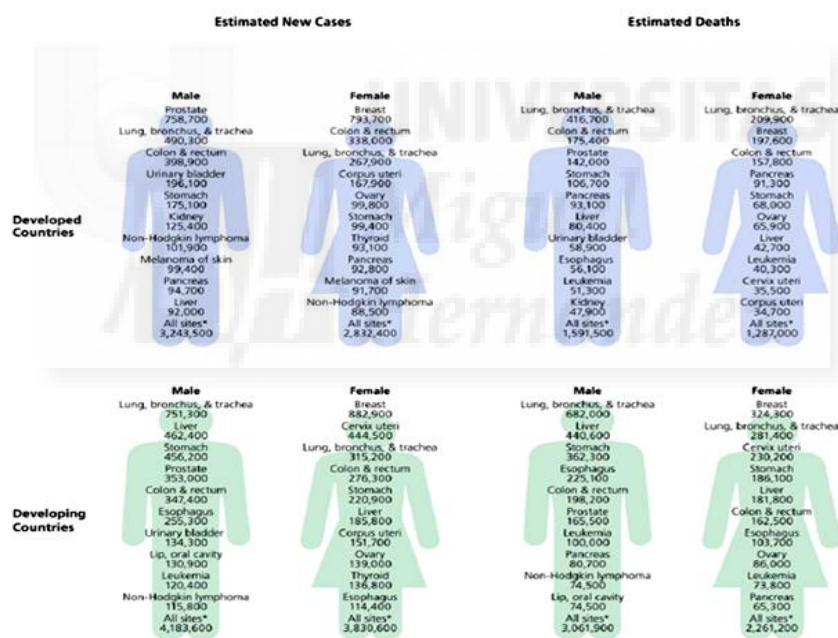


Figura 1. Estimación de casos con cáncer en hombres y mujeres, a nivel mundial, según tipo de ciudades desarrolladas ó no.

Fuente: Globocan. CA: A Cancer journal for Clinicians, 2012.

### 1.1.1. Epidemiología del cáncer del cérvix en latino América.

La alta incidencia de cáncer de cérvix en la región de Latino América se observa en las estadísticas mundiales, que siguen evidenciando las grandes diferencias de incidencia y mortalidad por este cáncer entre países. Así mismo, también es destacable que las tendencias en los países en desarrollo no han modificado su incidencia a lo largo de los últimos años. (Restrepo, 1993), lo que sugiere que no se ha avanzado en demasía en lo que parece un objetivo prioritario de salud: evitar o al menos reducir la mortalidad por un cáncer evitable.

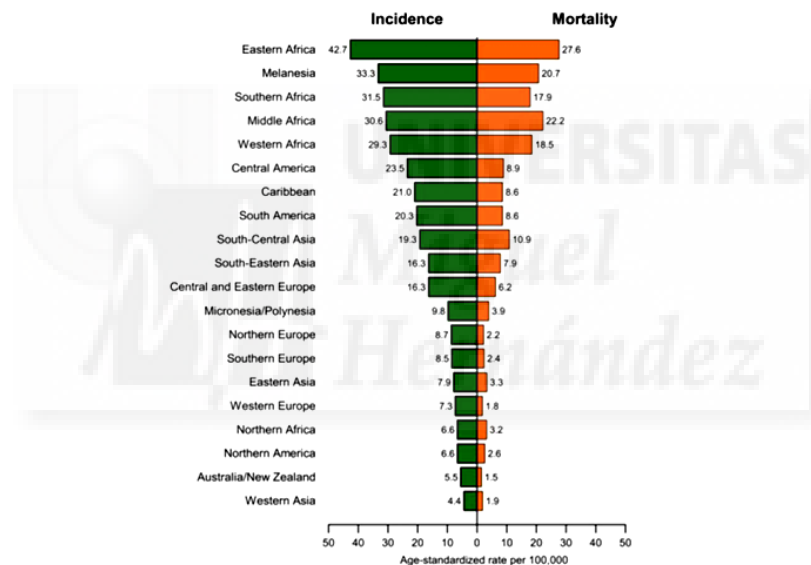


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer del cérvix según regiones del mundo.

Fuente Globocan 2012

Si bien se reconoce la dificultad en recabar los datos epidemiológicos de esta enfermedad debido a que el control y registro de algunos países es deficiente, según los datos obtenidos y publicados por GLOBOCAN 2,000, se observa que los países como Haití, Nicaragua y Bolivia tienen las más altas tasas de incidencia en Latino América. Y que Guatemala tiene

una incidencia similar a México, Honduras, El Salvador y Perú, con una tasa aproximada de 39 por 100,000.(2) Ver fig.3.

### 1.1.2. Epidemiología del cáncer de cérvix en Guatemala.

Otra prueba de la gran importancia del cáncer de cérvix en Guatemala, es reflejada por los datos presentados por el Instituto Nacional de Cancerología INCAN de Guatemala del año 2,008. En ellos se establece que la mayor frecuencia de tumores en las mujeres, según localización, es el cáncer invasivo del cérvix en un 34.2 %; seguida por el cáncer In-situ del cérvix, un estadio previo al cáncer invasivo, con 4.9%. Ver fig. 4.

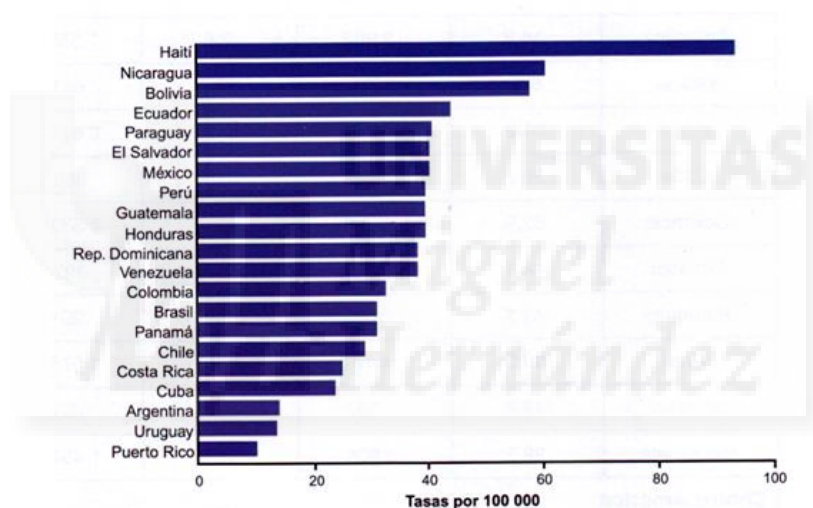


Figura 3. Incidencia del cáncer de cérvix representado en tasa por 100,000 en países de Latino América.

Fuente Globocan 2000.

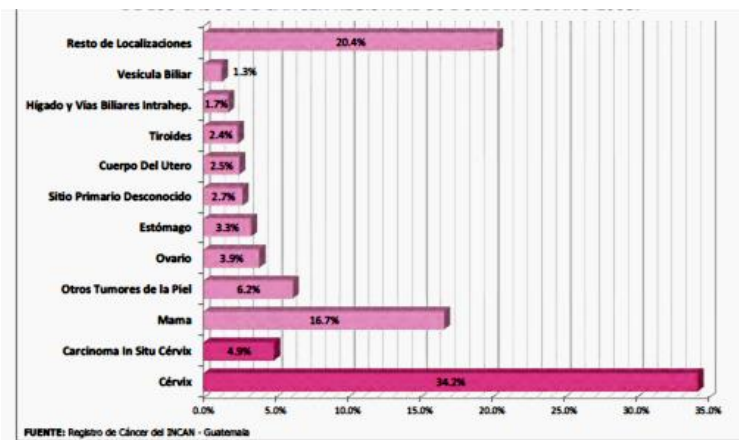


Figura 4. Registro Hospitalario del INCAN de Guatemala, localizaciones más frecuentes de cáncer en Mujeres.

Fuente: registros de cáncer INCAN 2008

De hecho, se observa que la suma de los casos de cáncer invasivo e in-situ del cérvix alcanza el 39.1% del total de los tumores según localización en las mujeres que asistieron al INCAN de Guatemala. (Instituto Nacional de Cancerología “Bernardo del Valle” de Guatemala, 2,008)

### 1.2 Virus del papiloma humano, agente causal biológico del cáncer de cérvix.

La propuesta inicial de que el cáncer de cuello uterino es una enfermedad de transmisión sexual se hizo en 1842 por el Dr. Rigoni-Stern, cuando informó que las prostitutas fueron las más afectadas por el cáncer de cuello uterino.

Posteriormente, múltiples estudios epidemiológicos confirmaron que el contacto sexual (inicio temprano de las relaciones sexuales, múltiples parejas sexuales, los varones de alto riesgo, y las infecciones por virus del herpes simple) era un riesgo para el cáncer del cuello uterino. Pero la verdadera causa no fue identificada hasta finales de 1970, cuando

zurHausen descubrió el virus del papiloma humano (VPH) en el cáncer de cuello uterino y genitales externos. Aunque antes, desde los clásicos trabajos de Richart, se conocía cómo cambios neoplásicos intra epiteliales preceden al cáncer de cuello uterino.(10)

En la actualidad, se conoce que ciertos tipos de VPH causan casi todos los cánceres de cuello uterino y por tanto cabe considerar los mismos como consecuencia de enfermedad de transmisión sexual.

Y es que múltiples estudios han concluido que el factor definitivo en la etiología del cáncer del cérvix es la infección por diversos tipos de virus del papiloma humano del cérvix, y sobre todo la persistencia de los VPH denominados de alto riesgo u oncogénicos; y de hecho, en los casos de cáncer de cérvix se ha detectado el VPH en el 95 al 99.7%.(11),(12)

El VPH es una partícula que contiene material genético de ácido desoxirribonucleico ADN de 8,000 pares de bases, cubierta con una cápside de proteínas. Existen más de 100 tipos identificados que se han clasificado en dos grupos según su capacidad de transformar o no las células hospederas del cérvix: de bajo riesgo y de alto riesgo.(13)

El VPH de alto riesgo (VPHAR) contiene en su genoma de ADN varios genes denominados oncogenes por su capacidad de transformar a la célula alterando el ciclo celular. Entre estos oncogenes están los denominados E6 y E7 , E de “early” en inglés o temprano en español, capaces de inmortalizar a las células y así evitar que lleguen a la muerte celular programada o apoptosis.(14) Se han clasificado en este grupo los siguientes tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69 y 70, estando asociados los dos primeros con el 70% de casos de cáncer del cérvix.(15)

Como decíamos, los tres genes que poseen capacidad de la estimulación de proliferación son: E5, E6 y E7 pero el gen E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección.



Estimula a la célula en el crecimiento mediante la formación de un complejo con el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. (14)

Y también se demostró que el E5 ayuda a prevenir la apoptosis después del daño de ADN. Sin embargo, en células infectadas por el VPH en lesiones que progresan a cáncer cervical, el ADN viral se halla en estado episomal, y con frecuencia al integrarse en la célula huésped de ADN la codificación de la secuencia del E5 es deletada. (16)

Por lo tanto, la proteína E5 no es obligatoria para desencadenar la carcinogénesis mediada por el VPH. Un papel más significativo para la transformación maligna de la célula son las proteínas y sus genes E6 y E7. Estas proteínas son siempre expresadas en tejidos o tumores malignos, ya que son capaces de immortalizar a las células humanas transformadas, es decir con su expresión estas no son obligadas a entrar a apoptosis.

Este conocimiento de la transformación de las células por VPH ha estimulado la investigación sobre los posibles mecanismos oncogénicos, y seguidamente expondremos los aspectos más relevantes identificados actualmente:

Se han descrito varias funciones posiblemente oncogénicas para las proteínas de los genes del VPH E6 y E7, que actuarían bloqueando dos proteínas supresoras de tumores. Las primeras observaciones revelaron que E6 interactúa con la proteína p53 y E7 con la proteína del Retinoblastoma Rb. De hecho, algunas de las funciones importantes de la proteína E6 se originan a partir de su interacción con la p53 para posteriormente degradarla, así como a la proteína BAK denominada proapoptótica, lo que se traduce en la resistencia a la apoptosis y el aumento de la inestabilidad cromosómica. (17)

Además, la activación de telomerasa y el postulado de inhibición de la degradación de las quinasas de la familia SRC por medio de la oncoproteína E6, parecen cumplir funciones

importantes en la estimulación del crecimiento. Se ha especulado que la estabilización de las formas activadas de miembros específicos de la familia de las cinasas SRC podría contribuir a la transformación del VPH. (18)

La Proteína P16 es una molécula antitumoral, ya que controla el ciclo celular inhibiendo a la ciclina CDK4. Su actividad cinasa no permite que la célula replique el ADN. La cinasa INK4A dependiente de ciclina inhibidora conocida como p16 parece contrarrestar estas funciones. Sin embargo la E7 interactúa y degrada la Rb, liberando posteriormente el factor de transcripción E2F de Rb e inhibe al gen INK4A.(19)

La alta actividad de E2F podría conducir a la apoptosis en células que expresen el E7. Sin embargo la E7 puede estimularla fase S cuando a su vez estimula los genes de ciclina A y ciclina E. Y parece bloquear la función de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina WAF1 también conocido como CIP1 y p21 y KIP1 también conocido como p27.(17)

La proteína E6 parece verse afectada por INK4A, mientras que la proteína E7 no está afectada por esta inhibición de la activación directa de las ciclinas A y E. La E6, a su vez, evita la apoptosis al degradar o inhibir la función de las proteínas p53 y BAK.(20).

Actualmente no se ha observado un papel en la conversión de la célula a maligna para las proteínas tempranas del VPH E1, E2 y E4. En el sentido contrario sucede con las L1 y L2, L de "Late" en inglés o tardío en español, que son dos proteínas estructurales que conforman la cápside viral y que no se expresan en las células precancerosas ni malignas, pero han sido importantes para el desarrollo de vacunas.

Y es que el sistema inmune es importante en el control de infecciones de VPH en general y en el efecto en cérvix en particular. (21) Hay pruebas de la participación de la inmunidad

celular por medio de linfocitos T-ayudadores así como de la inmunidad humoral en las células en regresión de las lesiones premalignas. (22)

Ello sugiere que el escape a la vigilancia inmunológica puede ser un paso importante en la progresión de los tumores vinculados al VPH, y por tanto una estrategia de tratamiento inmune podría obtener efectos positivos. Además hay otros dos modos de control en la proliferación de células que están infectadas por el VPH para protegerlas en contra de la transformación maligna: una consiste en la inhibición de la función oncogénica viral y el otro en control de la transcripción de los genes virales.(11)

La proteína E6, compuesta por 150 aminoácidos y por dos dedos de Zinc que parecen esenciales para su función, afecta a las células epiteliales en el ser humano, y actúa junto con el factor activado Ras transformando a las células. Así mismo es capaz de afectar a diversas proteínas tales como supresores tumorales (entre ellas la de mayor relevancia es p53), transductores de señalización, crecimiento de la célula y de las Ubiquitin ligasas, la cual es responsable de la degradación de proteínas por medio de las proteosomas. La actividad más relevante de la proteína E6 es la degradación de p53 a través de la unión de la ubiquitin ligasa, dejando a la célula a merced del daño del ADN. Otra actividad relevante es su función como factor de transcripción que estimula a la telomerasa, factor estimulador del endotelio vascular, fibronectina y del oncogén c-Myc(23).

En cuanto a la proteína E7, se sabe que afecta la regulación de la proliferación celular, interactuando con proteínas reguladoras del ciclo celular, especialmente en la transición de la fase G1 a la fase S. Además se asocia con las desacetilasas de histonas, factores de transcripción del tipo AP1, la proteína de interacción con la caja TATA, diferentes ciclinas y con cinasas dependientes de ciclinas conocidas como CDK. La proteína E7 al igual que la proteína E6 son expresadas durante el proceso de transformación maligna de la célula.(24)

En las líneas celulares que han sido transfectadas por el ADN de E6 del VPH, el gen CDKN2A que codifica al INK4A es normalmente inactivado por metilación, la mutación o eliminación. INK4A inactiva a los complejos de la ciclina D1-CDK4 o a la ciclina D1-CDK6, lo que impide la expresión de ciclina E y por tanto la progresión a través del ciclo celular. La interrupción constante de la función del gen CDKN2A en las células E6-inmortalizadas indica que INK4A puede interferir funcionalmente con la actividad de transformación de E6.(25)

Por otro lado, la expresión del gen E7 puede estimular directamente a las ciclinas A y E a través de su interacción con la pRb. Y en las células que se immortalizan por E6 y E7, la función del gen CDKN2A se mantiene intacta. (26)

En resumen, la actividad más relevante de la proteína E6 es la degradación de p53 a través de la unión de la ubiquitin ligasa, dejando a la célula a merced del daño del ADN. Y otra actividad relevante es su función como factor de transcripción que estimula a la telomerasa, factor estimulador del endotelio vascular, la fibronectina y del oncogén c-Myc.(27)

Y el oncogen E7 de VPH de alto riesgo se une a la célula huésped con Rb epitelial, y a continuación, se libera E2F liberando o produciendo p16 como un intento para frenar y equilibrar el ciclo celular, ya que también es activado por E2F libre. Y, por ello, hay un aumento paradójico de la p16 en la displasia de alto grado que se puede detectar con inmunohistoquímica.(28),(29)

Finalmente, los virus de papiloma humano de alto riesgo aumentan también el Ki67, el cual es una proteína nuclear que está presente en la proliferación celular, expresada en todas las fases del ciclo celular excepto en fase G0, y que es por tanto un marcador de proliferación celular que puede también determinarse.(30)

### 1.3. Pruebas diagnósticas para la detección de lesiones del cérvix

#### 1.3.1. Citología

En 1928 George Papanicolaou, médico griego, observó en frotis del cérvix células malignas, y a él se le atribuye la descripción de la citología del cérvix y su empleo como una prueba de cribado para la detección de lesiones preinvasivas e invasivas. En agosto de 1941 se publicaron los resultados en el American Journal of Obstetrics and Gynecology con el título de “Valor diagnóstico del frotis vaginal en carcinoma del útero”, proponiendo la toma citológica como método de fácil obtención y poco molesto para las pacientes.(31)

A partir de ahí, el tamizaje en la detección del cáncer de cérvix se inició con la citología cervical. Como es lógico, en esta prueba se puede medir como en otras de cribado la sensibilidad, que corresponde a la detección de los casos verdaderos con enfermedad, y la especificidad, que corresponde a la detección de los casos verdaderamente sanos, y que reflejan la utilidad y lo que se puede esperar del test.

El impacto y la importancia de estos hallazgos se multiplicó a partir de unas jornadas médicas de frotis cervicales en Columbia Británica y Kentucky en el año de 1950, y con ello, los Estados Unidos de América disminuyeron un 72 y 74 % la mortalidad de cáncer de cérvix.(32)

Por tanto, la citología quedó validada como una prueba de tamizaje para la detección de lesiones cervicales con capacidad de influir en la mortalidad de la enfermedad. Y en el año 1975 la WHO (World Health Organization) describió la nomenclatura de displasia y la asignó a las lesiones precursoras de cáncer de cérvix (leve, moderada y severa); en esta clasificación, al carcinoma epidermoide In-situ se le consideró aparte.

Posteriormente, en 1980 aparece una nueva nomenclatura de la sociedad de patólogos ginecólogos por sus siglas en inglés ISGP clasificando la patología que nos ocupa en carcinoma epidermoide intraepitelial CIN 1, 2 y 3e incluyendo al carcinoma epidermoide In-situ en el CIN 3.

Finalmente, debido al pronóstico y para orientar el manejo clínico de las lesiones preinvasivas, recientemente se propuso la nomenclatura de Bethesda, cuya clasificación cambia la designación de CIN 1 y condiloma en lesiones intraepiteliales de bajo Grado LEIBG y a los casos de CIN 2 y 3 en lesiones intraepiteliales de alto grado LEIAG.(33) ver Tabla1.

En relación con todo lo expuesto, la importancia del tamizaje para disminuir el riesgo de la mortalidad por cáncer de cérvix fue analizada en un metaanálisis de 24 estudios. Dichos estudios se desarrollaron desde 1995 al 2012 y la conclusión principal fue que el cribado permite una reducción de la mortalidad por cáncer de cérvix con una odds ratio OR de 0.65 y riesgo relativo RR es de 0.56.(34)

Uno de los problemas de cualquier prueba de cribado es el falso negativo (en cierto modo inverso de la sensibilidad). Diversos estudios han situado los falsos negativos para las lesiones premalignas y el cáncer cervical entre el 15 y 50% respectivamente, y depende de la técnica de la toma y calidad de la muestra, y lógicamente también de la lectura e interpretación de la misma. Y el otro problema es el de los falsos positivos, que generan estrés y pruebas innecesarias, y en este sentido se ha descrito hasta un 30% de falsos positivos con la citología convencional para ambos grupos de lesiones. (35)

El o los criterios secundarios subjetivos en la interpretación de las pruebas de citología con tinción papanicolaou están sujetos a una marcada variabilidad inter e intraobservador, y ello

influye en una variable pero relativamente baja sensibilidad para detección de las lesiones de cuello uterino en una sola toma (tan bajo como 66% de sensibilidad, confirmada con biopsia para las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado).(19)

En la clasificación de Bethesda, para fines prácticos se considera a detección de células escamosas atípicas de significado indeterminado (por sus siglas en inglés ASCUS) como umbral de la prueba para el CIN 1 o LEIBG y se usa con frecuencia como el umbral de referencia de citología que requiere estudios adicionales. Su diagnóstico se realiza por exclusión de alteraciones mayores, pero se refiere a cambios más acusados que los atribuibles a un proceso reactivo, pero que no son cuantitativa o cualitativamente suficientes para clasificarlos con seguridad como lesión intraepitelial (ver fig. 5).

Los cambios de células escamosas asociados a la infección por VPH abarcan la displasia leve y el CIN 1. Puesto que estas lesiones comparten tipos similares de VPH, y su comportamiento biológico y su tratamiento clínico son similares, está justificado emplear un solo término, LSIL, para describirlas (ver fig.7). Esta combinación ofrece una sensibilidad de casi 68% y una especificidad de casi 75% en su detección citológica.

Sin embargo, el umbral de prueba más apropiado puede ser el diagnóstico de LEIAG (CIN 2-3). Esta combinación da a la citología una sensibilidad de 70 a 80%, con una especificidad de cerca de 95%. Los cambios citomorfológicos necesarios para este diagnóstico son más notables, relación núcleo citoplasma alterada, núcleo hipercromático aumentado, (ver fig. 8).(36)

Tabla 1. Nomenclatura citológica según Sistema Bethesda 2001

---

**Anormalidades de las células epiteliales escamosas:**

**A. Células escamosas atípicas (ASC)**

1. Células escamosas atípicas de significado no determinado (ASC-US)
  - ASC-US: (*Atypical squamous cells of undetermined significance*, células escamosas atípicas de significado indeterminado o incierto.
  - No puede excluirse HSIL (ASC-H)
2. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL)
  - Virus papiloma humano (VPH)
  - Displasia leve (CIN 1).
3. Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (H-SIL):
  - Displasia moderada, displasia severa y carcinoma in situ (CIN 2 y 3)
4. Carcinoma escamosa

**B. Células glandulares atípicas (AGC)**

- Endocervicales (NOS o especificar en comentarios)
- Endometriales (NOS o especificar en comentarios)
- Glandulares (NOS o especificar en comentarios).

**Nomenclatura histológica para precursores de carcinoma:**

- Lesión escamosa intraepitelial de Bajo Grado (L-SIL):  
Neoplasia intraepitelial Grado I (CIN I)
  - Lesión escamosa intraepitelial de Alto Grado (H-SIL):  
Neoplasia intraepitelial Grados II y III
- 

Fuente: Anales de Facultad Medicina Lima 2005; 66(2)

En conclusión, en estudios de meta análisis se determinó que la citología de exfoliado cervical tiene una sensibilidad y especificidad para LEIAG del 70 y 60% respectivamente.(5)(37). Lo cual ha aportado gran utilidad clínica, pero no es perfecto y por ello se pretende mejorar.

Por ejemplo, se ha intentado mejorar la sensibilidad de la detección sistemática por medio de la citología con base líquida, como por ejemplo ThinPrep. Sin embargo se comprobó en un estudio que la citología convencional tuvo ligeramente mayor sensibilidad y especificidad que el ThinPrep.(38)



Efectivamente, se comparó la sensibilidad y especificidad del ThinPrep respecto a la de la citología convencional, teniendo el primero 65 y 76 % respectivamente frente al 76 y 86 % para citología convencional (39),(40). Estadísticamente no se encontró significancia importante entre ambos tipos de citología; sin embargo hay ventajas en la citología ThinPrep como el tiempo de lectura, mayor representatividad celular y disminución de artefactos, y por ello se ha desarrollado en muchos centros su empleo.(39)(41)(42)(43).

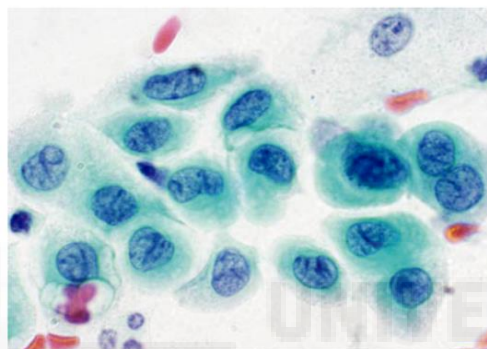
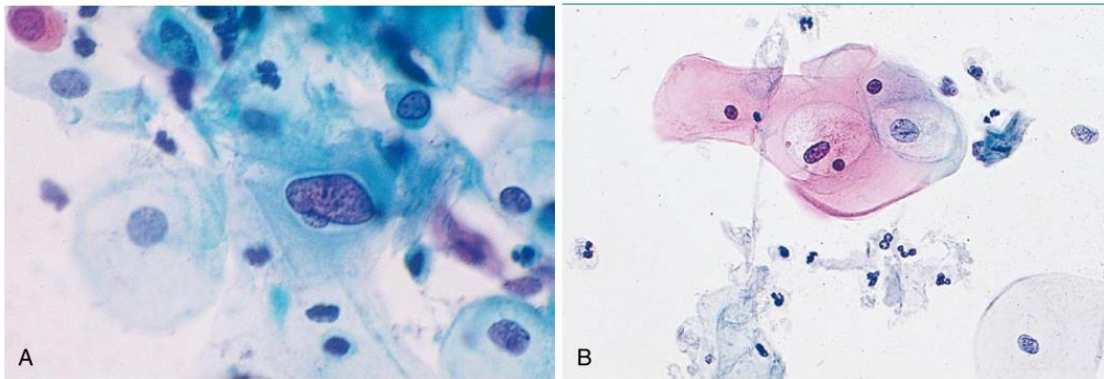


Figura 5. Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado que no excluye Alto Grado (ASCH)

Estas células presentan membrana nuclear irregular. No hay Hiperchromasia ni tamaño aumentado, sin embargo, no es concluyente de LEIAG.

**Fuente** Libro de Citology. Cervical and Vaginal cytology. Edmun S. Cibas

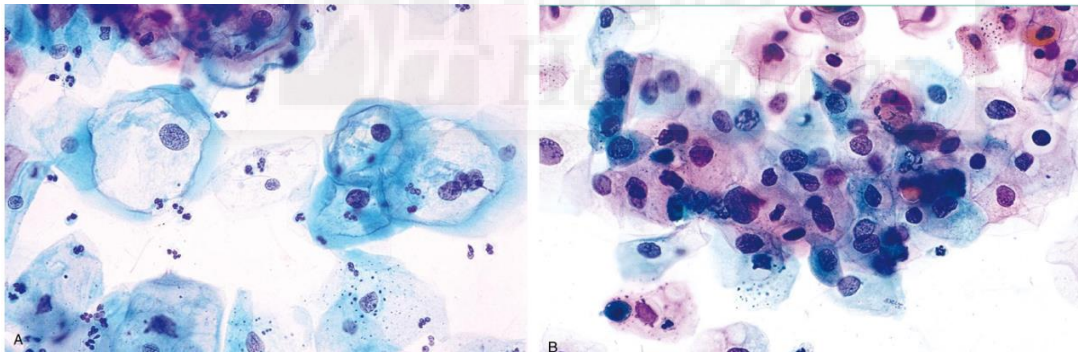
Sin embargo, un estudio efectuado para evaluar la concordancia en 4,948 citologías de base líquida en la interpretación de ASCUS y LEIBG; el índice de concordancia Kappa ponderado fue de 0.59 con IC 95% (0.57-0.61)  $p < 0.001$ .(44)



*Figura 6.* Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS).

A. El núcleo de esta célula escamosa madura es significativamente agrandada y hay hiperchromasia moderada. Las células de este tipo, sobre todo si son pocos en número, son indicativos, pero no de diagnóstico de una lesión intraepitelial escamosa. B. Algunas células tienen grandes cavidades citoplasmáticas pero atipia nuclear mínima. Es preferible para diagnosticar tales casos como ASC-US cuando las células anormales son pocas y los cambios mínimos.

Fuente Libro de Citology. Cervical and Vaginal cytology. Edmun S. Cibas



*Figura 7.* Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIBG.

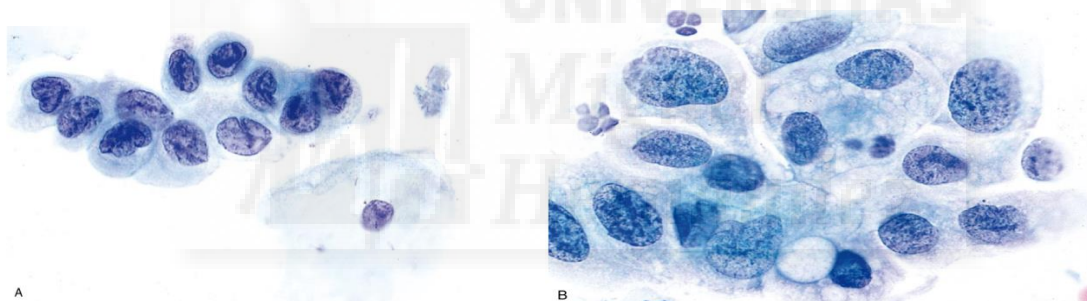
A LEIBG Clásico Koilocitosis, tienen una gran cavidad citoplasmática con un borde interno bien definido y con frecuencia son binucleadas. Ampliación nuclear no puede ser tan marcada como en los LSIL sin koilocitosis. B, LEIBG no koilocítica. Los núcleos son significativamente amplios y muestran hiperchromasia suave y el contorno nuclear con irregularidad. No hay koilocitos definitivos. Este patrón una vez fue llamado displasia leve o CIN1.

Fuente Libro de Citology. Cervical and Vaginal cytology. Edmun S. Cibas

Las células del cérvix ante la infección de los VPHAR que alteran el ciclo celular, responden proliferando y desarrollando lesiones escamosas intraepiteliales de bajo a alto grado (LEIBG y LEIAG respectivamente) hasta llegar a cáncer invasivo. (45-47)

Y es bien conocido desde los trabajos de Richart que las lesiones del cérvix pueden progresar o no hasta cáncer invasivo, y que hay mayor probabilidad de que lo hagan en las lesiones de alto grado que las de bajo grado; de hecho, en la estimación de las tasas de progresión se ha descrito para las LEIBG (CIN 1) y LEIAG (CIN 2, CIN 3) una tasa de progresión hasta llegar a cáncer de 1% y 34 % respectivamente.(45)

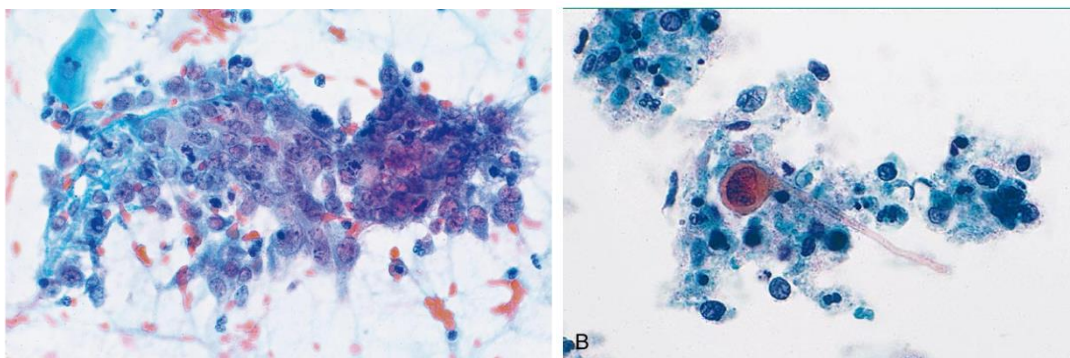
Afortunadamente, las LEIAG tienen una mayor reproductibilidad interobservador al interpretar muestras de exfoliado cervical, aunque se describe para CIN 3 entre 30 a 50% de concordancia.(46)



*Figura 8.* Lesión escamosa intraepitelial de alto grado LEIAG.

A. estas células tienen escaso citoplasma y un núcleo marcadamente hiper cromático con contornos nucleares altamente irregulares. B. Células con una cantidad moderada de citoplasma, antes llamado "displasia moderada" o "NIC 2", se incorporan en la categoría de LEIAG.

Fuente: Libro de Cytology. Cervical and Vaginal cytology. Edmun S. Cibas

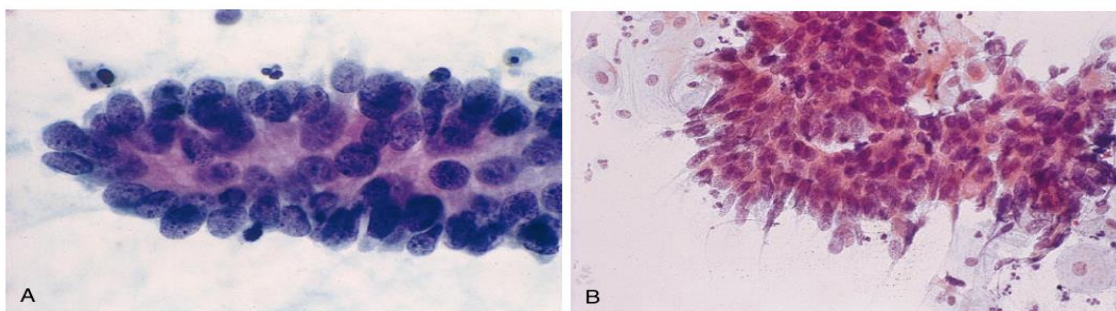


*Figura 9.* Carcinoma invasivo de células escamosas del cérvix.

A. El carcinoma de células Escamosas (CCE), No queratinizante. La organización laminar de las células de carcinoma escamoso pobremente diferenciados con nucléolos y mitosis imita la apariencia de epitelio reparadora, pero el hacinamiento y la disposición desordenada de las células no son típicos de la reparación. B, Una célula renacuajo y algunas diátesis tumorales se ven en este tipo de tumor.

Fuente: Libro de Cytology. Cervical and Vaginal cytology. Edmun S. Cibas

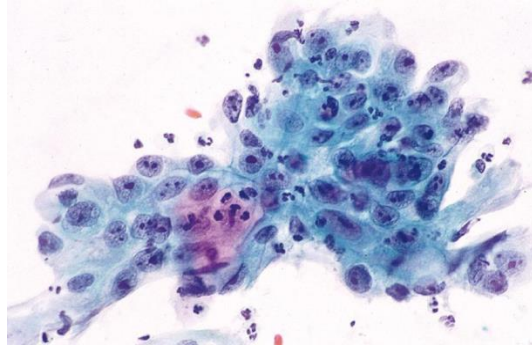
En cualquier caso, la prueba de citología cuando es anormal debe motivar el examen colposcópico y posteriormente una biopsia dirigida. Pero como veremos a continuación, la colposcopia es interpretativa, subjetiva y falible(47). Y, por ejemplo, un estudio realizado en los años 2004 al 2006 en el Hospital Universitario de North Staffordshire evidenció discrepancia o no correlación de citología con respecto a colposcopia en 10% y discrepancia de la citología e histología en 35%.(48)



*Figura 10.* Adenocarcinoma In situ del cérvix

Fuente Libro de Cytology. Cervical and Vaginal cytology. Edmun S. Cibas





*Figura 11.* Adenocarcinoma Endocervical.

Estas células malignas muestran variación en el tamaño nuclear, con nucléolos prominentes y cromatina grumosa.

Finalmente, destacaremos que una revisión de la literatura mostró que las tasas de discrepancia cito histológicas varían desde 11 hasta 16,5%. (49). En relación con esto, algunos estudios clasifican a su vez los errores en exámenes citológicos con una interpretación subdiagnóstica del 2% y sobre diagnóstica del 50%, y ambas son indeseables. El 48% de las discrepancias fueron debido a la mala calidad de las muestras de citología o histología, aunque las discrepancias fueron mayor en lesiones de bajo grado con respecto a las de alto grado, siendo 83.6% y 16.4% respectivamente.(50)

### 1.3.2. Colposcopia

Desde 1950 cobró importancia el uso del colposcopio diseñado y desarrollado por Hinselmann ena partir de 1925. Este equipo consta de un juego de lentes de aumento gradual que amplifica la imagen desde 5 a 40 veces; utiliza luz para observar el aparato genital externo femenino. Para observar el epitelio del cérvix se utiliza ácido acético al 3 o 5 % el cual reacciona en zonas con células que tengan precipitación de nucleoproteínas en procesos neoplásicos. Aunque no muy utilizado actualmente, se coloca lugol para detectar

epitelios con deficiencia de glucógeno, los cuales están transformados y no se tiñen de color oscuro.(51)

La colposcopia permite examinar y evaluar el cérvix, detectando lesiones benignas o sospechosas de malignidad. El principal objetivo de la colposcopia es detectar lesiones premalignas. Y en las últimas décadas se ha consolidado la siguiente estrategia general: El frote cervical advierte la sospecha de lesiones por lo que la prueba de citología al estar anormal debiera estar acompañada del examen colposcópico y posteriormente de una biopsia dirigida, aunque, como se ha dicho, la colposcopia es interpretativa, subjetiva y falible.(47)

Como hemos dicho, al realizar la colposcopia se utilizan reactivos o sustancias como ácido acético y/o lugol; previo a seleccionar el o los sitios de biopsia, algunos sólo utilizan uno y otros ambos. En dos grupos El-Shalakany et al y Muwonge et al. midieron la sensibilidad y especificidad utilizando sólo ácido acético o lugol y asociando ambos; sus resultados fueron para uso sólo de ácido acético una sensibilidad de 81-90% y especificidad del 87-94%. Para uso solamente de lugol la sensibilidad es de 91-97% y la especificidad de 89-97%. Y utilizando primero ácido acético y posteriormente lugol la sensibilidad es de 92.9% y especificidad de 83.5%. (52)

En cualquier caso, para la mayor exactitud del diagnóstico es importante que el médico que practique la colposcopia determine el sitio más apropiado para la toma de biopsia o biopsias ya que de ello depende el diagnóstico histológico, el cual también está sujeto de interpretación.(53)

La colposcopia, en estudios de concordancia interobservador ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 61.1% y 94.4% respectivamente para diferenciar entre LEIBG de las LEIAG. Y tiene un índice de Kappa de 0.843 en las LEIAG. En un estudio realizado en

84,244 pacientes de Columbia Británica, se evaluó la correlación diagnóstica de la citología convencional, colposcopia y la histología de biopsia cervical; en el mismo se concluye que tanto la citología como la colposcopia tienen alta sensibilidad pero de baja a moderada especificidad.(54),(55)

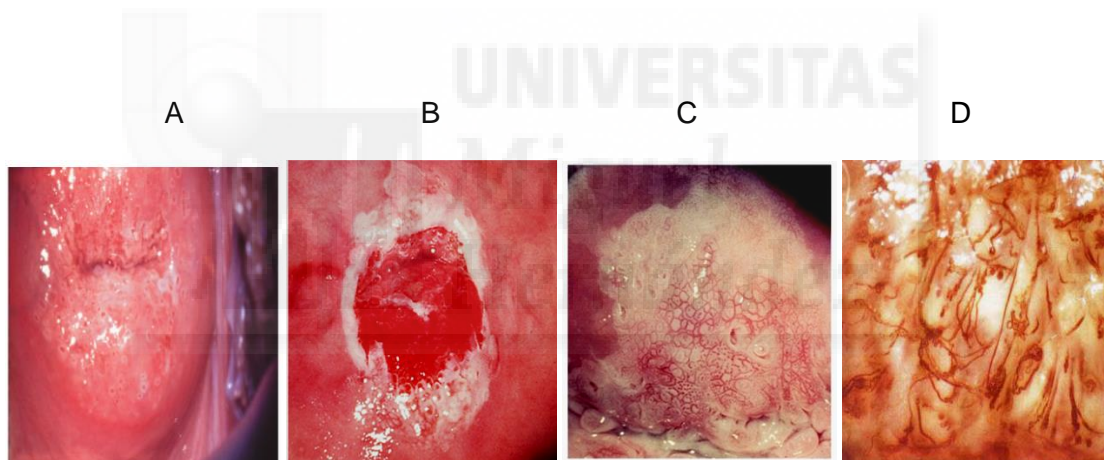
Y en un estudio de meta análisis se evaluó la certeza de la colposcopia, y se comprobó que hay una mayor sensibilidad y especificidad al comparar los cérvix con sospecha de LEIAG o más que con las LEIBG o menos; La sensibilidad se situó entre 80 a 90% y la especificidad entre 48 y 93%; el OR mostró que hay 4 veces más probabilidad de tener concordancia entre la impresión colposcópica y los resultados de LEIAG o más.(56)

En otro metaanálisis que incluyó 9 estudios, se evaluó la sensibilidad y especificidad de la colposcopia, que se mostró del 85% y 69% respectivamente, para las lesiones escamosas de bajo y alto grado y cáncer del cérvix. El grupo de lesiones de bajo grado fue el que obtuvo mayor sensibilidad y menor especificidad; respecto a las lesiones de alto grado y cáncer para las que se observó una mayor especificidad.(56)

El aspecto fundamental para el diagnóstico certero final es la correlación de la citología, la histología y la impresión colposcópica. (47). Y en este sentido, la Federación Internacional para la Patología Cervical y Colposcopia por sus siglas en inglés (IFCPC) propuso en el año 2002 una terminología fácil, reproducible, con una excelente correlación interobservador para predecir colposcópicamente los hallazgos histológicos del cérvix, y ha mostrado una sensibilidad de 86% y especificidad del 30.3% en distinguir un cuello sano versus Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)/ Carcinoma.(54)

Esta propuesta contiene los siguientes criterios para predecir los hallazgos histopatológicos (Metaplasia cervical, enfermedad de bajo grado cervical, enfermedad de alto grado cervical y cáncer invasivo del cérvix):

1. Hallazgos colposc6picos sugestivos de metaplasia cervical: Epitelio acetoblanco delgado, base o puntilleo fino, mosaico fino o yodo positivo. ver fig.12, imagen A
2. Hallazgos colposc6picos sugestivos de enfermedad de bajo grado cervical: Epitelio acetoblanco delgado, base o puntilleo fino, mosaico fino o yodo positivo. ver imagen B
3. Hallazgos colposc6picos sugestivos de enfermedad de alto grado cervical: Epitelio acetoblanco denso, puntuaci6n o puntilleo grueso, mosaico grueso, vasos at6picos y yodo negativo. Ver imagen C
4. Hallazgos colposc6picos sugestivos de c6ncer invasivo del c6rvix: erosi6n, acetoblanco denso, puntuaci6n o puntilleo grueso, mosaico grueso, vasos at6picos. Ver imagen D



*Figura 12. Im6genes de colposcopia en c6rvix seg6n hallazgos histomorfol6gicos.*

A. Imagen de c6rvix con ectopia, tejido con epitelio ac6tico positivo tenue, asociado a cambios de reparaci6n o metaplasia inmadura. B. Epitelio ac6tico positivo blanco, elevado asociado a LEIBG o Condiloma. C. Epitelio ac6tico positivo color ostra, asociado a vasos en mosaico, base o puntilleo, tonalidades mezcladas de ac6tico positivo, asociado a LEIAG. D. Epitelio asociado a vasos at6picos especialmente en lesiones microinvasivos.

Fuente: Clinical Gynecologic Oncology: eight edition, Enfermedad preinvasiva cervical.



### 1.3.3. Histología del cérvix

La histología es el diagnóstico definitivo de lesiones cervicales, que concluye con la interpretación de las muestras obtenidas del cérvix por medio de biopsias dirigidas por colposcopia y conizaciones o LLETZ. Pero lógicamente la certeza del diagnóstico de histología respecto a lo que padece la mujer depende de varios factores tales como la representación de la muestra obtenida, los cortes y tinción de las muestras y la interpretación del patólogo.

Las lesiones intraepiteliales se han clasificado a partir de la nomenclatura ó sistema Bethesda del 2001, en:

- 1) Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) conocidas anteriormente como NIC 1; las cuales abarcan pérdida de polaridad de las células, núcleos hipercromáticos, falta de diferenciación en el tercio inferior del epitelio y
- 2) Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) conocidas como NIC 2 y 3; las cuales tienen cambios de espesor tercio medio a completo, con células indiferenciadas no estratificadas, Pleomorfismo nucleares, y figuras de mitosis anormales. Ver Fig. 13.

La estrategia más habitual tras la detección citológica de LEIAG es realizarla biopsia del cérvix bajo visión del colposcopio, lo que orienta el sitio más significativo para realizar la biopsia. Posteriormente se realizan cortes en parafina y se tiñen para ser observados al microscopio.

Es el modo de diagnóstico habitual, pero al observar al microscopio las biopsias o conos cervicales hay algunas dificultades en la interpretación en metaplasia escamosa inmadura, cambios atróficos graves, cambios reactivos y adelgazamiento del epitelio y artefactos postraumático.

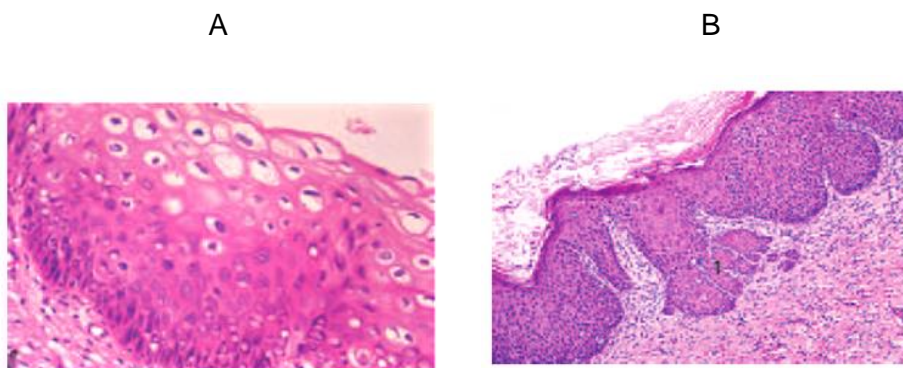


Figura 13. Lesiones escamosas intraepitelial de bajo y alto grado en biopsias del cérvix

Los cortes histológicos fueron teñidos con Hematoxilina Eosina A.LEIBG, efecto de coilocitosis, afectado el tercio inferior del espesor del epitelio, con núcleos irregulares y B. LEIAG Pleomorfismo y pérdida de la polaridad en todo el espesor del epitelio. Fuente: Pathology of neoplastic squamous lesions, RajiGanesan and Terence P. Rollason, .2009

En un estudio realizado con un panel de 4 patólogos de diferentes hospitales de Estados Unidos y Canadá se investigó la correlación de los resultados de muestras de histología con diferentes lesiones precursoras del cáncer cervical de NIC 1, NIC 2 y NIC 3 con tinción de hematoxilina eosina. Utilizando el análisis estadístico de concordancia de Kappa ( $K$ ) no ponderado comparando entre parejas de patólogos diagnósticos dicotomizados como NIC positivo versus NIC negativo (incluyendo normal, insatisfactorio y metaplasia) o NIC 2/3 positivo versus NIC 2/3 negativo (incluyendo normal, insatisfactorio, metaplasia y NIC 1), la concordancia interobservador para cada panelista fue  $K = 0.756$  a  $0.865$  (57).

La concordancia entre los diagnósticos de citología e histología (biopsia dirigida por colposcopia del cérvix) es satisfactoria y se sitúa en un 82%; la citología subestima lesiones en el 2.3% y sobreestima la enfermedad cervical en el 16.1%. (58)

#### 1.3.4. Pruebas de ADN del VPH

Como hemos descrito en el apartado correspondiente, la persistencia de los virus del papiloma humano de alto riesgo VPH AR son la causa del cáncer del cérvix, especialmente los tipos 16 y 18 que están involucrados en el 70% de los casos(59). Por ello, la Sociedad Americana del Cáncer, la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical y la Sociedad Americana de Patología Clínica recomiendan el uso de la prueba del ADN del VPH AR en pacientes entre 30 y 65 años cada 5 años. (60)

Las pruebas de ADN del VPH AR han sido desarrolladas para aumentar la sensibilidad en la búsqueda de pacientes con lesiones cervicales. Las pruebas desarrolladas hasta ahora para ello son: Captura híbrida 2 (HC 2), Linnear Array, Cobas, Seeplex HPV4A, Aptima HPV, Pre Tect HPV Proofer, Real Time Abbott, y PCR Amplikor.

La HC2 está aprobada por la FDA (Food And Drug Administration) desarrollada por Quiagen, cuyo principio es amplificar hibridación y por lumniscencia detecta la presencia de VPH AR y de bajo riesgo; sin embargo no genotipifica ni distingue la coinfección múltiple.

En 2011 Cobas fue también aprobado por la FDA; La prueba del VPH Cobas 4800 realiza la extracción de ADN, amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) y detecta en tiempo real de una manera automatizada. Se puede distinguir rápidamente VPH16/18 de otros 12 tipos VPH AR. El Seeplex HPV4A es un multiplex PCR automatizado al igual que Cobas .(61)

El Gen-Probe Aptima HPV se basa en la captura y amplificación mediada por transcripción, y la protección de la hibridación para la detección de la expresión del ARNm del gen viral E7 de 14 tipos de VPH AR.

El ensayo PreTect VPH Proofer (Norchip) se realizó por TDL. Es un PCR multiplex de amplificación basada en la secuencia en tiempo real del gen viral E6/E7RNAm expresadas por cinco tipos de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, y 45) utilizando conjuntos de cebadores específicos.

El Real Time Abbott HPVHR assay (Abbott) es una prueba de PCR multiplex de tipo cualitativo en tiempo real, que también identifica específicamente el VPH 16 y VPH18, mientras que al mismo tiempo permite detectar el resto de los tipos de VPH AR :31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. (62)

La prueba de tiempo real y cuantificación por PCRq, implica la preparación automatizada de muestras y extracción de ADN combinado con PCR en tiempo real. Esta tecnología detecta y cuantifica 17 diferentes tipos de VPH, incluyendo los tipos de que se consideran tipos de alto riesgo en HC 2, y los de bajo riesgo, es decir tipos 6/11, 16,18,31,33,35, 39,45,51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67 y 68, descrito por Micalessi et. al.(63)

Como se observa en la tabla 2 diversos grupos de investigación determinaron la sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos de detección del VPH según resultado de citología y biopsia. Los dos métodos con mejor sensibilidad y especificidad son captura híbrida de segunda generación y Cobas. Las pruebas de HPV presentaron mayor sensibilidad y especificidad en los casos de pacientes con resultados de citología y biopsias con lesiones NIC 2 y 3 o LEIAG.

Tabla 2. Estudios comparativos entre métodos de detección de virus del papiloma humano de alto riesgo según grupos de investigación.

Grupo de investigación	Nº de muestras	Citología/ Biopsia	Método de detección VPH AR	Sensibilidad %	Especificidad %
Szarewski A. et al.(62)	583	NIC2(359) + NIC3(224)	HC 2	96.3	19.3
			Cobas	95.2	24.0
			PreTect HPV Proofer	74.1	70.8
			AptimaHPV Gene Probe	95.3	28.8
			Abbott Real Time BD HPV	93.3 95.0	27.3 24.2
Luu H. et al. (64) Meta análisis	22,417	ASCUS/LEIBG	PCR-Amplicor HC2	70 51	45 56
			PCR- Amplicor HC 2	85 89	62 73
		LEIAG	HC2	88.9	67.9
			Cobas 4800 Seeplex HPV4A	83.4 71.9	76.4 74.5
Comar M. et al.(65)	94	ASCUS	HC2 Linnear Array	36 29	30 24
Depuydt C. et al.(63)	93	NIC2,3(87) Adenocarcinoma(5) Escamoso invasivo(1)	qPCR	93.6	86.5
			HC2	83.9	94.5
Phillips S. et al. (66)	407	ASCUS	Cobas	90.5	-----
			HC2	80.8	-----
			Linnear Array	91.7	-----
			Amplicor	92.7	-----

La Prueba de genotipado del VPH Linear Array. Diseñada por (Roche Diagnostics) utiliza cebadores biotinizados para detectar una secuencia de nucleótidos dentro de la región L1polimórfica del genoma de VPH que es de aproximadamente 450 pb longitud , contiene grupos de cebadores específicos para los genotipos siguientes: 6, 11, 16, 26, 18,31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 70, 73 y 82. Se efectúa manualmente e interpreta cualitativamente.(65)

### 1.3.5. Inmunotinción de P16 y Ki67 en citología cervical

La inmunohistoquímica fue desarrollada desde 1930; actualmente se ha utilizado anticuerpos contra biomoléculas específicas, y en el caso del cáncer de cérvix frente a dos proteínas especialmente presentes en células que están transformadas, las denominadas P16 y Ki67. La P16 asociada a inhibidor de ciclinas dependientes de la cinasas y la Ki67 asociada a la replicación del ADN.(67)

En algunos casos, el control que regula la multiplicación celular se altera, empiezan a crecer y a dividirse sin control, aunque el organismo no necesite de ellas. Cuando las células descendientes de dicha célula a su vez se multiplican sin responder a regulación, el resultado es un clon de células que puede alcanzar un tamaño considerable. Esta masa de células es llamada tumor y está formada por un clon no deseado. Algunos tumores tienen efectos devastadores en los animales, ya que según la severidad de estos producen metástasis a diferentes órganos.

En los puntos de control en el ciclo celular, uno de ellos está en la transición de la etapa G1a la S. Y ya hemos visto que hay una proteína del Retinoblastoma (Rb) que interviene en esta transición. A su vez existe otra proteína denominada P16 que inhibe la quinasa dependiente de la ciclina p16INK4a y que desempeña un papel fundamental en el control mediado por la proteína del retinoblastoma.(68)

En condiciones normales, la pRb se une al factor de transcripción E2F. Esto produce el efecto de bloquear la transcripción de los genes que estimulan la progresión del ciclo celular y su proliferación, pero también, la codificación del gen para el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, p16INK4a. De esta manera, en condiciones normales, la

unión del factor de transcripción E2F por el pRb es uno de los mecanismos de control fundamentales para prevenir la replicación y proliferación continuas de las células.(69)

Cuando el E2F se separa del pRb, el efecto bloqueante en la transcripción del gen p16INK4a se pierde, lo que provoca la producción de la proteína funcional p16INK4a dentro de la célula. A cambio, ahora la proteína p16INK4a, que se origina a partir del "inhibidor de la quinasa 4" inhibe a su vez la actividad fosforilante de cdk4/6, complejo de ciclina D. Por lo tanto, cambia el balance del pRb fosforilado (inactivo; incapaz de unirse a E2F) de nuevo a un pRb no fosforilado (funcional; capaz de unirse a E2F). Este complejo control de retroalimentación representa uno de los mecanismos clave sobre cómo las células establecen de manera efectiva el equilibrio correcto entre la progresión/proliferación de la célula y la detención del ciclo celular.

Al cabo de cierto tiempo, la infección crónica por virus de papiloma humano VPH oncogénico puede dar lugar a un trastorno del complejo proteínico funcional pRb-E2F.

Una de las proteínas expresadas por el virus dentro de la célula es la proteína oncogénica E7. La actividad oncogénica primordial de E7 es inhibir la función de la proteína pRb. De esta manera, el pRb evita unirse al factor de transcripción E2F, lo que produce la transcripción de los genes que promueven la proliferación de la célula. Sólo en las infecciones de VPH en las que han comenzado procesos de transformación oncogénica, los niveles de la proteína E7 (oncoproteína del VPH) se suelen elevar en las células competentes para proliferarse. Por esta razón, p16INK4a es un elemento de predicción más preciso para el cáncer cervical que la presencia de VPH- oncogénico.(70) Para comprender lo anterior ver fig. 14.

El gen p16 es un supresor tumoral que se encuentra en el cromosoma 9, y la proteína P16 es una molécula antitumoral; ya que controla el ciclo celular inhibiendo a la Ciclina CDK4, su

actividad Cinasa, y no permite que la célula replique el ADN. En los casos de células transformadas por infección del VPHAR como hemos visto esta molécula se encuentra sobre expresada tanto en el citosol como en el núcleo celular y se ha observado una fuerte sobre expresión nuclear y citoplasmática de la proteína p16 en ciertas entidades cancerosas entre ellas en el carcinoma o cáncer de cérvix.(71)

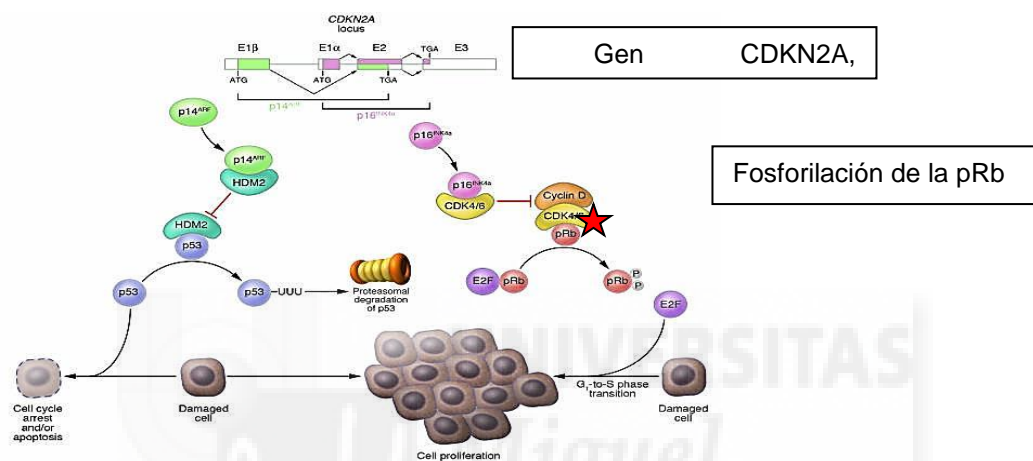


Figura 14. Proteína P16 su síntesis y participación en células transformadas.

Muestra el gen CDKN2A, ubicado en el cromosoma 9, a la transcripción y traducción produce la proteína 16 (P16). Al estar expresado fosforila la proteína del retinoblastoma (pRb) y esta a su vez controla el ciclo celular; sin embargo este control está alterado cuando la célula está infectada y alterada por los VPH de alto riesgo alterando la mitosis y produciendo células con capacidad neoplásica. Fuente: Journal Clinical Investigation 2005 vol. 115.

La identificación de la proteína P16 es utilizada para detectar células transformadas, por los VPH de Alto Riesgo en los casos de lesiones escamosas y glandulares del cérvix, siendo una prueba sensible y específica que se ha aplicado tanto en citología como en histología.(72)

Así mismo la proteína Ki67 es un marcador de proliferación a nivel nuclear y nucleolar, especialmente en tejidos con displasia. (73) La Proteína Ki67 está expresada en el núcleo



de las células transformadas del cérvix, y se ha identificado en las células cuando están afectadas por el virus del papiloma humano de alto riesgo. Se ha observado que su identificación ofrece una sensibilidad y especificidad de 95 y 85% respectivamente.(20)

La importancia de detectar las lesiones preinvasivas del cérvix que potencialmente tienen riesgo de convertirse en cáncer es prioritario; en un estudio realizado en hospital Clinic de Barcelona incluyeron 1123 pacientes referidas a colposcopia, a quienes se aplicó la prueba de doble tinción P16 y Ki67 en exfoliados del cérvix con Thinprep, determinando la sensibilidad y especificidad de 90.9% y 72.1% respectivamente para LEIAG y cáncer invasivo.(74)

Hay otros métodos utilizados en el tamizaje tales como captura híbrida y pruebas de detección del ADN del VPH, pero estas identifican la presencia del VPH de alto o bajo riesgo sin evidenciar si las células están transformadas, lo que sí puede detectar la doble tinción P16 y Ki67. De este modo se obtiene una mayor especificidad en las lesiones preinvasivas del cérvix que las pruebas de detección del ADN del VPH.(75)

En un estudio realizado por Brigas et. al., se evaluó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo de la citología cervical y comparó con la prueba de ADN VPH, en lesión intraepitelial de alto grado, siendo los resultados una sensibilidad del 64% y 97% para citología y prueba de ADN VPH respectivamente, una especificidad del 89.1% y 92.4% para citología y prueba de ADN VPH respectivamente y por último un valor predictivo negativo del 99.75 y 99.98% para citología y prueba de VPH respectivamente.(76)

En otro estudio, realizado por Doná et al., se evaluó la correlación de la doble tinción p16 y ki67 en citología con respecto a histología y a la prueba de VPH ADN y se observó una asociación estrecha entre la doble tinción con respecto a la prueba de VPH ADN y así

cómo respecto al resultado de la biopsia, especialmente en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado con un OR de 9.92 y 10.86 respectivamente. (77)

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad del tinción doble P16/Ki67, de algunos estudios, según Interpretación citomorfológica de lesión escamosa intraepitelial y cáncer.

Grupo de investigadores, año	muestra	Tipo de citología cervical	Sensibilidad %	Especificidad %	P de significancia
Ordi J. et. al 2014(78)	1123	Base Líquida	78.0 < 30 años 86.5. > 30 años	91.0 < 30 años 94.8 > 30 años	No indica p
Ikemberg H, et al. 2013(79)	25,577	Base Líquida	86.7 (no clasifica grupos etarios)	95.2(no clasifica grupos etarios)	P<0.001
Wentzensen N, et al. 2012(80)	625	Base Líquida	93.2 < 30 años y 97.2 > 30 años	46.1 < 30 años y 60 >30 años	P< 0.00001
UrlichPetry, et al.2011.(8)	450	Base Líquida	91 a 96,4 > 30 años	76.9 a 82.1 >30 años	No indica p
Bao H. et al. 2011(81)	79	Base Líquida	95.12 (no clasifica grupos etarios)	73.68 (no clasifica grupos etarios)	P< 0.05

Tras revisar los distintos estudios de la doble Tinción P16 y Ki67 en citología, no se encuentra ninguno realizado en frotis cervicales solamente en base líquida; y se puede apreciar en la Tabla N°3 que la sensibilidad y especificidad está aumentada en pacientes mayores de 30 años, pues el promedio de las sensibilidad en menores de 30 años fue de 85.6% y de especificidad es de 68.55%, y en los grupos mayores de 30 años la sensibilidad fue de 93.43% y la especificidad es 78.96%. Dos grupos de investigadores no clasificaron por edades y encontraron un promedio de sensibilidad de 90.91% y de especificidad de 84.44%.

Por otro lado, el uso de inmunotinción de P16 en tejidos ha obtenido mejor sensibilidad y especificidad con respecto a otros marcadores como por ejemplo Ki67.(82),(83). Dijkstra et al. determinaron que la interpretación de biopsias del cérvix primero con tinción con hematoxilina y eosina H&E y después con inmunohistoquímica P16 permitió reclasificar el grado de lesión en un 21% de las muestras, incluyendo muestras diagnosticadas como

<CIN1 y se reclasificaron a >CIN2-3; así como aumentó la concordancia entre patólogos en un 0.80 contra 0.44 con respecto a H&E. Esta prueba es sensible tanto a lesiones escamosas como glandulares.(84),(85)

Todo sugiere que la inmunohistoquímica, junto con las investigaciones moleculares, jugará un papel cada vez más importante en el campo de diagnóstico patología cervical. También se espera que estos métodos sean considerados como factor pronóstico para predicción en diversas neoplasias de cuello uterino.(86)

### 1.3.6. Inmunotinción de P16 en histología cervical

En los últimos años, la inmunohistoquímica ha tenido un gran impacto en el campo de la patología cervical, como en otras áreas de diagnóstico de la patología ginecológica.

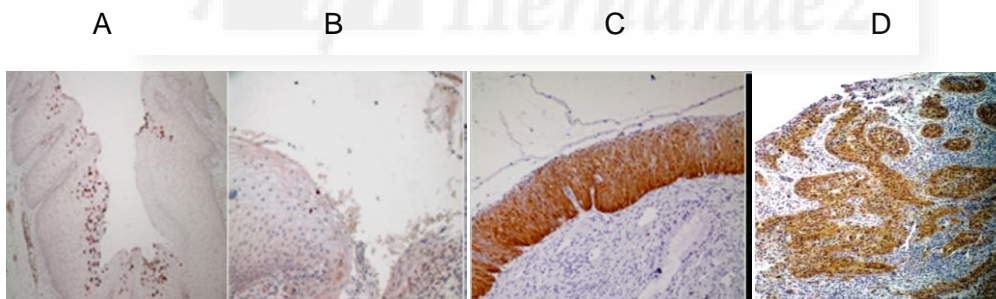
La Inmunohistoquímica siempre se debe utilizar como complemento del examen morfológico y los resultados no deben ser interpretados en forma aislada. En general, especialmente cuando se trata con los tumores malignos. Ningún marcador es totalmente específico o sensible para cualquier lesión determinada, y es probable que en los próximos años la inmunohistoquímica, junto con las investigaciones moleculares, jugará un papel cada vez más importante en el campo de diagnóstico patología cervical.

Ya comentamos que la detección de lesiones precursoras del cáncer cervical es importante debido a su tasa de progresión y a que su tratamiento destructivo local evita la progresión y previene el cáncer de cérvix. Diferentes marcadores moleculares se han investigado, especialmente aquellos que se relacionan con el descontrol del ciclo celular y la transformación de células con elevada proliferación. Los más estudiados son: P16, Ki67, CK13, CK14, FIHIT, MIB-1, Telomerasa, ProEx C, MCM5 - CDC6 y Ciclina E.(87)

El tipo de lesión histopatológica y su ubicación son a veces difíciles de detectar a partir de inmunohistoquímica, pero se han utilizado para lesiones escamosas de preferencia P16, para lesiones glandulares MIB-1 y P16, para lesiones mesonéfricos es útil CD10, para adenocarcinoma mucinoso HIK1083 y para diferenciar adenocarcinoma endometrial del endocervical es útil utilizar el ER para detectar adenocarcinoma endometrial y CEA para endocervical.(86)

La prueba de inmunohistoquímica P16INK4a en cortes de biopsias tiñe las células afectadas por el VPH de alto riesgo, siendo más evidente cuando las lesiones son de alto grado o de cáncer invasivo. Ver fig. 15.

En el estudio de Dijkstra et. al. en 2010 se midió el índice de concordancia ponderado para interpretar biopsias del cérvix con tinción por inmunohistoquímica P16, el cual fue de 0.80 con IC 95% 0.66 a 0.89; y refiere que en estudios de evaluación de concordancia interobservador en muestras con H&E tienen el índice Kappa ponderado de 0.44 a 0.66 .(84)



*Figura 15.* Muestras histológicas del cérvix con tinción P16INK4a.

Representando los diferentes tipos de lesiones del cérvix y la expresión de la proteína p16, en la imagen A y B muestran lesión de bajo grado; en la imagen C Lesión de alto grado y en D lesión de cáncer invasiva del cérvix. Tinción marrón en los tejidos con lesión escamosa intraepitelial, especialmente LEIAG y cáncer invasivo. Fuente: Dijkstra 2010.

En otro estudio, Bergeron C et. al. en 2010, revisaron muestras histológicas en biopsias y conos cervicales con tinción de H&E y con P16. Doce distintos patólogos revisaron las muestras, y se observó que los índices de concordancia y el promedio de índice Kappa ponderado fueron para tinción H&E de 0.749;  $P = 0.001$  y para tinción P16 fue 0.899;  $P < 0.001$ . La concordancia pues fue muy alta y además se incrementó la sensibilidad para detectar lesiones de alto grado (CIN 2 y 3) en un 13%. (88)

#### 1.4. Tratamiento de lesiones preinvasivas del cérvix

Las lesiones de displasia leve o conocidas como lesión intraepitelial de bajo grado (NIC 1) se estima que progresan hasta displasia severa en sólo un 1% por año, mientras que de las lesiones moderadas (NIC 2) a la displasia severa (NIC 3) esta estimación sube hasta un 16% en 2 años y un 25% en 5 años. No obstante, la detección temprana y tratamiento del VPH en las lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión hasta cáncer. (45)

Índices de curación muy altos con mínima morbilidad en lesiones preinvasivas del cérvix fueron reportados al utilizar criocirugía, electrocauterio con asa diatérmica y láser CO<sub>2</sub>. Y en todos los servicios clínicos de ginecología se han tratado las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado con conización cervical preservando la anatomía y función del cérvix. En 1965 Anderson demostró que la conización terapéutica ofrece protección contra el cáncer cervical como alternativa a histerectomía. (89)

En 1990 el uso del asa electroquirúrgica conocida como LEEP por sus siglas en inglés Loop Electrosurgical Excision Procedure ganó popularidad. El procedimiento consta de la remoción de la zona de transformación similar al de conización con bisturí.

La conización cervical con asa electroquirúrgica conocida por sus siglas en inglés LEEP ha sido aceptado su utilidad en el tratamiento y diagnóstico final de lesiones intraepiteliales de

alto grado cervicales. La conización diagnóstica es precisa cuando: hay sospecha de lesión en el canal endocervical, discrepancia o no correlación entre resultado de citología e histología, o sospecha de lesión microinvasiva del cérvix.(90)

La conización con asa de diatermia conocida en Europa como LLETZ (*large Loop excision transformation zone*) y en los Estados Unidos como LEEP, fue creada por Cartier y sus colaboradores en 1984 y fue descrito su empleo en 1989 por Prendiville.(91)

#### 1.4.1. Conización del cérvix

El manejo de las pacientes con lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado detectado en biopsia final, dependerá de la decisión de la paciente del deseo de tener más hijos, siendo las dos alternativas conización cervical o histerectomía. Sin embargo existen casos en los que hay disociación de citología e histología de biopsia por colposcopia; denominándose disociación de dos niveles por ejemplo resultado de citología LEIAG y resultados de biopsia normal o LEIBG, en la literatura refieren que existe un 11 a 16% de casos con este tipo de discrepancia. Para lo cual es necesario realizar conización diagnóstica.(49)

La conización con asa diatérmica tiene varias ventajas: menos costo, fácil técnica y buen éxito en la resolución de los casos tratados por lesiones preinvasivas; especialmente en el ectocérvix.(92)

La conización realizada con asa diatérmica parece ser una alternativa aceptable a la conización con bisturí, en mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y colposcopia insatisfactoria. Hay una tendencia a tener recurrencia en los casos con lesiones escamosas intraepiteliales después de realizarla (16.4%) en comparación con conización con bisturí (12.4%). Pero según datos de estudios anteriores, la conización con bisturí se asoció más

con trabajo de parto prematuro. Y la conización tipo LLETZ tuvo menos costo y complicaciones de hemorragia.(93),(94)

La conización con asa diatérmica tiene un riesgo de sangrado del 7%. En comparación con las otras técnicas de conización como las realizadas con bisturí en frío, laser y CO<sub>2</sub> no hay diferencias significativas. Así mismo las otras complicaciones asociadas con la conización cervical como infección, estenosis cervical no presentan diferencias entre los tipos de conización mencionados; aunque se reporta que a la inspección histológica del canal endocervical los bordes quirúrgicos no preservan la estructura debido a la quemadura ocasionada por la electrocirugía.(95)

En un estudio realizado en la Universidad de Oklahoma se determinó que el 29% de los casos hubo disociación entre citología y resultado final de histología del cono. Determinaron que algunos de los errores en estos casos puede ser que la enfermedad está en el canal endocervical o a la toma de biopsia que no se realizó en el sitio representativo.(96)

La conización es especialmente diagnóstica cuando: hay sospecha de lesión en el canal endocervical, discrepancia o no correlación entre resultado de citología e histología, Sospecha de lesión microinvasiva del cérvix.(90) La conización tipo LLETZ tiene un rango más alto de escisión incompleta de las lesiones cervicales 37% con respecto a la conización con bisturí el cual es 28.9%.(97) Hay una tendencia a tener recurrencia en los casos con lesiones escamosas intraepiteliales después de realizar LLETZ (16.4%) en comparación con conización con bisturí (12.4%) pero es pequeña.(98)

El cono tipo terapéutico tiene un éxito para lesiones escamosas de alto grado entre 65 a 90% utilizando LEEP, especialmente si se incluye canal endocervical.(99)

En los casos de adenocarcinoma In situ diagnosticado por biopsia ó por escisión, es preferible realizar conización en frío con bisturí cuando se desea preservar el útero o previo a histerectomía. Esto se debe a que es necesario determinar si los bordes están libres, especialmente en el canal endocervical.(10)

#### 1.5. Justificación del estudio.

En nuestro medio, el Instituto Nacional de Cancerología INCAN, se ha estudiado la sensibilidad de la citología de extendidos cervicales para la detección de LEIAG o cáncer invasivo y es de 65% y la especificidad de 50%. Hasta ahora solamente se ha utilizado citología convencional, es decir extendidos cervicales, por razones de costos como prueba de tamizaje; al momento del estudio no hay política de salud del uso de la prueba de ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus del papiloma humano (VPH).

Esto refleja una clara necesidad de mejorar el rendimiento de nuestra prueba de cribado para obtener menos falsos positivos y negativos con sus repercusiones (ansiedad e intervenciones y gastos innecesarios lo primero, y retrasos en el diagnóstico para lo segundo).

Dado que el uso de marcadores por inmunohistoquímica (IQ) ha demostrado que mejora la sensibilidad, especificidad y el acuerdo o concordancia interobservador para detectar lesiones igual o mayores a LEIAG en citologías e histologías, parece una vía para mejorar nuestros resultados.

En estudios previos se ha demostrado la utilidad de marcadores inmunohistoquímicos, y entre ellos están: 1) Proteína P16 que se expresa al estar la célula cervical infectada por los VPH de alto riesgo (VPH AR) alterando su ciclo y 2) La Proteína Ki67 marcador de proliferación celular en células cuyo ciclo celular está incontrolado.(67)



En la bibliografía consultada, al momento de iniciar la investigación, no se encuentra resultados del uso de la doble tinción de P16 y Ki67 en extendidos cervicales, sólo en base líquida, por lo que el presente estudio pretende investigar si los resultados son equivalentes en los extendidos cervicales.

La búsqueda de pruebas diagnósticas, menos invasivas y más precisas para la detección de lesiones del cérvix permitirá disminuir los casos de falta de correlación o discrepancia, entre la citología convencional, impresión colposcópica e histología. Quizás reducirá los costes, y desde luego mejorará la calidad de la atención a nuestras pacientes.

Por tanto, surgen las siguientes preguntas cuya respuesta nuestro estudio pretenderá esclarecer:

- 1) ¿Podrá La prueba de doble tinción P16 y Ki67 en citología de frotis cervicales ser más sensible y específica para detectar lesiones mayor o igual a LEIAG del cérvix que la citología convencional?
- 2) ¿La reproducibilidad interobservador al interpretar las citologías con doble tinción P16 y Ki67 en frotis cervicales será buena?
- 3) ¿La reproducibilidad interobservador al interpretar las histologías con tinción P16 será buena?
- 4) ¿Será mayor la sensibilidad y especificidad de la doble tinción P16 y Ki67 en frotis cervicales de pacientes mayores que en las menores de 30 años?
- 5) Y sobre todo, ¿Habrá mayor correlación citología-colposcopia-histología con la doble tinción P16 y Ki67 en citología cervical respecto a la citología convencional?

## 2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

### 2.1. Hipótesis

La sensibilidad y especificidad de la citología en frotis cervicales con doble tinción P16 y Ki67 es mayor que la citología con tinción convencional para la detección de las lesiones preinvasivas de cérvix, y tiene mejor correlación cito-colpo-histopatológica.

### 2.2. Objetivos del estudio

#### 2.2.1. Objetivo principal:

Evaluar clínicamente la validez y reproducibilidad al interpretarlas citologías con doble tinción P16 y Ki67 en frotis cervicales y su correlación con los hallazgos colposcópico e histomorfológicos con tinción P16 en los diferentes tipos de lesiones cervicales de pacientes remitidas para colposcopia al Instituto Nacional de Cancerología de Guatemala por detección de alteraciones citológicas en otro centro.

#### 2.2.2. Objetivos secundarios

1. Medir la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de las inmunotinciones según los diferentes hallazgos citomorfológicos e histomorfológicos.
2. Evaluar si la sensibilidad y especificidad de la doble tinción en frotis cervicales diferente según la edad de la mujer (menores y mayores de 30 años).
3. Medir la concordancia interobservador entre patólogos de Guatemala y España al interpretar citomorfolología e histomorfolología utilizando tinción P16 y Ki67.

4. Evaluar la correlación entre la citología con doble tinción P16 y Ki67, los resultados de histología teñida con P16 e impresión colposcópica.

### 2.3. Plan de trabajo

El lugar de recolección de muestras fue en Instituto Nacional de Cancerología INCAN de Guatemala, en la unidad de colposcopia. Se obtuvo muestras de frotis y biopsias o conos cervicales de 210 pacientes. Previamente fue aprobada la investigación y se autorizó la colaboración de los laboratorios del INCAN, Centro de Investigaciones Biomédicas USAC y Hospital Clinic de Barcelona. Ver las cartas de colaboración anexo 1 página 114.

Las muestras se enviaron al laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala USAC. Fueron procesadas entre los años 2013 y 2014. Un técnico en patología y citología con experiencia en inmunotinción realizó los procesamientos de las muestras.

A las muestras de frotis de exfoliados cervicales se les procesó con inmunotinción p16 y Ki67 y a las biopsias y o conos cervicales con inmunotinción p16; en grupos de 10 a 15.

Las muestras procesadas fueron enviadas a los laboratorios de cada uno de los 3 patólogos en grupos de 25 a 50 con sus respectivas hojas de informes ver anexos 2 y 3 en páginas 118 y 119. En el caso del patólogo de España fueron entregadas personalmente en tres ocasiones y dos veces enviadas por correo aéreo.

En consenso de los tres patólogos fueron sacados del estudio 20 casos, debido a que la calidad de muestras fue deficiente ya sea en citología o en histología. En total fueron 190 muestras de citologías y 190 biopsias cervicales que entraron al estudio; de estos, a 45 casos se les efectuó conización cervical. Ver

Figura 16.

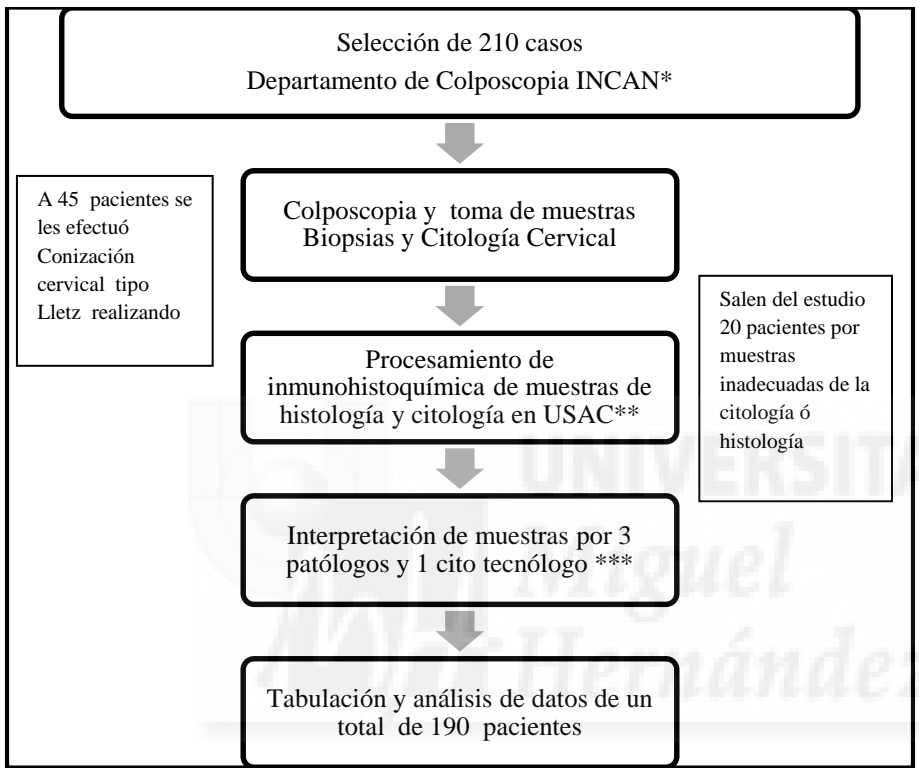


Figura 16. Flujograma de las actividades realizadas en la investigación\*INCAN Instituto Nacional de Cancerología, \*\* USAC Universidad de San Carlos de Guatemala, laboratorio de patología molecular\*\*\* patólogos, dos de Guatemala y uno de España y un cito tecnólogo de Guatemala.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Tipo de estudio, lugar donde se realizó y muestra

El presente estudio es descriptivo y analítico transversal. Realizado durante 2 años, 2013 y 2014; fue aceptado por el Instituto Nacional de Cancerología INCAN de Guatemala.

Consultaron 865 pacientes a la unidad de colposcopia, de las cuales 210 fueron referidas por citología convencional con resultado anormal, desde células escamosas con atipia de significado no determinado por sus siglas en inglés ASCUS, células glandulares de significado no determinado por sus siglas en inglés AGUS por sus siglas en inglés atipia escamosa de alta sospecha ASCH, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIBG. Lesión escamosa intraepitelial de alto grado LEIAG y cáncer invasivo.

#### 3.2. Los criterios de inclusión

Los criterios considerados de inclusión fueron:

- Paciente que consulta a colposcopia con resultado de citología convencional reciente (no más de 3 meses) con resultado de: ASCUS, AGUS, ASCH, LEIBG (Coilocitosis), LEIAG o cáncer invasivo del cérvix.

#### 3.3. Los criterios de exclusión

Los criterios considerados de exclusión fueron:

- Pacientes embarazadas,
- Pacientes que ya hayan recibido tratamiento de radioterapia o cirugía de conización y/o histerectomía,

- Muestras obtenidas de mala calidad o insuficiente para diagnóstico. Ver Figura 16

### 3.4. Variables

Cualitativas Ordinales:

- 1) Resultados citologías cervicales: ASCUS, AGUS, ASC-H, LEIBG (Condiloma), LEIAG, cáncer invasivo epidermoide o adenocarcinoma.
- 2) Impresión colposcópica: Negativa, Poco significativa, Significativa y Muy Significativa
- 3) Resultados por histología en biopsia o cono cervical: Normal o cervicitis, LEIBG (CIN o Condiloma), LEIAG, cáncer invasivo epidermoide, cáncer invasivo adenocarcinoma o mixto.

En la tabla N° 4 se indica, según objetivos, la definición de las variables, definición operacional y escala en unidad medible.

Tabla 4. Objetivo y sus variables, definición, definición operacional escala de medición unidad de medida.

OBJETIVOS	VARIABLE	Definición	Definición Operativa	Escala de medición/Unidad de Medida
<p>Evaluar la correlación Clínica entre los resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67, impresión Colposcópica y los resultados de Histología; según los diferentes tipos de lesiones cervicales ( LEIBG, LEIAG y Carcinoma invasivo), en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología durante los años 2012 y 2013.</p>	<p><b>Resultado</b> Citología con doble Tinción P16 y Ki67</p>	<p>Exfoliado del cérvix teñidos por medio de la técnica de Inmunohistoquímica con dos biomarcadores P16 y Ki67. Los cuales detectan células cervicales transformadas ó neoplásicas</p>	<p>Toma de exfoliado del cérvix por medio de espátula de Ayre para exocervix y cepillo para endocervix. Dicho frote se coloca en laminita acetilada y es fijada con CitoFix. Se preserva a temperatura ambiente y posteriormente se procede a realizar la Inmunohistoquímica con reactivos test Dual siguiendo las recomendaciones del fabricante. Serán examinadas a través de un microscopio de luz con aumentos de 10 y 45 X. Interpretado el estudio por Médico s patólogos. Deberá marcar en la boleta la opción ó resultado que considere correcta</p>	<p><b>ORDINAL (Politémico)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Negativo ó cambios inflamatorios</li> <li>2. ASCUS ó AGUS</li> <li>3. NIC 1 ó Condiloma- LEIBG</li> <li>4. NIC 2 ó NIC 3- LEIAG</li> <li>5. Cáncer Invasivo epidermoide, adenocarcinoma ó mixto.</li> </ol>
	<p><b>Impresión</b> colposcópica</p>	<p>Observación del cérvix a través de un colposcopio; que aumenta ó amplifica la imagen del cérvix pudiendo evidenciar y detectar hallazgos que orienten al especialista a sospechar lesiones preinvasivas e invasivas del cérvix</p>	<p>La impresión colposcópica se establece según los signos ó hallazgos observados a través del colposcopio por El médico especialista. Se coloca previamente espéculo vaginal, ácido acético al 5%. Según su apreciación <b>Negativa</b> cuando no hay neoplasia <b>Poco significativa</b> cuando sospecha de NIC 1, Condiloma ó LEIBG.</p>	<p><b>ORDINAL</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Negativo</b> (Normal ó cervicitis)</li> <li>2. <b>Poco Significativo</b>(NIC 1,condiloma ó LEIBG</li> <li>3. <b>Significativo</b> (NIC 2,3 ó LEIAG)</li> <li>4. <b>Muy significativo</b> (cáncer</li> </ol>

### 3.5.1 Captación de casos, muestras clínicas y colposcopia con biopsia cervical

Por cada paciente se obtuvieron diferentes muestras: una para citología, otra para histología que incluyó biopsia cervical y en algunos casos tejido de conización cervical. En total fueron 190 casos.

El grupo de médicos colaboradores de la unidad de colposcopia recibió la información acerca de la manera en que se obtienen las muestras de citología y biopsia del cérvix; a cada uno se le entregó una hoja de instrucciones tal como se observa en el Anexo 4 página 120.

En la primera consulta, las pacientes leyeron o se les leyó el consentimiento informado y al estar de acuerdo firmaron o colocaron su huella en el mismo, para poder participar en el estudio. Ver anexos 5 y 6, páginas 121 y 124 respectivamente.

Posteriormente a la firma del consentimiento informado se procedió a:

- 1) Obtener muestra de exfoliado cervical y endocervical con paletas plásticas de Ayre y cepillos de citobrush, colocando el frote en laminillas con carga y preservado con alcohol buferado

- 2) Observar el cérvix, por medio de colposcopio marca leisegang modelo optik1-02, previamente se preparó el cérvix con ácido acético al 5%; documentando los hallazgos, capturando las imágenes y completando la ficha institucional de colposcopia, en la cual se colocan los hallazgos observados, número de biopsias obtenidas e impresión colposcópica. Ver anexo 7 página 125.

- 3) Obtención de muestras de cérvix por medio de pinza de biopsia Kevorkian y a los casos que no se observó zona de transformación se realizó curetaje con legra endocervical.



### 3.5.2. Procesamiento de muestras: inmunotinción de citologías e histologías.

El procesamiento de muestras tanto citológicas como histológicas se efectuó en el laboratorio de patología molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Para las citologías se utilizó la doble tinción o el Test Dual CINtec plus P16 Ki67 siguiendo las instrucciones del fabricante (Laboratorios mtm Roche de Alemania); posteriormente se tiñen con fondo de hematoxilina eosina con base acuosa.

Para las biopsias y conos cervicales, se realizan cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor para la inmunotinción de la P16, utilizando el sistema En Vision (Dako) p16INK4a se detectó utilizando el kit CINtec histología (clon E6H4, mtm Laboratories, Heidelberg, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes histológicos tanto para la Inmunotinción de P16 y para la tinción de hematoxilina eosina, fueron obtenidos del mismo bloque de parafina. Ver anexo 8 página 126.

### 3.5.3. Interpretación de las muestras de citología e histología.

Cada citología fue evaluada previamente por un citotecnólogo con más de 15 años de experiencia, dictaminando la calidad del frote. Posteriormente cada uno de los tres patólogos independientes dictaminaron los hallazgos citomorfológicos, así como si el test de doble tinción era positivo o no, al observar en la misma célula núcleo de color rojo y citoplasma color marrón.

En el caso de las muestras de histología con tinción de P16 positiva se debe teñir el tejido color marrón difusamente. Cada hoja del informe fue identificada con un código correspondiente a las muestras de las pacientes sin orientación del diagnóstico previo y cada patólogo y cito tecnólogo participante llenó dichas hojas de modo independiente y

ciego a lo informado por los demás. Cada evaluador recibió un atlas de imágenes proporcionada por los fabricantes de los reactivos de inmunotinción para uniformizar la formación previa en la interpretación del test.

Se diseñaron 2 hojas para la recogida de la interpretación de la citología y de la histología acordes con el sistema Bethesda del año 2001. Ver anexos 2 y 3 páginas 118 y 119.

La información obtenida de los registros médicos, fichas y hojas de las interpretaciones por los patólogos y citotecnólogo fue ingresada en la base de datos de Excel diseñada para tal fin. Ver anexo 9 página 135.

Cada expediente de la paciente fue foto-documentado con sus respectivas imágenes de colposcopia, y fotos de citología e histología con inmunotinción. Ejemplos anexos 10 y 11 páginas 136 y 140.

### 3.6. Técnica estadística

La validez de las pruebas de citologías con tinción convencional y con tinción doble fue medida por medio de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo utilizando tablas cruzadas de 2 x 2 con IC 95%. El diagnóstico final o gold estándar que se consideró fue el efectuado por medio de la histología de biopsia o cono cervical con tinción de Hematoxilina y Eosina para citología convencional y con inmunotinción P16 para la citología con doble tinción p16 y Ki67.

Así mismo se agruparon las lesiones menores de LEIAG y las igual o mayor a LEIAG en un cuadro dicotómico.

También se realizó un sub análisis con el cálculo de la sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de la doble tinción P16 y Ki67 en dos grupos etarios: 1) menores y 2) mayores de 30 años.

La concordancia entre la interpretación de la prueba de citología con doble tinción P16 y Ki67 e histología se estimó por medio del coeficiente Kappa ponderado. Esto se realizó entre cada patólogo de Guatemala con respecto al experto de España, entre ellos, y así mismo se evaluó la concordancia de citología con tinción dual del citotecnólogo con respecto a cada uno de los 3 patólogos.

Se utilizó el programa Epidat versión 3. Y se interpretaron los índices Kappa considerando los rangos de  $<0$  a  $0.2$  = pobre concordancia;  $0.2$  a  $0.4$  = débil ;  $0.4$  a  $0.6$  = moderada ;  $0.6$  a  $0.8$  = buena y de  $0.8$  a  $1$  = muy buena concordancia.(100)

También se utilizó el coeficiente de correlaciones para variables dependientes e independientes ordinales con Test de Tau b de Kendall con el programa SPSS versión 20 para estimar la correlación de colposcopia con citología con tinción doble P16 y Ki67, correlación de la citología con el test de doble tinción con la histología, así como la correlación de la citología convencional con respecto a la histología.

Se aceptaron o descartaron las hipótesis estadísticas con un valor de significancia  $p < 0.05$  y CI 95%.Se interpretó el valor del Índice de correlación Tau b de Kendall  $0$  a  $0.19$  = Muy baja correlación;  $0.20$  a  $0.39$  = Baja correlación;  $0.40$  a  $0.59$  = Moderada correlación;  $0.60$  a  $0.79$  = Buena correlación y  $0.80$  a  $1$  = Muy buena correlación.

A fin de evaluar el índice de correlación Kendall Tau b entre los métodos que ayudan al diagnóstico de lesiones del cérvix y los índices de concordancia, se ponderó cada uno de ellos, para hacer la equivalencia ver Tabla N°5. Se utilizó los programas Epidat versión 3 y SPSS versión 20.

Tabla 5 Valores ponderados de citología, impresión colposcópica e histología

Valor ponderado y Categorizado	Resultado de citología convencional	Resultado de citología con tinción doble p16 ki67	Impresión colposcópica/ Coopleson	Resultado de histología
1	Cambios Inflamatorios, (ligero-severo)	Cambios Inflamatorios, (ligero-severo)	Negativa	Normal, Lesiones Benignas
2	LEIBG (NIC I, Condiloma) ASCUS, AGUS o ASC-H	LEIBG (NIC I, Condiloma) ASCUS, AGUS o ASC-H	Poco Significativa	LEIBG (NIC I, Condiloma)
3	LEIAG (NIC 2,3, CA Insitu)	LEIAG (NIC 2,3, CA Insitu)	Significativa	LEIAG (NIC 2,3, CA Insitu)
4	Cáncer invasivo de tipo escamoso, mixto, adenocarcinoma, otros	Cáncer invasivo de tipo escamoso, mixto, adenocarcinoma, otros	Muy Significativa	Cáncer Microinvasivo ó Invasivo (Escamoso, Mixto, adenocarcinoma, otros)



## 4. RESULTADOS

Las pacientes que aceptaron participar en el estudio fueron 210, de las cuales 20 fueron excluidas del mismo debido a que las muestras del cérvix ya sean de citología o histología no cumplían los estándares de calidad para su interpretación, en su mayoría por escaso material.

### 4.1 Características generales de las pacientes estudiadas.

En la Tabla N° 6 se presentan los datos generales de las 190 pacientes participantes. La edad media y desviación estándar era  $41 \pm 13.9$  años. El rango de edad más numeroso fue entre 26 a 35 años (29.5 %), seguido del rango 36 a 45 años (26.8%). Según las gestaciones previas, 43 pacientes (24%) tienen 3 hijos, seguido de 33 pacientes (18.75%) con 1 solo hijo y 32 pacientes (18.18%) con más de 6 hijos.

A la pregunta del uso de métodos anticonceptivos utilizados, 123 pacientes (64.7%) refieren no haber utilizado alguno, el método más empleado fue ligadura (pomeroy o anillos) 42 pacientes (22.1%).

### 4.2 Resultados de las interpretaciones de citología, histología de biopsias y conos cervicales con tinciones convencionales.

Los resultados de citología de frote o extendido cervical con tinción convencional o conocido como pap. por las que las pacientes habían sido remitidas a la Unidad de Colposcopia del INCAN (ver Tabla 7):

Hallazgos menores a lesiones escamosas intraepitelial de alto grado < LEIAG:

- AGUS por sus siglas en inglés atipia glandular de significado indeterminado 4 (2.11%), ASCUS por sus siglas en inglés atipia escamosa de significado indeterminado 27 (14.21%),
- ASCH por sus siglas en inglés atipia escamosa de alta sospecha 3 (1.58%) y LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado 54 (28.42%);

Grupo de mayores o igual a lesiones escamosas intraepitelial de alto grado  $\geq$ LEIAG:

- LEIAG 75 (39.47%).
- Carcinoma invasivo del cérvix epidermoide 23 (12.11%) y adenocarcinoma 4 (2.11%).

Como ya expusimos, a cada paciente se le efectuó biopsia cervical bajo visión colposcópica, las cuales fueron procesadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). A la interpretación, los resultados que fueron de mayor relevancia clínica son:

- Los casos menores de LEIAG fueron negativos, cervicitis metaplasia, etc. 53 (27.89%) y LEIBG 34 (17.89%).
- Y LEIAG 68 (35.79%) y carcinoma invasivo 35 (18.42%) de estos últimos el tipo epidermoide fue el más frecuente 23 casos (12.10%).

De las 190 pacientes incluidas en nuestro estudio, se efectuaron 45 conizaciones del cérvix con asa de diatermia, ya sea por tratamiento o por diagnóstico. De ellos en 31 casos (68.88%) se diagnosticó LEIAG, 3 (6.67%) carcinoma microinvasivo, 3 (6.67%) carcinoma epidermoide invasivo, 4 (8.89%) casos fueron negativos y 4 (8.89%) LEIBG. Ver Tabla 7.

Tabla 6. Características generales de las pacientes que aceptaron participar en la Unidad de colposcopia INCAN.

Rangos de edad	n (190)	%
menor 20	7	3.7
21 a 25	16	8.4
26 a 35	56	29.5
36 a 45	51	26.8
46 a 55	29	15.3
56 a 65	16	8.4
Mayor de 66	15	7.9
Gestas	n	%
0	6	3.2
1	34	17.9
2	29	15.3
3	48	25.3
4	24	12.6
5	13	6.8
>6	36	18.9
Métodos Anticonceptivos	n	%
Ninguno	123	64.7
Ligadura, pomey o anillos	42	22.1
orales	12	6.3
Trimestral	8	4.2
Jadell	3	1.6
DIU	2	1.1

DIU Dispositivo Intra Uterino

**FUENTE** Papeletas de pacientes que aceptaron participar, Unidad de Colposcopia INCAN

Tabla 7. Resultados de las interpretaciones citología de frote, biopsia y cono cervical en pacientes que aceptaron participar en Unidad de colposcopia INCAN.

Resultados de citologías convencionales	n (190)	%
AGUS	4	2.11
ASCUS	27	14.21
ASCH	3	1.58
LEIBG	54	28.42
LEIAG	75	39.47
Carcinoma epidermoide invasivo	23	12.11
Adenocarcinoma invasivo	4	2.11

Resultados de histología biopsia H & E	n (190)	%
LIB	53	27.89
LEIBG (NIC 1, coilocitosis o condiloma)	34	17.89
LEIAG (NIC 2 ó 3)	68	35.79
Carcinoma invasivo (total 35).		
Carcinoma microinvasivo sospecha	6	3.16
Carcinoma epidermoide Invasivo	23	12.10
Adenocarcinoma invasivo	4	2.10
Adenocarcinoma mucinoso	1	0.53
Adenoescamoso invasivo	1	0.53

Resultados de histología cono H&E	n (45)	%
LIB	4	8.89
LEIBG (NIC 1, condiloma)	4	8.89
LEIAG, (NIC 2 ó 3)	31	68.88
Carcinoma microinvasivo	3	6.67
Carcinoma epidermoide invasivo	3	6.67

AGUS por sus siglas en inglés atípia glandular de significado indeterminado, ASCUS por sus siglas en inglés atípia escamosa de significado indeterminado, ASCH por sus siglas en inglés atípia escamosa de altamente sospecha, LIB, Lesión inflamatoria benigna, LEIBG Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, LEIAG Lesión escamosa intraepitelial de alto grado, NIC Neoplasia intraepitelial cervical  
Fuente: Papeletas de las pacientes que aceptaron participar, unidad de Colposcopia INCAN



#### 4.3. Resultados de la interpretación de citologías, biopsias y cono cervicales con tinciones por Inmunohistoquímica.

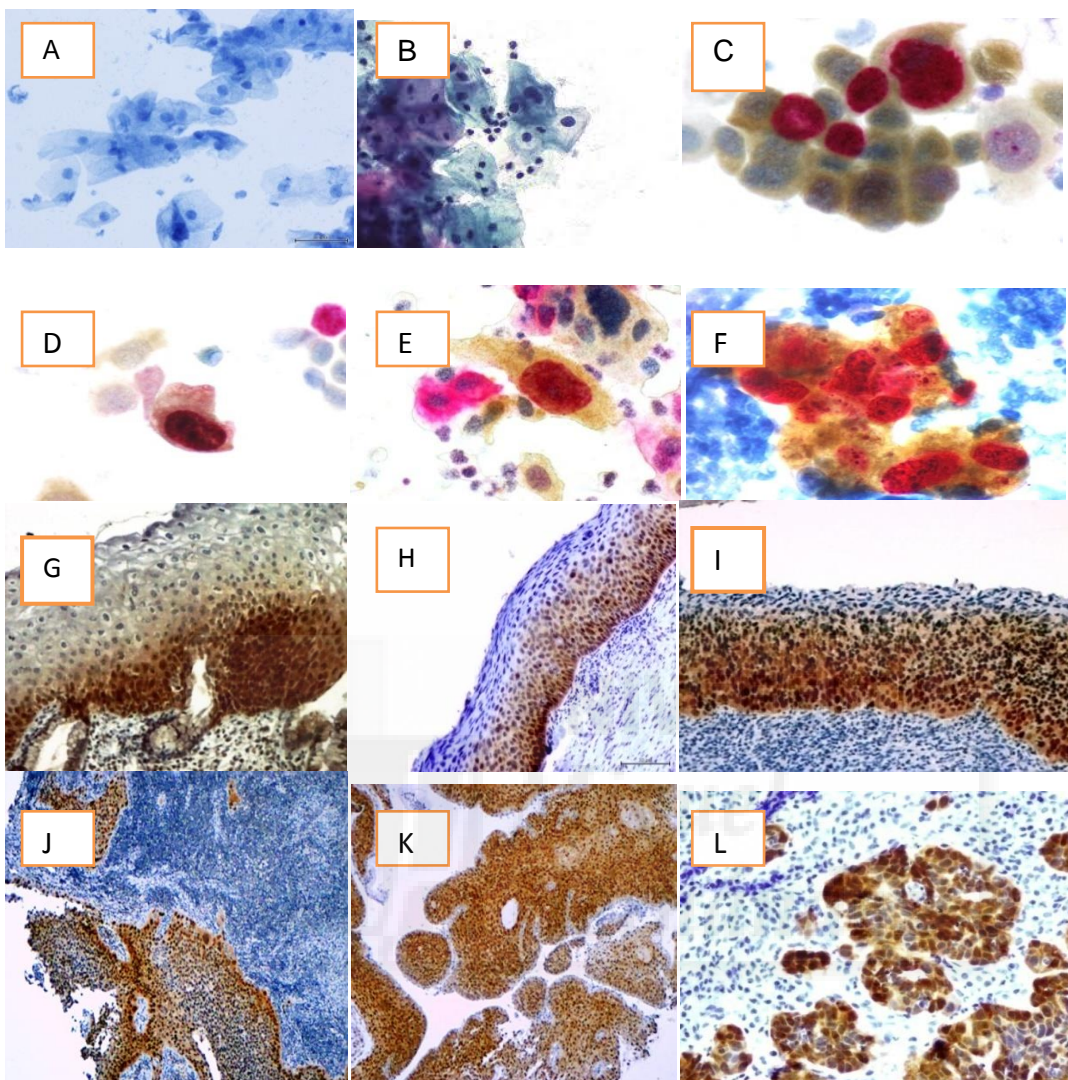
A continuación se presenta, en cuatro secciones lo más relevante de las interpretaciones de citología de frotis y de biopsias y conos cervicales procesadas por inmunohistoquímica: A) las interpretaciones de hallazgos citomorfológicos de frotis del cérvix, procesadas por inmunocitoquímica con P16 y Ki67. B) Las interpretaciones de los hallazgos histomorfológicos de biopsias y conos cervicales que fueron procesadas por inmunohistoquímica con P16. Y por último C) La tinción positiva ó negativa de: los frotis del cérvix con P16 y Ki67 según los hallazgos citomorfológicos, y de muestras de biopsias y conos cervicales con P16 según los hallazgos histomorfológicos. Ver fig.17.

A) Las interpretaciones de hallazgos citomorfológicos de frotis del cérvix, procesadas con inmunocitoquímica con P16 y Ki67.

En esta sección se presentan los resultados de las 190 citologías interpretadas por el experto quien al observar los cambios citomorfológicos detectó lo siguiente:

- Los casos menores de LEIAG, que en total fueron 96, clasificados en: Lesiones benignas 65 (34.21%), AGUS 1 (0.53%), ASCUS 4(2.11%), ASCH 2(1.05%), LEIBG 24 (12.63%).
- LEIAG 72 (37.89%) y carcinoma invasivo 22 (17.89%) de estos últimos el tipo epidermoide fue el más frecuente 14 casos (7.37%) y adenocarcinoma invasivo 8 (4.21%). Ver Tabla N°8.

Estas interpretaciones difieren los resultados con respecto a la citología de referencia, especialmente en lesiones menores de LEIAG; más adelante expondremos la comparación de ambos grupos, y estos datos se presentaran con detalle.



*Figura 17* Muestras de citologías de frotis cervicales con doble tinción p16ki67 y biopsias de cérvix con tinción P16.

Citologías de frotis cervicales con doble Tinción P16 Ki67, de la A a la F. A LNIM, Lesiones negativas intraepiteliales o malignas; B LEIBG, Lesión escamoso intraepitelial de bajo grado con coilocitosis; C LEIAG, lesión escamoso intraepitelial de alto grado; D y E Células carcinoma epidermoide invasivo y F. Adenocarcinoma invasivo. Biopsias del cérvix con tinción P16 de la G a la L. G. LEIBG; H. e I. LEIAG; J Microinvasivo; K Carcinoma epidermoide invasivo y L adenocarcinoma invasivo. Fotografías del Laboratorio Ciencias Biomédicas de Universidad de San Carlos de Guatemala.

Tabla 8. Resultados de la interpretación de citologías de frotis cervicales con inmunotinción P16 y Ki67.

Resultados de la interpretación de las citologías	n	%
Lesiones benignas	65	34.21
AGUS	1	0.53
ASCUS	4	2.11
ASCH	2	1.05
LEIBG	24	12.63
LEIAG	72	37.89
Carcinoma epidermoide invasivo	14	7.37
Adenocarcinoma invasivo	8	4.21

AGUS, por sus siglas en inglés atípia glandular de significado indeterminado; ASCUS, por sus siglas en inglés atípia escamosa de significado indeterminado; ASCH, por sus siglas en inglés atípia escamosa de alto grado; LIB, lesión inflamatoria benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, escamosa intraepitelial de alto grado.

B) Las interpretaciones de los hallazgos histomorfológicos de biopsias y conos cervicales que fueron procesadas por inmunohistoquímica con P16.

Como ya expusimos, a cada paciente se le efectuó biopsia cervical bajo visión colposcópica, las cuales fueron procesadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), así como tinción por inmunohistoquímica P16. Del mismo bloque de parafina se obtuvo las muestras para ambos tipos de tinción. A la interpretación los resultados que fueron de mayor relevancia clínica son:

- Los casos menores de LEIAG que en total fueron 76, clasificados en: negativos, cervicitis metaplasia, etc. 53 (27.89%) y LEIBG 23 (12.12%).
- LEIAG 78 (41.05%) y sospecha de carcinoma microinvasivo (casos que se les efectuó conización diagnóstica), carcinoma invasivo epidermoide 26 casos (13.68%) y adenocarcinoma 7 (3.68%). Hay diferencias en las interpretaciones histomorfológicas de importancia clínica especialmente LEIBG, microinvasivo e invasivos, los cuales presentaremos más adelante. Ver Tabla N° 9.

Observamos que existen diferencias entre ambos grupos de biopsias teñidas con H&E y con P16. Especialmente las LEIBG, LEIAG, carcinoma microinvasivo y CEI. Más adelante se presentaran estos datos en detalle

C) La tinción positiva ó negativa de los frotis del cérvix con P16 y Ki67 según los hallazgos citomorfológicos.

Acá se presenta la frecuencia de la tinción de ambos marcadores moleculares (P16 y Ki67) con respecto a los cambios citomorfológicos observados al microscopio. Se considera positivo si las células tienen núcleo color rojo y citoplasma color marrón. Ver figura N° 17 y anexo 10 pag.114

- Las interpretaciones en menores de LEIAG, las cuales suman en total 96 casos, fueron positivas: ninguno de las 65 muestras con lesión benigna, 3/4 para ASCUS, 1/1 para AGUS y solamente 2 /22 para LEBG.
- En las lesiones denominadas igual o mayores a LEIAG, en total 94, fueron positivas a la doble tinción P16 Ki67, el 91.7 % de las 72 muestras con LEIAG, así como el 100% de 14 casos con carcinoma epidermoide invasivo. Sin embargo, en nuestro estudio, de los 8 casos de adenocarcinoma invasivo solo el 62.5 % fueron positivas a la doble tinción. Ver Tabla N° 10.

Se observa que a mayor grado de lesión epitelial mayor es la frecuencia de las células transformadas teñidas. Más adelante veremos que sucedió con los casos de ASCUS, AGUS y ASCH positivos a la doble tinción, ya la biopsia cervical tomada por colposcopia.

D) La tinción positiva ó negativa de muestras de biopsias y conos cervicales con P16 según los hallazgos histomorfológicos.

Se presenta la frecuencia de 190 biopsias y 45 conos cervicales que fueron evaluadas con tinción P16; dando positivo aquellas que fueron teñidas las muestras histológicas de color marrón difusamente. Se observó que los casos con LEIAG y cáncer invasivo reaccionaron positivos a la tinción en más del 90%.

- Las biopsias cervicales con interpretación de lesiones menores de LEIAG, las cuales suman en total 76. Las Lesiones benignas fueron en la mayoría negativas 50 de 53 casos (94.3%) y las LEIBG fueron negativas en 19 de 23 casos (82.6%).
- Las biopsias cervicales con LEIAG fueron positivas en 74 casos de 78 (94.9%) y cáncer invasivo 34 casos de 36 (94.4%).
- En los 45 casos de conos cervicales, 4 casos fueron negativos con diagnóstico de cervicitis, y positivos para LEIAG 32 de 35 casos (91.4%) y para cáncer invasivo los 6 (100%) ver Tabla N° 11.

4.4 Concordancia interobservador de citología cervical con doble tinción y biopsia y de cono cervical con tinción p16.

De cada paciente se evaluó una muestra de citología con doble tinción P16 y Ki67 y una o dos de histología (biopsia y cono cervical) con tinción P16. Fueron 4 evaluadores; 3

patólogos de los cuales uno fue de España (A) y dos de Guatemala (B y C); así mismo un citotecnólogo (D).

Se obtuvo el índice de concordancia con Kappa ponderado con IC 95%. Se observa que el índice para la citología se encuentra entre 0.66 a 0.83, siendo significativa con  $p < 0.0001$ , siendo el mayor acuerdo entre el patólogo experto y el citotecnólogo.

En las muestras de biopsia obtuvieron mejor índice de concordancia, el cual estuvo entre 0.80 y 0.89, considerada muy buena con  $p < 0.0001$ .

Con respecto a la interpretación de conos cervicales tuvo índice de concordancia entre 0.76 y 0.90 siendo respectivamente consideradas de buena a muy buena con  $p < 0.0001$ . Ver Tabla N° 12

#### 4.5 Comparación de la interpretación de las citologías dependiendo de tinción (Pap y doble tinción P16 y Ki67)

En la tabla N° 13 y Figura 18 se observa los resultados de los hallazgos citomorfológicos en la tinción convencional o pap y con doble tinción P16 Ki67. Uno de los criterios para ingresar al estudio fue tener citología con interpretación desde ASCUS, AGUS, LEIBG en adelante, realizada en menos de tres meses; sin embargo como se puede observar a la interpretación de la segunda muestra con doble tinción hubo diferencias:

- De las citologías con interpretación citomorfológica igual o mayor a LEIAG suman 102 y 94 para tinción pap y doble tinción respectivamente;
- Para la interpretación de citologías con menor a LEIAG suman 88 y 96 para tinción pap y doble tinción respectivamente; a la segunda citología con doble tinción se reclasificó 65 casos en lesiones benignas (LB).

Tabla 9. Resultados de la interpretación de biopsias y conos cervicales con inmunotinción P16.

Resultados de histología biopsia	n (190)	%
Cervicitis	53	27.89
LEIBG	23	12.12
LEIAG	78	41.05
CEI		
Microinvasivo (sospecha)	3	1.58
Invasivo	26	13.68
Adenocarcinoma Invasivo	7	3.68
Resultados de histología en Cono cervical		
	n (45)	%
Cervicitis	4	8.89
LEIBG	0	0
LEIAG	35	77.78
CEI		
Microinvasivo	1	2.22
Invasivo	5	11.11

LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, Carcinoma epidermoide invasivo.

#### 4.6. Comparación de la interpretación de las biopsias cervicales según tipo de tinción de hematoxilina eosina y p16.

En la Tabla N 14 y figura 19 se presenta el listado de diagnósticos de biopsias del cérvix según tinción, En dicha tabla se presenta la interpretación histomorfológica; se observa aumento de 10 casos de LEIAG con tinción P16, algunos de los mismos se diagnosticaron



como LEIBG con tinción H&E. Además se detectaron 6 casos microinvasivos para H&E y se reclasifican sólo 3 microinvasivos con tinción P16.

Tabla 10. Tinción de las muestras de citología con P16 y Ki67 según las interpretaciones citomorfológicas.

Reacción a la P16 Ki67	LB	ASCUS	AGUS	ASCH	LEIBG	LEIAG	CEI	ACI	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Negativa	65 (100)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	22(92.3)	6 (8.3)	0 (0)	3(37.5)	99 (52.1)
Positiva	0 (0)	3 (75)	1(100)	2(100)	2 (7.7)	66 (91.7)	14 (100)	5(62.5)	91 (47.9)
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>72</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>190</b>

AGUS, por sus siglas en inglés atípia glandular de significado indeterminado; ASCUS, por sus siglas en inglés atípia escamosa de significado indeterminado; ASCH, por sus siglas en inglés atípia escamosa de alto grado; LIB, lesión inflamatoria benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo y ACI, adenocarcinoma invasivo.

Tabla 11. Tinción de muestras de histologías de biopsias y conos cervicales con P16 según las interpretaciones histomorfológicas.

Reacción a la tinción P16	Biopsias del cérvix				Conos cervicales		
	LIB n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	Cáncer n (%)	LIB n (%)	LEIAG n (%)	Cáncer n(%)
Positivo	3 (5.7)	4 (17.4)	74(94.9)	34(94.4)	0 (0)	32(91.4)	6 (100)
Negativo	50 (94.3)	19(82.6)	4(5.1)	2(5.6)	4(100)	3(8.6)	0 (0)
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>23</b>	<b>78</b>	<b>36</b>	<b>4</b>	<b>35</b>	<b>6</b>

LIB, lesión inflamatoria benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado. En biopsias cáncer invasivo= epidermoide microinvasivo 3, Invasivos 26 y adenocarcinoma invasivo 7. En los conos con cáncer invasivo = epidermoide microinvasivo 1 e invasivo 5.



Tabla 12. Índices de concordancia interobservador según tipo de muestra interpretada.

Evaluadores	Tipo de muestra interpretada					
	Citología cervical, doble tinción P16 K67		Biopsia cervical, tinción P16		Cono cervical tinción P16	
	Índice K	IC 95%	Índice K	IC 95%	Índice K	IC 95%
A- B	0.77*	0.69 0.84	0.83*	0.77 0.89	0.81*	0.60 1.0
A- C	0.74*	0.65 0.84	0.89*	0.85 0.93	0.90*	0.81 0.99
A- D	0.83*	0.77 0.89	---	-----	-----	-----
B- C	0.66*	0.57 0.75	0.80*	0.74 0.87	0.76*	0.53 0.98
B- D	0.75*	0.66 0.81	-----	-----	-----	-----
C- D	0.75*	0.67 0.84	-----	-----	-----	-----

A, patólogo experto; B y C = patólogos de Guatemala y D, citotecnólogo; K. *Kappa Ponderado*; IC, Intervalo de confianza. \* P < 0.0001

#### 4.7 Comparación de la interpretación de histología en conos cervicales según tinción hematoxilina eosina y p16.

En la Tabla N° 15 y figura 20 se presentan los diagnósticos de muestras histológicas de 45 conos cervicales. Del mismo bloque de parafina se hizo cortes para la tinción con H&E y para inmunotinción P16. Hubo dos diferencias al comparar los diagnósticos:

- 1) Cuatro casos con tinción H&E diagnosticados como LEIBG se reclasificaron en LEIAG con la tinción P16 y
- 2) Dos casos con tinción H&E diagnosticados como microinvasivo se reclasifican como Invasivo con la tinción P16; los tres patólogos evaluadores coincidieron con estos diagnósticos.

#### 4.8 Impresión colposcópica, además de su correlación con respecto al diagnóstico final histológico con tinción P16.

Cada paciente fue evaluada por colposcopia, al observar lesiones en el cérvix se Interpretó las mismas y se informó:

- “Negativa” considerándolas lesiones benignas
- “Poco Significativa” consideradas como LEIBG en total fueron sumando este y el anterior grupo suman 98 (51.58%);
- para los casos de mayor relevancia clínica “Significativa” 61 casos (32.10%)  
Considerando las LEIAG.
- y para “Muy Significativa” 31 casos (16.32%)

En la Tabla N° 16 se presentan las impresiones colposcópicas de las pacientes evaluadas previamente a la toma de biopsia.

Se observa que hubo 32 de 98 (32.6%) casos sub detectados es decir que la impresión colposcópica es negativa o poco significativa y al resultado final por histología P16 fueron 27 casos con LEIAG y 7 con cáncer invasivo, denominados falsos negativos.

También hubo casos con sobre detección, es decir con impresión colposcópica significativa o muy significativa y con resultado de histología 10 de 92 casos (10.9%) con CIB o LEIBG, denominados falsos positivos.

Las impresiones colposcópicas significativas y muy significativas cuyo diagnóstico final fue LEIAG y cáncer invasivo fueron 82 de 92 casos, es decir 89.1% son verdaderos positivos (16.32%) considerándolas para lesiones de carcinoma invasivo. Ver tabla N° 17.

Tabla 13. Resultados de citologías cervicales según tipo de tinción.

	Tipo de tinción			
	Tinción Pap		Doble tinción	
	n	(%)	n	(%)
LB	0	(0)	65	(34.21)
AGUS	4	(2.1)	1	(0.53)
ASCUS	27	(14.21)	4	(2.11)
ASCH	3	(1.58)	2	(1.05)
LEIBG	54	(28.42)	24	(12.63)
LEIAG	75	(39.47)	72	(37.89)
CEI	22	(11.58)	14	(7.37)
ACI	5	(2.63)	8	(4.21)
TOTAL	190	(100)	190	(100)

LB; Lesiones benignas; ASCUS, células escamosas atípicas de significado indeterminado; AGUS, células atípicas glandulares de significado indeterminado; ASCH, células escamosas atípicas sin descartar lesión alto grado; LEIBG; lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo; ACI, adeno carcinoma invasivo.

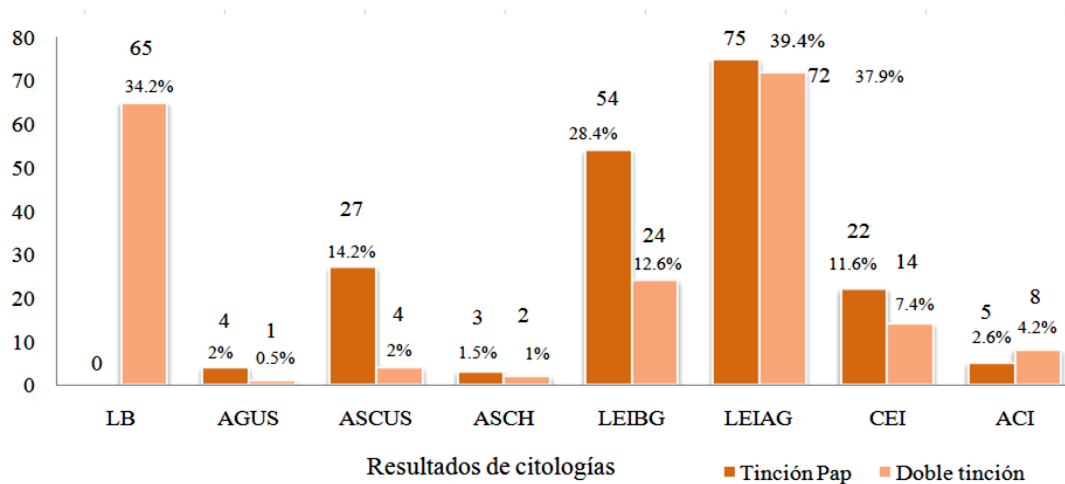


Figura 18. Resultados de citologías cervicales según tipo de tinción.

LB; Lesiones benignas; ASCUS, células escamosas atípicas de significado indeterminado; AGUS, células atípicas glandulares de significado indeterminado; ASCH, células escamosas atípicas sin descartar lesión alto grado; LEIBG; lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo; ACI, Adenocarcinoma invasivo.

Tabla 14. Diagnósticos en biopsias cervicales según tinción.

	Biopsias cervicales			
	Tinción H&E		Tinción P16	
	n	(%)	n	(%)
Cervicitis	53	(27.9)	53	(27.9)
LEIBG	34	(17.9)	23	(12.1)
LEIAG	68	(35.9)	78	(41.1)
CEI				
Microinvasivo	6	(3.1)	3	(1.6)
Invasivo	23	(12.1)	26	(13.7)
ACI	6	(3.1)	7	(3.7)
Total	190	(100)	190	(100)

LEIBG, Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, Lesión Escamosa intraepitelial de alto grado; CEI Carcinoma epidermoide invasivo; ACI, Adenocarcinoma invasivo.

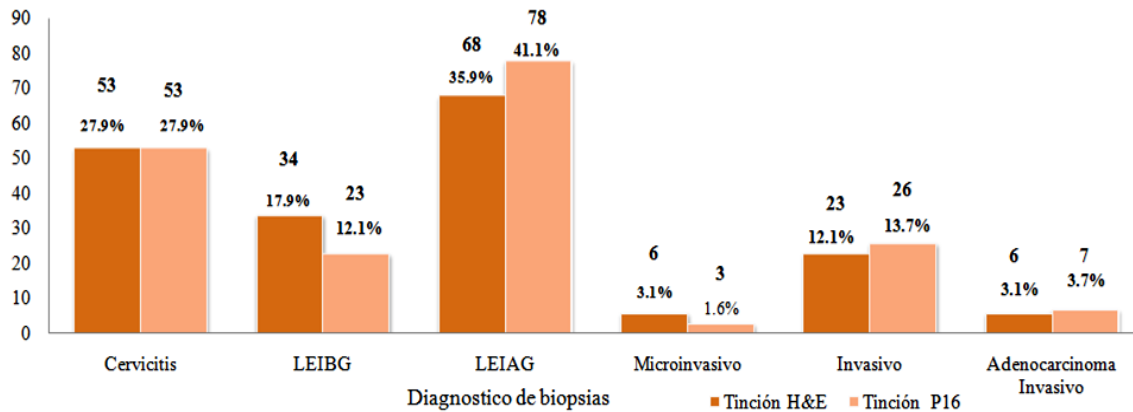


Figura 19. Diagnósticos en biopsias cervicales según tinción.

LEIBG, Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, Lesión Escamosa intraepitelial de alto grado; CEI Carcinoma epidermoide invasivo; ACI, Adenocarcinoma invasivo.

Tabla 15. Diagnósticos en conos cervicales según tinción.

	Conos cervicales			
	Tinción H&E		Tinción P16	
	n	(%)	n	(%)
Cervicitis	4	(8.9)	4	(8.9)
LEIBG	4	(8.9)	0	(0)
LEIAG	31	(68.9)	35	(77.8)
CEI				
Microinvasivo	3	(6.7)	1	(2.2)
Invasivo	3	(6.7)	5	(11.1)
Total	45	(100)	45	(100)

H&E, Tinción de hematoxilina eosina; LEIBG, Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, Lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI Carcinoma epidermoide invasivo.

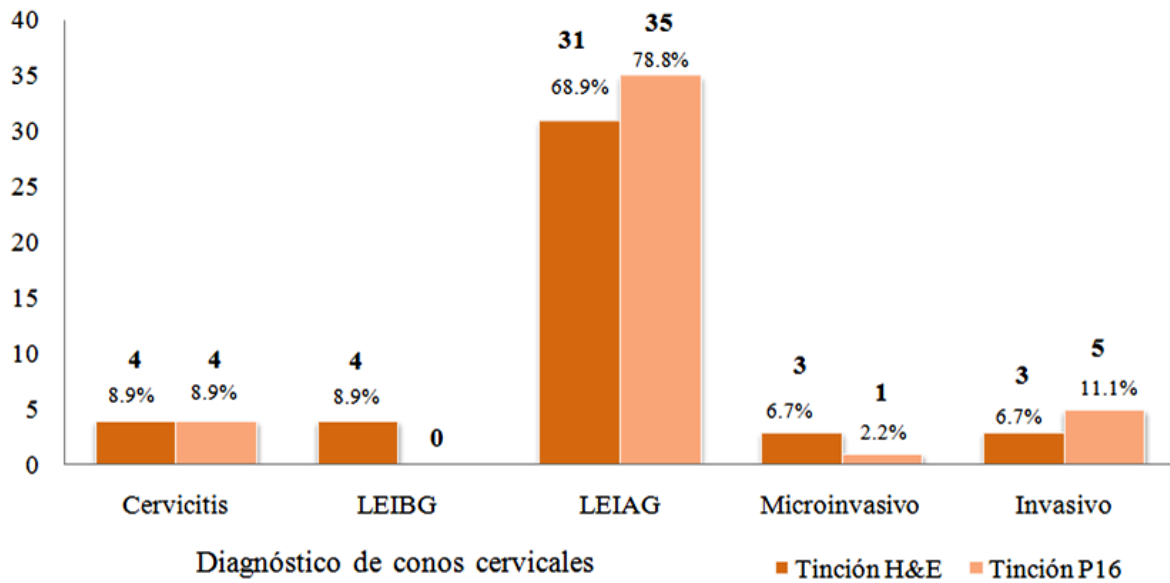


Figura 20. Diagnósticos en conos cervicales según tinción.

H&E, Tinción de hematoxilina eosina; LEIBG, Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, Lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI Carcinoma epidermoide invasivo.

Tabla 16. Impresión colposcópica.

Impresión colposcópica	n	%
Negativa	24	12.63
Poco Significativa	74	38.95
Significativa	61	32.10
Muy Significativa	31	16.32
Total	190	100

Tabla 17. Impresión colposcópica respecto a diagnóstico final de histopatología con tinción P16.

Impresión Colposcópica	Diagnóstico final histopatología con P 16			TOTAL n (%)
	LIB – LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	Cáncer invasivo n (%)	
Negativa - Poco Significativa	66 (86.84)	25(32.05)	7(19.4 )	98(51.58)
Significativa	6 (7.89)	43(55.13)	12(33.33)	61(32.10)
Muy Significativa	4 (5.27)	10 (12.82)	17(47.23)	31(16.32)

La Impresión colposcópica negativa y poco significativa= Biopsia lesión inflamatoria benigna LIB hasta lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG); significativa= Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG); muy significativa = cáncer invasivo o microinvasivo.

#### 4.9 Resultados de lesiones cervicales según rangos de edad y tipo de tinción histológica.

Las lesiones del cérvix se diagnosticaron al interpretar en cada muestra histológica, obtenida por biopsia ó cono cervical; se realizó dos cortes del mismo bloque de parafina para tinción H&E e inmunotinción de la proteína P16.

En esta investigación se presentan las lesiones cervicales diagnosticadas según el tipo de tinción y los rangos de edad de las pacientes. En la fig. 21 se muestra el recuento de cada tipo de lesión cervical con tinción H&E según rango de edad. Los casos con LEIAG, representada de línea de color amarilla, tienen su máxima frecuencia entre 26 a 35 años. Mientras que los casos con cáncer invasivo del cérvix, representada de línea color morado, fueron aumentando desde los 35 años, teniendo dos repuntes en el rango de los 36 a 45 años

y de 56 a 65 años. Las lesiones normales o benignas y LEIBG, línea azul y verde respectivamente, tienen su mayor frecuencia entre los rangos 26 hasta 55 años y disminuyen después de los 65 años.

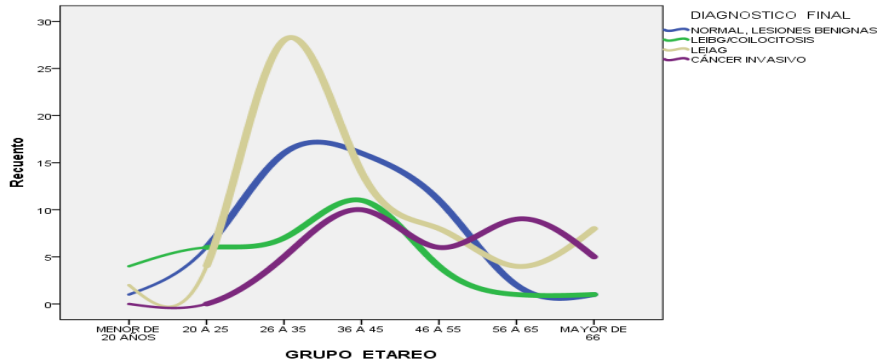


Figura 21. Tipo de lesiones cervicales, diagnosticadas por histomorfología con tinción H&E, según rangos de edad.

Distribución de cada tipo de Lesión cervical según rango de edad; Línea azul, normal, lesiones benignas; Línea Verde, LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; Líneas Amarilla, LEIAG lesión escamosa intraepitelial de alto grado y línea púrpura, cáncer invasivo. Rangos de edad de 10 años, desde menor de 20 años hasta mayores de 65 años.

Por otra parte, en la fig. 22, se presenta el recuento o frecuencia de los tipos de lesiones cervicales, diagnosticados en biopsias o conos cervicales con tinción P16 según edad agrupado, rangos de 10 años. Se observa que hay una máxima frecuencia de los casos de LEIAG y cáncer invasivo a partir de los 30 años; disminuyendo en el rango de 51 a 60 años. Las LEIBG tiene su máxima frecuencia o recuento entre el rango de 21 a 30 años.

Se realizaron estas dos gráficas para evidenciar si hay o no diferencias entre ambos tipos de tinción con respecto a rangos de edad; especialmente para aplicar la prueba de inmunotinciones en población mayor de 30 años, debido a que existe repunte de casos de LEIAG y cáncer invasivo del cérvix.



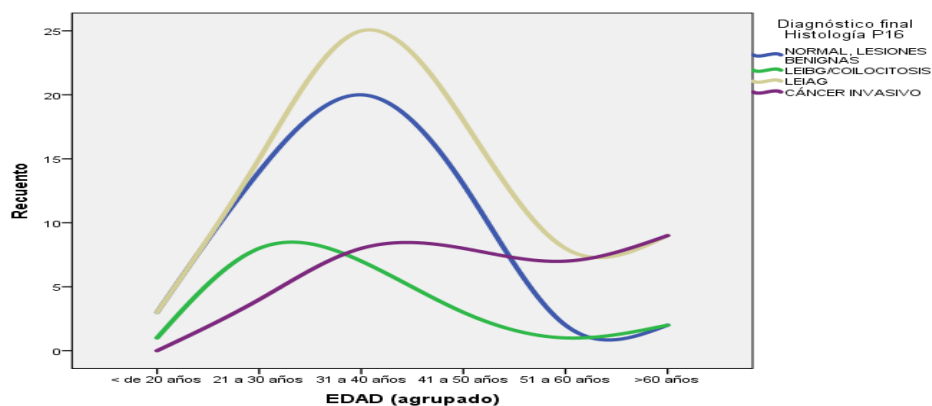


Figura 22. Tipo de Lesiones cervicales, diagnosticadas por histomorfología con tinción P16, según rangos de edad.

Recuento de cada tipo de lesión cervical según rango de edad; Línea azul, normal, lesiones benignas; Línea Verde, LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; Línea Amarilla, LEIAG lesión escamosa intraepitelial de alto grado y Línea púrpura, cáncer invasivo. Rangos de edad de 10 años, desde menor de 20 años hasta mayores de 60 años.

#### 4.10 Correlación de citología con histología con tinción convencional correspondiente.

En la Tabla N° 18 se presentan los resultados de las citologías con tinción convencional o pap, respecto al resultado de histologías H&E, ya sea por biopsia o cono cervical. Debido a que en algunos casos existió discrepancia entre citología y biopsia, específicamente los casos en que la citología informó LEIAG o cáncer invasivo y en biopsia reportó cervicitis o LEIBG, se efectuaron en algunos casos conos diagnósticos. Por lo tanto se consideró en estos casos el diagnóstico final o concluyente es el resultado del cono cervical.

Se observa que de 88 citologías con hallazgos menores de LEIAG, hay 4 AGUS, 27 ASCUS, 3 ASCH y 54 LEIBG, al resultado de biopsia o cono se detectaron 22 (25.6%) casos con LEIAG o más.

De las restantes 102 citologías, que fueron interpretadas con LEIAG o cáncer invasivo, se detectaron por biopsia o cono cervical 20 (19.6%) casos menores a LEIAG, considerados como falsos positivos; y de 82 (80.4%) casos de este grupo fueron confirmados como LEIAG o más, considerados como verdaderos positivos. En casos especiales como ASCUS 7 de 27 casos y ASCH 3 de 3 casos se confirma LEIAG o más por biopsia o cono cervical.

Tabla 18. Resultados de citología con tinción convencional según diagnóstico de biopsia ó cono cervical con tinción H&E.

Citología con tinción convencional o pap								
Histología con tinción H&E	AGUS	ASCUS	ASCH	LEIBG	LEIAG	CEI	ACI	Total
	n 4(%)	n 27 (%)	n 3 (%)	n 54 (%)	n 75 (%)	n 23 (%)	n 4 (%)	n190 (%)
LIB	2 (50)	15 (55.5)	0 (0)	23 (42.5)	10 (13.3)	2 ( 8.70)	1 (25.0)	53 (27.8)
LEIBG	0 (0)	5 (18.52)	0 (0)	21 (38.8)	5 (6.67)	2 (8.70)	0 (0)	33 (17.3)
LEIAG	1 (25)	4 (14.81)	3(100)	9 (16.67)	45 (60.0)	7 (30.43)	1 (25.0)	70 (36.8)
CEI	0 (0)	3 (11.11)	0 (0)	1 (1.85)	11 (14.6)	12 (52.1)	1 (25.0)	28(14.74)
ACI	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (5.33)	0 (0)	1 (25.0)	6 (3.16)

AGUS, por sus siglas en inglés atípica glandular de significado indeterminado; ASCUS, por sus siglas en inglés atípica escamosa de significado indeterminado; ASCH, por sus siglas en inglés atípica escamosa de alto grado; LIB, lesión inflamatoria benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo; ACI, adenocarcinoma invasivo.

#### 4.11 Resultado de interpretación de citología con doble tinción P16 y Ki67, y correlación con histología con tinción P16 correspondiente.

A las pacientes que aceptaron participar en el estudio, previo a la colposcopia se tomó muestra con paleta de Ayre del cérvix, realizando un frote en portaobjetos con carga, fijados con alcohol buferado para estudio citológico. Esta muestra fue enviada para ser procesada por inmunotinción P16 y Ki67 (doble tinción).

En la Tabla N° 19 se observa que de 190 citologías con doble tinción, 65 citologías fueron LB Lesiones benignas, de las cuales se diagnosticó por histología final con tinción P16 LEIAG 12 (18.46%) casos consideradas citologías falsas negativas.

Con respecto a ASCUS y ASCH se diagnosticaron por biopsia o cono 3 y 2 casos de LEIAG respectivamente; y una citología con AGUS se diagnosticó por biopsia carcinoma epidermoide invasivo; en estos casos hubo ASCUS y ASCH con doble tinción positivas.

De las 72 citologías con LEIAG hubo sólo 4 casos falsos positivos (5.56%); finalmente de los 22 resultados por citología con carcinoma invasivo no hubo casos menores de LEIAG o sea ningún falso positivo.

Al observar las tablas N° 18 y 19 respecto a los 75 casos de citología pap con resultados de LEIAG, fueron confirmados por histología H&E de biopsia ó cono cervical: 15 casos menores a LEIAG, 45 casos con LEIAG y 15 con cáncer invasivo. Respecto a 72 casos de citologías con doble tinción, con resultado de LEIAG, fueron confirmados por histología con tinción P16 de biopsia ó cono cervical: 4 casos menores a LEIAG, 52 casos con LEIAG y 16 casos con cáncer invasivo. Por tanto, se produjo infra diagnóstico en 15 de 75 (20%) casos para citología pap convencional y 16 de 72 (22.22%) casos para citología con

doble tinción; y sobre diagnóstico en 15 de 75 (20%) casos para citología pap convencional y 4 de 72 (5.56%) casos para citología con doble tinción.

#### 4.12 Citologías de frotis cervical que reaccionaron positivo a la doble tinción P16 Ki67 según diagnóstico histopatológico con tinción P16.

En las secciones previas presentamos si hubo o no tinción de las muestras de citología con P16 y Ki67 según las interpretaciones citomorfológicas (tabla N°10), así como la correlación de la interpretación entre citología con doble tinción e histología con P16 (Tabla N°19). Sin embargo a fin de determinar la correlación de las citologías con doble tinción ó sin ella con respecto a la histología de biopsia ó cono cervical, decidimos presentar en la tabla N° 20 las interpretaciones de las 90 citologías positivas para la doble tinción, respecto al resultado final de histología con P16. Lo más relevante fue:

- De las lesiones < LEIAG solamente 5/90 (5.56%) citologías fueron positivas para la doble tinción. Dos de los 3 casos de ASCUS fueron positivas y corresponden por biopsia a LEIAG.
- De las citologías  $\geq$  a LEIAG 85/90 (94.44%) fueron positivas, de las cuales 80/90 (88.89%) se confirma por histología final P16 lesiones igual o mayor a LEIAG.

Observamos que hay un alto porcentaje de citologías con doble tinción positiva entre los casos con biopsias o conos cervicales con LEIAG ó cáncer invasivo

#### 4.13 Citologías de frotis cervical que reaccionaron negativo a la doble tinción P16 Ki67 según diagnóstico histopatológico con tinción P16.

Así mismo la Tabla N° 21 presenta las 100 citologías con doble tinción negativas o que no reaccionaron a la misma; 91 (91%) de estas tienen un resultado menor de LEIAG, 21/91 tienen por biopsia resultado  $\geq$  de LEIAG. De las 9 (9%) citologías con resultado igual o mayor a LEIAG fueron comprobados con biopsia o cono 8 Lesiones equivalentes, ningún

caso de cáncer epidermoide invasivo fue negativo a P16 y Ki67, sin embargo 3 casos de adenocarcinoma fueron negativos.

Observamos que hay bajo porcentaje de citologías con doble tinción negativa entre los casos con biopsias o conos cervicales con LEIAG o cáncer invasivo.

Tabla 19. Resultados de citología con doble tinción según diagnóstico de histología con tinción P16.

Citología con doble tinción P16 y Ki67									
Histología con Tinción P16	LB n 65 (%)	AGUS n 1 (%)	ASCUS n 4 (%)	ASCH n 2 (%)	LEIBG n 24 (%)	LEIAG n 72 (%)	CEI n 14 (%)	ACI n 8 (%)	Total n 190 (%)
LIB	45 (69.23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (16.67)	4 (5.56)	0 (0)	0 (0)	53 (27.89)
LEIBG	8 (12.31)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	14 (58.33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (12.11)
LEIAG	12 (18.46)	0 (0)	3 (75)	2(100)	6 (25)	52 (72.22)	2 (14.29)	1(12.5)	78 (41.05)
CEI	0 (0)	1(100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (19.44)	12 (85.71)	2 (25)	29 (15.26)
ACI	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2.78)	0 (0)	5 (62.5)	7 (3.68)

LB, Lesiones benignas; ASCUS, por sus siglas en inglés atípia escamosa de significado indeterminado; AGUS, por sus siglas en inglés atípia glandular de significado indeterminado; ASCH, por sus siglas en inglés atípia escamosa de alto grado; LIB, lesión inflamatoria benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo; ACI, adenocarcinoma invasivo.

Tabla 20. Citologías de frotis cervicales que sí reaccionaron a la doble tinción P16Ki67, según resultado final de histología con P16.

Histología con Tinción	Citología con reacción a la tinción P16 y Ki67								Total
	LB	AGUS	ASCUS	ASCH	LEIBG	LEIAG	CEI	ACI	
P16	n 0 (%)	n 0 (%)	n 3 (%)	n 0(%)	n 2 (%)	n 66 (%)	n 14 (%)	n 5 (%)	n 90 (%)
LIB	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(50.0)	3 (4.55)	0 (0)	0 (0)	4 (4.44)
LEIBG	0 (0)	0 (0)	1 (33.33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.11)
LEIAG	0 (0)	0 (0)	2 (66.67)	0 (0)	1 (50.0)	48 (72.7)	2 (14.29)	0 (0)	53 (58.89)
CEI	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (19.7)	12 (85.7)	2(40.0)	27 (30.0)
ACI	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3.02)	0 (0)	3(60.0)	5 (5.56)

LB, Lesiones benignas; AGUS, por sus siglas en inglés atípia glandular de significado indeterminado; ASCUS, por sus siglas en inglés atípia escamosa de significado indeterminado; ASCH, por sus siglas en inglés atípia escamosa de alto grado; LIB, Lesión Inflamatoria Benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo; ACI, adenocarcinoma invasivo.

#### 4.14 Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de: citología convencional, citología con doble tinción P16 y Ki67 y colposcopia.

En la Tabla N° 22 se presentan los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo VPP y valor predictivo negativo VPN de las dos pruebas de citologías con convencional o conocida como pap y doble tinción P16 Ki67, así como de la colposcopia; La interpretación citomorfológica de estas pruebas se contrasta con el gold estándar que fue el diagnóstico por biopsia o cono con la tinción correspondiente.

Se observa que para ambos tipos de citologías, convencional y doble tinción con P16 y Ki67, la sensibilidad es similar 78.64 y 78.95% respectivamente. Sin embargo, la especificidad fue diferente siendo 75.85 y 94.74% respectivamente, mayor para doble tinción debido a que hay menos casos falsos positivos.

La colposcopia obtuvo valores de sensibilidad y especificidad de 71.93 y 86.84% respectivamente.

Con respecto al VPP o sea el porcentaje de probabilidad de que la prueba al ser positiva esté realmente la paciente enferma (diagnósticos igual ó mayor a LEIAG) fue mayor en citología con doble tinción 95.74% con IC 95% de 91.13-100.0; El VPP de la citología convencional y la impresión colposcópica fue 79.41 y 89.13% respectivamente. El VPN, o sea el porcentaje o probabilidad de que la prueba al ser negativa la paciente esté realmente sana, fue similar en ambos tipos de citologías 75% y para la impresión colposcópica 67.35%.

Al poner a prueba la posible estrategia secuencial de citología con doble tinción y la impresión colposcópica, al obtener los valores de sensibilidad y especificidad se estima un valor conjunto predictivo positivo de 99.19% y especificidad de 99%, tasas que realmente muestran una gran validez y precisión para esta estrategia conjunta.

#### 4.15 Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la citología con doble tinción P16 y Ki67 según edad (menor o mayor de edad de 30 años).

En la Tabla N° 23 se comparó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la doble tinción en citología, según dos grupos de edad, en menores (<) y mayores (>) de 30 años. La prueba confirmatoria fue la biopsia o cono cervical con tinción P16. Evidenció que la mayor sensibilidad y VPP de la prueba está en el grupo de > de 30 años, 78.43 y 95.24%

respectivamente. La especificidad y VPN fueron un poco mayores en el grupo de < de 30 años: 95.83 y 83.33 %.

Tabla 21. Citologías de frotis cervicales sin reacción a la doble tinción, según resultado final de histología con inmunotinción de P16.

Citologías sin reacción a la tinción P16 y Ki67									
Histología	LB	AGUS	ASCUS	ASCH	LEIBG	LEIAG	CEI	ACI	Total
Con tinción P16	n 65 (%)	n1 (%)	n 1 (%)	n 2(%)	n 22(%)	n 6 (%)	n 0 (%)	n 3 (%)	n 100(%)
LIB	45(69.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3(13.6)	1(16.6)	0 (0)	0 (0)	49(49.0)
LEIBG	8(12.31)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14(63.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22(22.0)
LEIAG	11(16.9)	0 (0)	1 (100)	2(100)	5(22.7)	3(50.0)	0 (0)	1 (33.3)	23(23.0)
CEI	1 (1.54)	1(100)	0 (0)	0 (0)	0(0)	2(33.3)	0 (0)	0 (0)	4 (4.0)
ACI	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0(0)	0 (0)	2 (66.7)	2 (2.0)

LB, Lesiones benignas; ASCUS, por sus siglas en inglés atípia escamosa de significado indeterminado; AGUS, por sus siglas en inglés atípia glandular de significado indeterminado; ASCH, por sus siglas en inglés atípia escamosa de alto grado; LIB, lesión inflamatoria benigna; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CEI, carcinoma epidermoide invasivo; ACI, adeno carcinoma invasivo.



Tabla 22. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN según interpretación de citología con tinción convencional, con doble tinción P16 Ki67 y colposcopia.

Prueba o Método	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
	Valor % IC 95%	Valor% IC95%	Valor% IC95%	Valor % IC95%
Convencional	78.64 70.24-87.04	75.86 66.30-85.43	79.41 71.07-87.75	75.00 65.38-84.62
Doble tinción	78.95 71.03-86.87	94.74 89.06-100.0	95.74 91.13-100.0	75.00 65.82-84.18
Colposcopia	71.93 63.24-80.62	86.84 78.58-95.10	89.13 82.23-96.03	67.35 57.55-77.15

VPP, Valor predictivo positivo; VPN Valor predictivo negativo; IC, Intervalo de confianza.

Tabla 23. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de doble tinción en citología según grupos de edad

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
	Valor %	Valor %	Valor %	Valor %
	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)
< 30 años	41.67 (9.61-73.73)	95.83 (85.76-100)	83.33 (45.18-100)	76.67 (59.87-93.47)
>30 años	78.43 (69.96-86.90)	92.31 (69.96-86.90)	95.24 (90.09-100)	68.57 (56.98-80.16)

VPP, Valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

#### 4.16 Índice de correlación entre citología cervical con doble tinción p16 ki67, histología e impresión colposcópica.

Así mismo se presentan en la tabla N° 24 los resultados de Índices de correlación, entre variables ordinales (con la prueba Tau b de Kendall) en las pruebas citológicas, histología e impresión colposcópica. Los índices de correlación entre citología con tinción Pap y diagnóstico final H&E e Impresión colposcópica fueron 0.477 y 0.567 respectivamente consideradas correlación moderada.

El índice de correlación entre citología con doble tinción respecto a diagnóstico final de histología con tinción P16 e impresión colposcópica fue algo mayor en el primer caso (0.709 y 0.434), considerada de buena y moderada correlación respectivamente.

Por último, los índices de correlación de impresión colposcópica y diagnósticos finales con H&E y P16 fueron 0.687 y 0.498, considerados de buena y moderada respectivamente.

La correlación entre las citologías con tinción pap y diagnóstico final con P16 y entre citología con doble tinción y diagnóstico final con H&E fueron los 0.475 y 0.507 respectivamente. Todos los coeficientes de correlación presentados fueron significativos ( $p < .0001$ ).

Si nos fijamos en la tabla 21, todos los métodos ensayados muestran buena correlación estadísticamente significativa con los diagnósticos finales establecidos con los diferentes métodos empleados, pero podemos apreciar una mayor correlación en el caso de citología de doble tinción.

4.17 Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo según reacción de la tinción p16 y Ki67 en citología y p16 en biopsia y cono cervical.

Previamente expusimos lo resultados de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la citología con doble tinción (P16-Ki67) considerando la interpretación citomorfológica según los hallazgos histomorfológicos de biopsias y conos. Finalmente exponemos acá la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la tinción de los biomarcadores P16 y Ki67 respecto a los hallazgos cito e histomorfológicos. En relación con los datos previos de las células afectadas con lesiones intraepiteliales, especialmente LEIAG y cáncer invasivo, que son teñidas con estos dos biomarcadores P16 y Ki67; en la tabla N° 25 se presenta. la sensibilidad de la doble tinción en citología de frotis cervical de 74.56%, y la especificidad de 93.42%.

Tabla 24. Índices de correlación entre los tipos de citología con tinción Pap, doble tinción e impresión colposcópica.

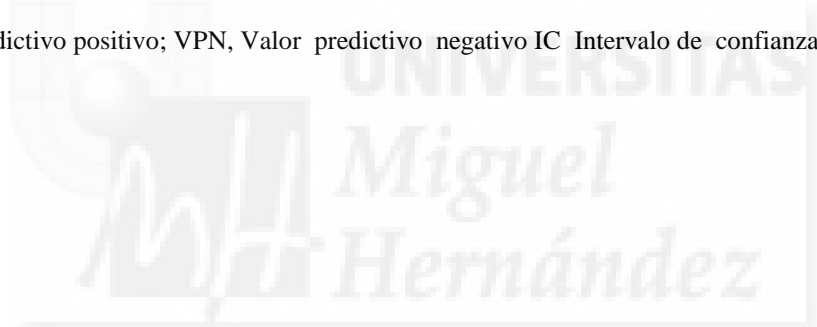
<u>Entre citología tinción Pap y/el:</u>	<u>Índice Correlación Tau b de Kendall</u>
Diagnostico final H&E	0.477*
Impresión colposcópica	0.567*
Diagnóstico final P16	0.475*
<u>Entre citología doble tinción y/el:</u>	
Diagnóstico final P16	0.709*
Impresión colposcópica	0.434*
Diagnóstico final H&E	0.507*
<u>Entre impresión colposcópica y:</u>	
Diagnóstico final H&E	0.687*
Diagnóstico final P16	0.498*

\*El coeficiente de correlación significativo ( $p < 0.0001$ )

Tabla 25 Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la tinción P16 y Ki67 en citología según la tinción P16 en biopsias y en conos cervicales.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
	Valor %	Valor%	Valor%	Valor %
	IC 95%	IC95%	IC95%	IC95%
Tinción P16 y Ki67 en Citología	74.56 66.13-82.99	93.42 87.19-99.65	94.44 89.16-99.73	71.00 61.61-80.39

VPP, Valor predictivo positivo; VPN, Valor predictivo negativo IC Intervalo de confianza.



## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El presente estudio se realizó con muestras de 190 pacientes que asistieron a la Unidad de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología de Guatemala INCAN.

La edad en años promedio de las mujeres fue de  $41 \pm 13.9$  años, lo que en países más desarrollados parece una edad algo alta para este tipo de lesiones y más coincidente con el diagnóstico ya de cáncer en dichas áreas. Quizás habría que analizar si como parece puede deberse a que el promedio de edad de las mujeres a las que se realiza cribado en Guatemala es mayor que en otros países, pero esto escapa a los objetivos y posibilidades de esta tesis.

En nuestro grupo de estudio, las lesiones iguales ó mayores a LEIAG reportadas por citología convencional (tinción Papanicolaou) fueron 104 (54.74%) y menores a LEIAG fueron 86 (45.26%), y quizás también esto sugiere lo anterior.

Por tanto, las mujeres incluidas en nuestra investigación eran mujeres remitidas por el hallazgo de alteraciones citológicas que en algo más de la mitad de los casos se trataban de alteraciones sugerentes de lesión de alto grado o más.

Teniendo en cuenta que objetivo principal de nuestro estudio fue evaluar la validez y confiabilidad de la inmunohistoquímica IQ con P16 Ki67 en citología con extendidos o frotis cervicales y la IQ p16 en histología de biopsias y conos cervicales, cabe pensar que el grupo de estudio era apropiado, pues presentaba todo el espectro de alteraciones citológicas que requieren estudio, con gran proporción de altos grados o lesiones más avanzadas. Ello debía permitirnos definir el posible papel que la doble tinción podría tener para mejorar el rendimiento y los costes del cribado citológico y sus pruebas derivadas.

Un primer hallazgo en la comparación de los resultados de la interpretación de los dos tipos de citología, (tinción convencional o pap y doble tinción con IQ P16Ki67), es que hubo diferencias especialmente en los diagnósticos citológicos de ASCUS y LEIBG.

Efectivamente, al comparar las interpretaciones citomorfológicas en ambos tipos de citología, se observa que especialmente en los casos menores a LEIAG fueron diferentes los resultados entre citología con tinción convencional y doble tinción: ASCUS 27/190 (14.21%) y 4/190 (2.11%); LEIBG 54/190 (28.42%) y 24/190 (12.63%) respectivamente. Siendo por lo tanto la diferencia para ASCUS de 12% y LEIBG de 16%. Si estimamos que en esa discordancia, la más certera es la citología con doble tinción (lo que debemos valorar según concordancia con histología), el empleo de esta técnica de cribado habría evitado un 25% de ampliación del estudio al tratarse de bajo grado, con el que podría de entrada realizarse seguimiento inicial, o eventualmente colposcopia para determinar el siguiente paso.

Sin embargo, para las lesiones iguales o mayores a LEIAG hubo una diferencia global de 4 %, que se antoja pequeña, pero también menor en tinción dual, lo que podría sugerir que detecta menos casos (menor sensibilidad) o como parece mostrar la correlación histológica, que tiene menos falsos positivos.

Por tanto, en el presente estudio se observa que el motivo de referencia a colposcopia, y sobre todo a biopsia, podría disminuir si a las pacientes con citologías < LEIAG se les realizara la citología con tinción dual. De hecho, este planteamiento fue el utilizado por Alves et. al. (101) que repitieron la citología en pacientes con ASCUS y LEIBG habiendo diferencia en 4 y 7% respectivamente.

Al comparar los resultados de cada tipo de citología respecto a la histología por tinción hematoxilina y eosina H&E y por P16 se obtuvo diferencias en sensibilidad, especificidad,

valor predictivo positivo VPP y valor predictivo negativo VPN, que discutiremos a continuación:

- El presente estudio reporta una sensibilidad para detectar cambios citomorfológicos correspondientes a lesiones mayor o igual a LEIAG con la citología del frote cervical con tinción convencional y con doble tinción de 78.64%; y 78.95% respectivamente. Por tanto, el valor de sensibilidad en ambas citologías fue similar; en un metaanálisis de Lee KR et Al.(42), que revisó 24 artículos, la sensibilidad en citologías convencionales fue del 65 %. Ello sugiere que en nuestro medio la sensibilidad es más alta, sin embargo, hay que considerar que nuestro estudio fue realizado en pacientes referidas a la Unidad de Colposcopia con resultado de citología mayor ó igual a ASCUS. Por tanto, para detectar LEIAG o más (que es lo clínicamente relevante) la sensibilidad de la tinción dual fue similar a la convencional.
- Pero la especificidad fue diferente. La citología de doble tinción presentó una especificidad de 94.74 % frente a 75.86% de la citología con tinción convencional.
- Además, y en relación con ello, se calcularon los casos falsos positivos, es decir citologías interpretadas de lesiones mayor o igual a LEIAG que no se confirmaron en el estudio histológico (biopsias y conos menor a LEIAG) y fueron para doble tinción y convencional, 4/76(5.26%) y 20/86 (23.25%) respectivamente. Por tanto, esta técnica habría evitado sin riesgo la ampliación del estudio en un 18% de nuestros casos.

Estudios comparables, como el de Murphy et al. 2003(85), refieren una especificidad similar, teniendo un valor de 95.7%, y reportan que la tasa de falsos positivos para citología convencional es de 30%. Esta última es algo superior a la

nuestra, pero de nuevo hay que considerar que nuestra muestra tenía más de un 50% de mujeres con lesión de alto grado o más.

Otro aspecto de interés es la reproducibilidad interobservador de la técnica, pues una buena concordancia muestra una simplificación y una mayor coherencia y seguridad del diagnóstico. En este sentido, la reproducibilidad interobservador de la tinción P16 y Ki67 en citología de frotis cervicales se refleja en el índice de concordancia con Kappa ponderado que fue de 0.66 a 0.83(calificable de bueno);en un estudio similar pero en base líquida Wentzensen et. al. 2014 reporta que fue del 0.65 a 0.81.(102), enteramente similar a lo hallado por nosotros.

Así mismo fue evaluada la doble tinción según si hubo la reacción positiva o negativa respecto al diagnóstico final en histología en tinción P16; La sensibilidad y especificidad en este análisis fue de 74.56% IC 95% (66.13 – 82.99) y 93.42% IC 95% (87.12 –99.65) respectivamente y el VPP y VPN 94.44 % IC 95% (89.16-99.73) y 71% IC 95% (61.61-80.39) respectivamente.

En un estudio con mayor número de muestras derivado de Primary ASC-US and LSIL Marker Study (PALMS) Ikenber H et. al. (79) se indica que la sensibilidad y especificidad en citología convencional es de 85.0 IC 95%(75.4 a 91.3) y 95.7 IC 95% (95.3 a 96.1) respectivamente.

La doble tinción corroboró la mayoría de las lesiones  $\geq$ LEIAG en citología convencional, (correlación significativa  $p < .0001$ ); efectivamente, de las citologías  $\geq$  a LEIAG fueron positivas 85/90 (94.44%) y además la doble tinción detectó algunas LEIAG entre las lesiones  $<$  de LEIAG calificadas así por la citología convencional 5/90 (5.56%). En un



estudio con citología de base líquida, Doná et. al 2012 (77) reportaron que hay 79 - 90% de positividad en citologías  $\geq$  a LEIAG.

Por otro lado, algunas fueron negativas, y es probable que se trate de algunas lesiones que involucionen eventualmente, pero el presente estudio por su diseño y objetivos no permite comprobarlo.

Algunas citologías con resultados AGUS, ASCUS y LEIBG presentaron positividad con la doble tinción, y esto podría deberse a que en ellas está presente el virus del papiloma humano de alto riesgo VPH AR iniciando la transformación de la célula; Ello puede alertar al clínico de la presencia de una posible lesión que se encontrará en la biopsia dirigida por colposcopia. En nuestro estudio se encontraron incluso células con carcinoma adenocarcinoma teñidas en 3 de las 6.

En la histología se evaluó la tinción P16 con respecto al índice de concordancia interobservador o de acuerdos entre patólogos, el cual como hemos expuesto es importante debido a que evalúa la confiabilidad y certeza de la prueba. En este estudio se comprobó que el índice Kappa ponderado de 3 patólogos para la interpretación histomorfológica, de biopsias y conos cervicales con tinción P16 está entre 0.83-0.89 y 0.76-0.90 respectivamente; esta concordancia es considerada de buena a muy buena, con significancia ( $p < .0001$ ). En un estudio similar, Bergeron C et. Al(88), evaluó el Índice de Concordancia dando un promedio de 0.899 para biopsias y conos cervicales.

Entrando en detalle al comparar los resultados de conos, con tinción H&E y P16, se observa que en 3 conos con p16 se reclasifican de microinvasivos a invasivos. Esto puede ser relevante al influir en el manejo quirúrgico de la paciente para su tratamiento definitivo. Los datos podrían tomarse en cuenta para realizar un estudio con una muestra más representativa.

También en nuestro estudio decidimos analizar dos grupos, según si eran menores o mayores de 30 años, debido a que las pruebas moleculares como VPH AR tienen mayor utilidad en el grupo de pacientes mayores de 30 años ya que las lesiones  $\geq$  LEIAG son detectadas en mayor porcentaje y con mayor probabilidad de integración viral en una mujer con tipificación positiva para VPH AR a mayor edad.

Cuando evaluamos a la doble tinción en menores de 30 años, la citología presentó una sensibilidad y especificidad del 41.67% y 95.83% respectivamente; Sin embargo, en el grupo  $>$  de 30 años la sensibilidad y especificidad fue de 78.43% y 95.24% respectivamente.

Estos datos son comparables con los de un estudio realizado por Ordi et. al.(78)el cual demostró que en pacientes menores de 30 años la sensibilidad y especificidad fue de 78% y 91% respectivamente; y en mayores de 30 años la sensibilidad y especificidad fue de 86.5 y 94.8% respectivamente. La especificidad es similar en nuestro estudio y es probable que la sensibilidad sea más limitada porque el número de casos con lesiones mayores a LEIAG fue mucho menor entre las mujeres que nos derivaron con menor edad.

Nos parecen muy destacables los índices de correlación hallados entre los resultados de cada método de tamizaje o diagnóstico. En nuestro estudio utilizamos el Índice de correlación Tau b de Kendall, que evalúa la correlación entre variables ordinales con una significancia  $<.05$ . Dentro de las correlaciones según el tipo de tinciones de las citologías se demuestra una buena correlación entre citología con doble tinción y diagnóstico final con P16 ( $0.709 = p.0001$ ). Curiosamente con respecto a la doble tinción e impresión colposcópica, y como aspecto novedoso, la correlación fue 0.434 moderada, menor que la de la citología con tinción convencional que fue de 0.567, y ello sugiere que la tinción dual

detecta aspectos de la patología que se relacionan mejor con los cambios histológicos (que es realmente lo importante) que con los hallazgos colposcópicos.

Respecto a la correlación existente entre la doble tinción de las células en citología alteradas ó transformadas respecto al grado de lesión del cérvix. La fortaleza se demuestra en la alta especificidad (93.42%) y valor predictivo positivo (94.44%) Ver Tabla 25; ya que a mayor grado de lesión celular se expresa mayormente las proteínas P16 y Ki67. La sensibilidad es menor ya que hubo algunos casos de LEIAG y cáncer invasivo que no se tiñeron las células en especial las de origen glandular como se pudo observar en la Tabla N° 18.

Según nuestro estudio el empleo de estas tinciones podría afectar positivamente en dos situaciones clínicas: 1) Disminuyendo las referencias a colposcopia en un 25%, en las pacientes con resultados de citologías convencionales con: ASCUS, AGUS ó LEIBG. Y 2) disminuyendo los casos falsos positivos, cuando hay disociación citología respecto a histología, en nuestro estudio disminuyó el 18% de casos. En gastos se pudo evitar en total 7,760 euros (80€/paciente) para las referencias a colposcopias y 8,500 € (250€/paciente) al disminuir los falsos positivos.

## 6. CONCLUSIONES.

La citología de frote o extendido cervical con doble tinción con P16 y Ki67 tiene similar sensibilidad respecto a la citología convencional, lo que hace pensar en tasas de detección similares.

La citología de frote o extendido cervical con doble tinción con P16 y Ki67 tiene mayor especificidad respecto a la citología convencional, lo que puede resultar de interés clínico al reducir la ampliación de estudios innecesarios.

La citología con doble tinción tuvo buena concordancia o acuerdos entre los evaluadores (correlación altamente significativa).

La histología con tinción P16 tuvo muy buena concordancia con el diagnóstico histológico convencional, mayor que la citología con doble tinción con una  $p < 0.0001$

La sensibilidad y el VPP de la doble tinción en la citología de frote o extendido cervical fue mayor en muestras de pacientes mayores de 30 años de edad sugiriendo mayor utilidad en este grupo.

Existe moderada correlación entre resultados de citología con doble tinción P16 y Ki67 y la impresión colposcópica. Pero existe buena correlación entre resultados de citología con doble tinción P16 y Ki67 y los tipos de lesiones cervicales de histología con tinción P16; con una  $p = 0.0001$ , y esto es lo verdaderamente importante.

Existe alta especificidad de la doble tinción P16 y Ki67 en las citologías de frotis cervicales, lo cual mejora la identificación de los casos realmente que no presenten LEIAG ni cáncer invasivo, disminuyendo los falsos positivos.

## 7. RECOMENDACIONES Y POSIBLE APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO.

Debido a que la citología con doble tinción P16 Ki67 tiene alto índice de especificidad, disminuye los casos falsos positivos es decir el número de las citologías que sobre diagnostican las lesiones del cérvix, dicha prueba se podría aplicar en los casos en los que haya discrepancia entre la citología cervical y la biopsia, previo a realizar una conización diagnóstica del cérvix. Ello podría evitar preocupaciones e intervenciones innecesarias con sus costes y riesgos derivados.

Otra posible utilidad, si no se puede emplear como cribado, sería utilizar la tinción dual para discernir mejor qué casos requieren ampliar estudio y qué otros pueden manejarse con control expectante.

Dicha prueba de doble tinción P16 Ki67, previamente a incluirlo en el protocolo de manejo de la Unidad de Colposcopia del INCAN, debe ser evaluada su utilidad específicamente en un mayor número de casos en que haya discrepancia o no correlación entre pruebas de citología de exfoliado cervical y biopsia cervical; para obtener así más pruebas de su posible utilidad clínica.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Jemal Ahmedin, Bray Freddie, Center Melissa, Ferlay, Ward Elizabeth FD. Global cancer statistics. ... A cancer J Clin [Internet]. 2011 [cited 2012 Jul 29];61(2):69–90. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/canjclin.49.1.33/full>
2. Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. Salud Publica Mex [Internet]. 2003 Jan;45 Suppl 3(1):S306–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14746023>
3. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med [Internet]. 2003 Feb 6;348(6):518–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248389>
4. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). Br J Cancer [Internet]. 2005 Jun 20 [cited 2012 Mar 11];92(12):2195–200. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361820&tool=pmcentre z&rendertype=abstract>
5. Nikolaos P. Polyzos MD, Antonis Valachis MD, Davide Mauri MD JPAIM. Papanicolaou test. Can Med Assoc. 2011;183(6):337–43.
6. Larios. Correlación citológica-colposcópica e histológica de lesiones de bajo y alto grado en cérvix. Rev Hosp Gral Dr M [Internet]. 2006 [cited 2012 Jul 12];7(2):54–8. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/h-gea/gg-2006/gg062b.pdf>
7. Cioc A, Julius C. Cervical biopsy/cytology correlation data can be collected prospectively and shared clinically. Diagnostic ... [Internet]. 2002 [cited 2014 May 4];26(1):49–52. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dc.10036/abstract>
8. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results

with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jun 1 [cited 2012 Mar 20];121(3):505–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420158>

9. Torre L a, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(00):1–22.
10. Govindappagari S, Schiavone MB, Wright JD. Cervical Neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*. 2011;54(4):528–36.
11. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002 May [cited 2012 Mar 12];2(5):342–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010>
12. Carrillo A, C M, Mohar A, Meneses A, Carrillo A, Mohar A, et al. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Publica Mex*. 2004;46(1).
13. Stubenrauch F, Iftner T. Molecular basis of cervical neoplasia. In: Singer JAJ and A, editor. *The Cervix: Second Edition*. Second. Blacwell; 2006. p. 277–88.
14. DiMaio D. Papillomavirus E5 Proteins. *The papillomaviruses* [Internet]. 2007 [cited 2012 Jul 29];3(8):82–96. Available from: <http://www.springerlink.com/index/p8148035q1552730.pdf>
15. Tjiong MY, Out T a, Ter Schegget J, Burger MP, Van Der Vange N. Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract: a review. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2001;11(1):9–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11285028>
16. Schwarz Elizabeth KU. *Nature*. 1985;314(7):111–4.
17. Jones DL, Alani RM, Mu K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by

abrogating p21 Cip1 -mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;2:2101–11.

18. Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Aug 17;96(17):9557–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123627>
19. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA, et al. p16 INK4a Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia : A Comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Pathology.* 2003;0–8.
20. Aslani FS. Evaluation of Ki67 , p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. *Iran J Med Sci.* 2013;38(January 2012):15–21.
21. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 May [cited 2012 Mar 16];117(2 Suppl):S5–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304221>
22. Song S, Lee J, Lee N, Saw H, Kang J, Lee K. Interferon- $\gamma$  ( IFN- $\gamma$  ): A possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus ( HPV ). *Gynecol Oncol.* 2008;108:543–8.
23. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001;20(54):7874–87.
24. Song S-H, Lee J-K, Seok O-S, Saw H-S. The relationship between cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2012 Mar 12];104(3):732–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17188341>
25. Reznikoff C a., Belair C, Savelieva E, Zhai Y, Pfeifer K, Yeager T, et al. Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV16 E7-, but not E6-, immortalized human uroepithelial cells. *Genes Dev.* 1994;8(18):2227–40.



26. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999;59(24):6132–6.
27. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, et al. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2012 Apr 8];104(1):207–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046054>
28. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* [Internet]. 2001 Apr 15;92(2):276–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11291057>
29. Atkins K. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: p16/Ki-67 in cervical papanicolaou Tests. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2011 Jun 25 [cited 2012 Mar 2];119(3):145–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442766>
30. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer a L, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of p16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma: Pilot Studies. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2011 Aug 25 [cited 2012 Mar 2];(November 2010):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162342>
31. Eroglu S., Toprak S., Urgan O, MD, Ozge E. Onur, MD, Arzu Denizbasi, MD, Haldun Akoglu, MD, Cigdem Ozpolat, MD, Ebru Akoglu M. El doctor George N. Papanicolaou (1883-1962) pionero de la citología. *Saudi Med J.* 2012;33:3–8.
32. Flannelly G. Preinvasive Diseases of the Cervix, Vagina, and Vulva [Internet]. *Gynecologic Cancer: Controversies in Management.* Elsevier Ltd; 2004. 79-93 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-443-07142-3.50009-9>
33. Harmon ML, Cooper K. PATHOGENESIS OF PRECURSOR LESIONS [Internet]. First Edit. *Gynecologic Pathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology.* Elsevier Inc.; 2009. 141-196 p. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-443-06920-8.50009-2>

34. Peirson L, Fitzpatrick-Lewis D, Ciliska D, Warren R. Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* [Internet]. *Systematic Reviews*; 2013;2(1):35. Available from:  
<http://www.systematicreviewsjournal.com/content/2/1/35>
35. Jacobs M V, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B, et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol* [Internet]. 1999 Jul;52(7):498–503. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=501489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Nanda K, Mccrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow up of cervical cytologic abnormalities a systematic review. 2000;
37. Al F et. Meta-Analysis of Pap Test Accuracy. *Am J Epidemiol*. 1996;141(1):1–2.
38. Coste J, Cochand-priollet B, Cremoux P De, Galès C Le, Cartier I, Molinié V, et al. testing for cervical cancer screening. 2003;326(April):1–5.
39. Mattosinho de Castro Ferraz MDG, Nicolau SM, Stávale JN, Focchi J, Castelo A, Dôres GB, et al. Cervical biopsy-based comparison of a new liquid-based thin-layer preparation with conventional Pap smears. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2014 May 4];30(4):220–6. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15048954>
40. Cummings MC, Marquart L, Pelecanos AM, Perkins G, Papadimos D, O'Rourke P, et al. Which are more correctly diagnosed: Conventional Papanicolaou smears or Thinprep samples? A comparative study of 9 years of external quality-assurance testing. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2015;123(2):108–16. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/cncy.21498>
41. Trial a RC. Cytologic Detection of Cervical Abnormalities Using Liquid-Based.

Obstet Gynecol. 2008;112(6):1327–34.

42. Lee KR, Ashfaq R, Birdsong GG, Corkill ME, McIntosh KM, Inhorn SL. Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin-layer system for cervical cancer screening. *Obstet Gynecol.* 1997;90(97):278–84.
43. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer PJJM, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with Liquid Compared With Conventional Cervical Cytology A Systematic Review and Meta-analysis. *Obs Gynecol.* 2008;111(1):167–77.
44. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA.* 2001;285(11):1500–5.
45. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, 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. *Am J Clin Pathol [Internet].* 2012 Apr [cited 2012 Apr 8];137(4):516–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431528>
46. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA [Internet].* 2001 Mar 21;285(11):1500–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255427>
47. Jeronimo J, Schiffman M. Colposcopy at a crossroads. *Am J Obstet Gynecol [Internet].* 2006 Aug [cited 2012 Jun 19];195(2):349–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677597>
48. Moss EL, Byrom J, Owen G, Pearmain P, Douce G, Todd R, et al. Multidisciplinary Colposcopy Clinicopathology Correlation Meetings: An Activity Review. *J Low Genit Tract Dis.* 2009;13(3):169–73.
49. Bewtra C, Pathan M, Hashish H. Abnormal Pap smears with negative follow-up biopsies: improving cytohistologic correlations. *Diagn Cytopathol [Internet].* 2003

Oct [cited 2014 May 2];29(4):200–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506671>

50. Sidawy MK, Siriaunkgul S, Frost a R. Retrospective analysis of non-correlating cervical smears and colposcopically directed biopsies. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 1994 Dec;11(4):343–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7895572>
51. Jordan JA, Singer A. Colposcopy. In: Jordan, Joseph a singer, editor. *The Cervix: Second Edition*. 2nd ed. Blackwell publishing; 2006. p. 445–61.
52. Chase DM, Kalouyan M, Disaia PJ. Colposcopy to evaluate abnormal cervical cytology in 2008. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. Mosby, Inc.; 2009;200(5):472–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.12.025>
53. Hopman H. Ellen., Voorhorst F. Colposcopia interp de imagenes observer Agreement.pdf. 1994. p. 206–9.
54. Hammes LS, Naud P, Passos EP, Matos J, Brouwers K, Rivoire W, et al. Value of the International Federation for Cervical Pathology Cervical Disease. *J Low Genit Tract Dis*. 2007;11(3):158–65.
55. Benedet J. An analysis of 84,244 patients from the British Columbia cytology–colposcopy program. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2004 Jan [cited 2012 Mar 11];92(1):127–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825803007029>
56. Michele Follen Mitchell, David Schottenfeld, Guillermo Tortolero-Luna SBC and RR-K. Colposcopy for the dignosis of squamous intraepithelial lesions: A Metaanalysis. *Obstet Gynecol*. 1998;91(4):626–31.
57. Cai B, Ronnett BM, Stoler M, Ferenczy A, Kurman RJ, Sadow D, et al. Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2007 Dec;31(12):1854–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043039>

58. Miroschnichenko GG, Parva M, Holtz DO, Klemens J a, Dunton CJ. Interpretability of excisional biopsies of the cervix: cone biopsy and loop excision. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2009 Jan;13(1):10–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098600>
59. Pyne MT, Law C, Hillyard DR, Schlaberg R. Testing and Genotyping of High-Risk Human Papillomavirus by the cobas HPV Test and the Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test Using Cervical and Vaginal Samples. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014;52(5):1720–3. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.03308-13>
60. Force MVPST, Practice P. Clinical Guideline. *Ann Intern Med*. 2013;156(122):880–92.
61. Ki EY, Kim HE, Choi YJ, Park JS, Kang CS, Lee A. Comparison of the Cobas 4800 HPV test and the Seeplex HPV4A ACE with the hybrid capture 2 test. *Int J Med Sci*. 2012;10(2):119–23.
62. Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: The predictors 2 study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1867–73.
63. Depuydt CE, Benoy IH, Beert JF a, Criel a. M, Bogers JJ, Arbyn M. Clinical validation of a type-specific real-time quantitative human papillomavirus PCR against the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):4073–7.
64. Luu HN, Dahlstrom KR, Mullen PD, VonVille HM, Scheurer ME. Comparison of the accuracy of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction in detecting clinically important cervical dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med* [Internet]. 2013;2(3):367–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3699849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

65. Comar M, Iannacone MR, Casalicchio G, McKay-Chopin S, Tommasino M, Gheit T. Comparison of hybrid capture II, linear array, and a bead-based multiplex genotyping assay for detection of human papillomavirus in women with negative pap test results and atypical squamous cells of undetermined significance. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):4041–6.
66. Phillips S, Garland SM, Tan JH, Quinn M a., Tabrizi SN. Comparison of the Roche Cobas® 4800 HPV assay to Digene Hybrid Capture 2, Roche Linear Array and Roche AmpliCor for Detection of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes in Women undergoing treatment for cervical dysplasia. *J Clin Virol [Internet]. Elsevier B.V.;* 2015;62(2015):63–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653214004259>
67. Perez C a, Perry W. Immunohistochemistry and immunology of the Cervix : In: Jordan, Joseph a SA, editor. *The Cervix: Second Edition.* 2nd ed. Blackwell publishing; 20016. p. 49–61.
68. Brown C a, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol [Internet].* 2012 Jan [cited 2012 Apr 15];2012:289315. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3317214&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Bulten J, van der Avoort I a M, Melchers WJG, Massuger LF a G, Grefte JMM, Hanselaar AGJM, et al. p14ARF and p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol [Internet].* 2006 Jun [cited 2012 Mar 2];101(3):487–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406113>
70. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, Becattini V, Cariaggi MP, Pontenani G, et al. Role of P16(INK4a) expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer [Internet].* 2006 Apr 25 [cited 2012 Mar 2];108(2):119–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16411180>

71. Christal JL, Valente PT. The Utility of p16 Immunohistochemistry in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathol Case Rev* [Internet]. 2006 May [cited 2012 Mar 16];11(3):117–20. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00132583-200605000-00004>
  
72. Leary JJO, Astbury K, Prendiville W. Tumour markers in cervical cancer- I. In: Jordan, Joseph a AS, editor. *The Cervix: Second Edition*. 2nd ed. Blackwell publishing; 2006. p. 399–413.
  
73. 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* [Internet]. 2005 Jan [cited 2012 Apr 8];32(1):21–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584047>
  
74. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodríguez-Carunchio L, Torné A, del Pino M. Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2013 Nov 7 [cited 2014 Jan 6];2:pendiente. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncy.21366>
  
75. 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* [Internet]. 2011 Jun 25 [cited 2012 Mar 17];119(3):158–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442767>
  
76. Bigras G, Marval F De. The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load : results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13 842 women. *Br J Cancer*. 2005;93(5):575–81.
  
77. Donà 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* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 May 12 [cited 2012 May 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588180>



78. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodríguez-Carunchio L, Torné A, Del Pino M. Usefulness of p16/ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol*. 2014;122(March):227–35.
79. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2013 Oct 16 [cited 2013 Dec 13];105(20):1550–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3814411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
80. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold M a, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2013 Feb 10];18(15):4154–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675168>
81. Bao H, Wu Y. p16INK4A and Ki-67 immunostaining on cell blocks from residual ThinPrep material is helpful in identifying significant preneoplastic cervical lesions. *Pathol Res Pract* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2011 Apr 15 [cited 2012 Mar 2];207(4):216–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440378>
82. Galgano MT, Castle PE, Atkins K a, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2010 Aug;34(8):1077–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2921638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G, Buonocunto-Vázquez G, Rosales-Quintana S, Wentzensen N, et al. P16INK4a immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2012 Mar 2];111(1):120–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692882>
84. Dijkstra MG, Heideman D a M, de Roy SC, Rozendaal L, Berkhof J, van Krimpen K, et al. p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol* [Internet]. 2010 Nov



[cited 2013 Feb 1];63(11):972–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924035>

85. Murphy N, Ring M, Killalea a G, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* [Internet]. 2003 Jan;56(1):56–63. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1769860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* [Internet]. 2007 Feb [cited 2011 Nov 28];39(1):97–111. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17365826>
87. Gupta Nalini, Srinivasan Radhika R. Functional Biomarkers in Cervical Precancer : *Diagn Cytopathol*. 2009;38(8):618–23.
88. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2012 Mar 16];133(3):395–406. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154278>
89. Bennett BB, Stone IK, Anderson CD, Wilkinson EJ. Gynecology Deep loop excision for prehisterectomy endocervical evaluation. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;176:82–6.
90. del Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A, et al. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. Mosby, Inc.; 2009 Nov [cited 2012 Mar 1];201(5):488.e1–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683687>
91. Young NR. The effect of loop electrosurgical excision procedure on the subsequent risk of preterm delivery Nicole Rae Young The University of Toledo 2010. 2010;

92. Giacalone PL, Laffargue F, Aligier N, Roger P, Combecal J, Daures JP. Randomized study comparing two techniques of conization: cold knife versus loop excision. *Gynecol Oncol* [Internet]. 1999 Dec;75(3):356–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600289>
  
93. Ferenczy A, Choukroun D, Arseneau J. Loop Electrosurgical Excision Procedure for Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix : Advantages and Potential Pitfalls. *Obstet Gynecol*. 1996;7844(95):332–7.
  
94. El-Nashar S, Hopkins M, Cliby W, Famuyide a. Can LEEP replace cold knife conization for the management of cervical intraepithelial neoplasia in women with unsatisfactory colposcopic examination? A systematic review and a meta-analysis. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Mar [cited 2012 May 17];120(2011):S105–S105. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825810011339>
  
95. Lewis PL. Electrosurgical Loop Conization in the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstet Gynecol*. 1994;10:229–34.
  
96. Lanneau GS, Skaggs V, Moore K, Stowell S, Zuna R, Gold MA. Is Rarely Indicated for a Two-Step Discrepancy. *J Low Genit Tract Dis*. 2007;11(3):134–7.
  
97. Huang LW, Hwang JL. A comparison between loop electrosurgical excision procedure and cold knife conization for treatment of cervical dysplasia: residual disease in a subsequent hysterectomy specimen. *Gynecol Oncol* [Internet]. 1999 Apr;73(1):12–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10094873>
  
98. Emam M, Elnashar A, Shalan H, Barakat R. Evaluation of a single-step diagnosis and treatment of premalignant cervical lesion by LEEP. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. International Federation of Gynecology and Obstetrics; 2009 Dec [cited 2012 Aug 2];107(3):224–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732893>
  
99. Livasy C a, Moore DT, Van Le L. The clinical significance of a negative loop electrosurgical cone biopsy for high-grade dysplasia. *Obstet Gynecol*. 2004;104(2):250–4.

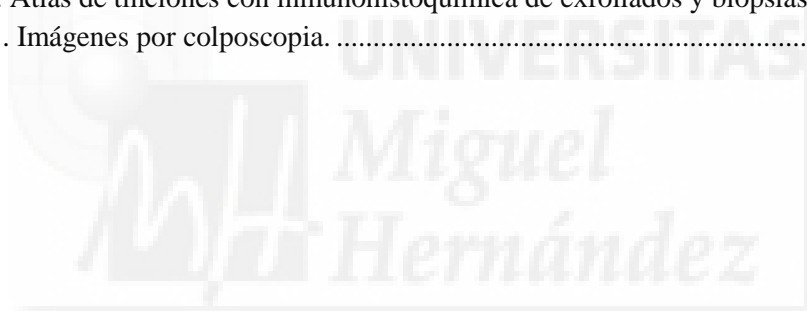
100. López A, Galparsoro DU, Fernández P. Medidas de concordancia : el índice de Kappa. *Cad Aten Primaria*. 2001;2–6.
101. Alves R. Usefulness of repeat cytology at the time of first colposcopy. *Diagnostic ...* [Internet]. 2009 [cited 2014 May 4];37(1). Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dc.20976/abstract>
102. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2014;(December). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132656>



## 9. ANEXOS

### Índice de anexos

Anexo 1. Cartas de colaboración. ....	114
Anexo 2. Informe por paciente del estudio de citología exfoliativa. ....	118
Anexo 3. Informe de histología.....	119
Anexo 4. Instrucciones de la toma de muestra del cérvix para citología. ....	120
Anexo 5. Boleta de información a la paciente .....	121
Anexo 6. Consentimiento informado .....	124
Anexo 7. Ficha de recolección de datos de colposcopia y estudios.....	125
Anexo 8 Instrucciones del kit Cintec Plus .....	126
Anexo 9. Base de datos de pacientes en Excel.....	135
Anexo10. Atlas de tinciones con inmunohistoquímica de exfoliados y biopsias cervicales. .	136
Anexo 11. Imágenes por colposcopia. ....	140



Anexo 1. Cartas de colaboración.

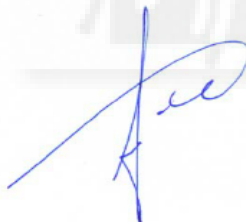
De: la facultad de medicina de Barcelona Hospital Clinic- Dr. Jaume ordi. Facultad de ciencias médicas USAC (laboratorio de investigaciones biomédicas) y unidades de colposcopia y patología del INCAN.

	 UNIVERSITAT DE BARCELONA	Facultat de Medicina Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia Casanova, 143 08036 BARCELONA	 Health Universitat de Barcelona Campus Dr. Jaume Ordi Tel. +34 93 227 5450 Fax. +34 93 227 5717 <a href="mailto:jordi@clinic.ub.es">jordi@clinic.ub.es</a>
---	---	--	--

Dr. Alberto García González  
Universidad San Carlos de Guatemala

Querido Dr . García,

Por la presente te comunico que será un placer apoyarte en tu proyecto del Test Dual P16 y Ki67 en frotos citológicos, mediante el procesamiento de las muestras y su interpretación en nuestro laboratorio. En nuestro laboratorio dicha técnica está incorporada en la rutina diaria y tenemos una larga experiencia en su interpretación. Recibe un cordial saludo.



Jaume Ordi, M.D., Ph.D.  
Profesor de Anatomía Patológica  
Departamento de Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona  
Hospital Clinic  
Villarroel 170  
08036 Barcelona  
España  
Tel. +34 93 227 5450  
Fax +34 93 227 5717  
email: [jordi@clinic.ub.es](mailto:jordi@clinic.ub.es)



**LIGA NACIONAL CONTRA EL CÁNCER**  
INSTITUTO DE CANCEROLOGIA Y HOSPITAL DR. BERNARDO DEL VALLE S.  
6a. Avenida 6-58, Zona 11, Guatemala, C.A.  
PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 [www.ligacancergruate.org](http://www.ligacancergruate.org)



Guatemala, 5 de Julio 2012.

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente hacemos constar nuestra aceptación y colaboración para el trabajo de investigación del **DR. ALBERTO GARCIA GONZALEZ**, Titulado: *"CORRELACION CLINICA DEL TEST DE DOBLE TINCION P16 Y KI67 EN CITOLOGIA CERVICAL CON RESPECTO A COLPOSCOPIA, E HISTOLOGIA, SEGÚN EL TIPO DE LESION CERVICAL"*.

Dicha investigación será de gran valor, que beneficiara directamente a las pacientes, que asisten a la Unidad de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología. Para lo cual daremos el apoyo correspondiente en la ejecución del mismo.

La Supervisión directa de la ejecución del trabajo estará bajo mi cargo, velando por que se realicen los objetivos del proyecto y respetando los aspectos bioeticos de las pacientes.

Sin otro particular, se suscribe atentamente.

**DR. CARLOS ENRIQUE LOPEZ SANCHEZ**  
JEFE DE LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA Y PATOLOGIA CERVICAL  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA - INCAN

---

**EL CÁNCER SE PUEDE PREVENIR, NO LE TEMA... ¡COMBATALO!**




Guatemala, 8 de agosto del 2012.

A quién Corresponda

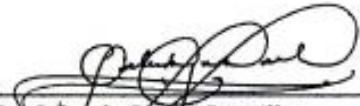
Por este medio hacemos constar que el personal del Laboratorio de Investigación Biomédica, de La Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dará apoyo para la ejecución del trabajo de Investigación del Dr. Alberto García González, titulada:

***"CORRELACION CLINICA DEL TEST DE DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN  
CITOLOGÍA CERVICAL CON RESPECTO A COLPOSCOPIA E HISTOLOGÍA,  
SEGÚN EL TIPO DE LESION CERVICAL"***

El apoyo consiste en: Procesamiento de muestras de exfoliados cervicales con el test de doble tinción P16 y Ki67. Así mismo en la interpretación de las muestras que serán procesadas con el Test de doble tinción P16 y Ki67.

  
Dra. Elisa Hernández de Rodas  
Directora del Laboratorio  
de Investigaciones Biomédicas



  
Dr. Orlando Rodas Pernillo  
Médico Patólogo  
Docente de posgrado patología





**LIGA NACIONAL CONTRA EL CANCER**

**INSTITUTO DE CANCEROLOGIA,  
Y HOSPITAL DR. BERNARDO DEL VALLE S.**

Ca. Avenida 6-58, Zona 11, Guatemala, C. A.



PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 [www.ligacancerguatemala.org](http://www.ligacancerguatemala.org)  
Guatemala 22 de agosto del 2012

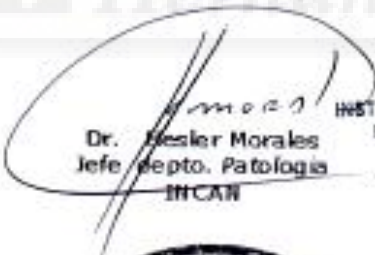
**Dr. Alberto García González**  
**Ginecología y Obstetricia**  
**Presente:**

**Estimado Dr. García:**

Por medio de la presente le comunico que será de gran placer apoyarle en la elaboración del proyecto del Test Dual P-16 Y KI 67, en Frotas Citológicas, mediante el procesamiento de las muestras y su interpretación en el laboratorio.

Esto nos servirá para proyectar en un futuro el uso de esta técnica en nuestro laboratorio.

Sin otro particular, atentamente,

  
Dr. Healer Morales  
Jefe depto. Patología  
INCAW

INSTITUTO DE CANCEROLOGIA  
Dr. Healer Morales  
Médico Patólogo  
Colegiado No. 2782



---

**EL CANCER SE PUEDE PREVENIR, NO LE TEMA...¡COMBATALO!**



Anexo 2. Informe por paciente del estudio de citología exfoliativa.

INTERPRETACIÓN CITOLOGIA TEST DUAL			
código	EDAD	Gestas	Anticoncepción

Informe de estudio Citología exfoliativa  
 Código de la muestra: \_\_\_\_\_  
 Citología tradicional  
 Citología con prueba de Inmunohistoquímica P16 y Ki67  
 Descripción de la calidad de la muestra  
 Satisfactoria  
 Satisfactoria pero limitada por \_\_\_\_\_  
 Insatisfactoria por \_\_\_\_\_  
 Presencia de Células endocervicales  
 Microorganismo observados  
 Cándida  
 Tricomonas  
 Gardnerella  
 Flora Bacteriana Mixta  
 Normal  
 Cambios Inflamatorios Leve\_\_ Moderado\_\_ Severo\_\_  
 Metaplasia  
 ASCUS ( Células Escamosas Atípicas de significado indeterminado)  
 AGUS ( Células Glandulares Atípicas de significado indeterminado)  
 LEIBG (Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado) ó NIC I/Coilocitosis  
 LEIAG (Lesión escamosa intraepitelial de alto grado) ó NIC II-III Ca Insitu  
 Carcinoma epidermoide Invasivo  
     Adenocarcinoma  
  
     Carcinoma Mixto

Observaciones adicionales: \_\_\_\_\_  
 Patólogo \_\_\_\_\_

\*Los criterios para considerar negativo una muestra es la ausencia completa de tinción, positividad focal si aparecen en células aisladas y positividad difusa cuando hay tinción mayor extensión ó área celular

TINCIÓN POSITIVA__
TINCIÓN NEGATIVA__

### Anexo 3. Informe de histología

---

código	EDAD	Gestas	Anticoncepción	Resultado Citología	Impresión Colposcópica
--------	------	--------	----------------	---------------------	------------------------

--	--	--	--	--	--

<b>Informe de Histología</b>	
Tipo de tinción	Hematoxilina Eosina
Tipo de muestra	Inmunohistoquímica P16
<ul style="list-style-type: none"><li><input type="radio"/> Biopsia</li><li><input type="radio"/> Biopsia y Legrado endocervical</li><li><input type="radio"/> Cono cervical</li></ul>	
Descripción:	_____
	_____
	_____
Diagnóstico	
<ul style="list-style-type: none"><li><input type="radio"/> Normal /negativo / cervicitis / Metaplasia</li><li><input type="radio"/> LEIBG(NIC I/Coilocitosis)</li><li><input type="radio"/> LEIAG (NIC II-III/ CA Insitu cervical)</li><li><input type="radio"/> Cáncer epidermoide microinvasivo</li><li><input type="radio"/> Cáncer epidermoide Invasivo</li><li><input type="radio"/> Adenocarcinoma</li><li><input type="radio"/> Carcinoma Mixto</li><li><input type="radio"/> Carcinoma Endócrino</li></ul>	
Médico Patólogo	_____

#### Anexo 4. Instrucciones de la toma de muestra del cérvix para citología.

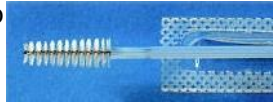
Equipo para la toma: \*Espéculo de plástico descartable

\* Cepillo endocervical descartable

\* Frasco con solución alcohol buferado

\* Guantes descartables

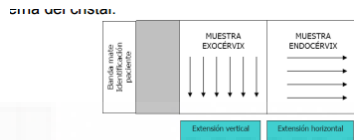
+ Paleta Ayre



**Condiciones de la Paciente:** Sin menstruación, no embarazada y estar 72 horas sin relaciones sexuales, ni haber tenido tratamientos Vaginales (gel, cremas ni óvulos)

**A la toma de la muestra:** Se coloca el espéculo, cuidadosamente tratando de no lastimar el cérvix, evitando así lesiones que produzcan sangrado. Se utiliza paleta de plástico de Ayre, se frota en el exocervix y después se frota en el portaobjeto en lado izquierdo.

Ver siguiente figura.



Extensión de las muestras.

Fuente: Figura tomada de: Programa de cribado de cáncer de cuello de útero en Osakidetza. 2008.

El cepillo endocervical se introduce en el canal endocervical, el resto de las hebras hacen contacto con el ectocérvix.



Al introducir la escobilla vía vaginal, se coloca la zona larga dentro del canal endocervical, luego se rota suavemente 3 vueltas en dirección a las manecillas del reloj.

La muestra se extiende en el tercio externo del portaobjetos, y se introduce con alcohol buferado.

La muestra obtenida podrá ser utilizada para realizar la citología con la prueba de Inmunohistoquímica P16y Ki67

## Anexo5. Boleta de información a la paciente

### **BOLETA**

#### Objetivo de la Investigación

Como parte de la evolución de la medicina la búsqueda de nuevos conocimientos es necesaria para el tratamiento de las enfermedades que afectan a las personas. En este estudio se necesita obtener una muestra del cuello de la matriz o cérvix, utilizando instrumentos descartables y estériles. A partir de esa muestra, la investigación busca realizar una prueba complementaria al papanicolaou, donde se podría detectar con mayor certeza lesiones premalignas del cáncer de cérvix. Dentro de las expectativas que se tienen de este estudio es poderla aplicar en un futuro para diagnosticar mejor y evitar el desarrollo de cáncer cervical.

El estudio está aprobado por La Unidad de Colposcopia del INCAN, La Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala y por el departamento de patología de la Universidad Clinic de Barcelona.

El estudio es coordinado por el Dr. Alberto García González. Profesor e investigador de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### Propósito

Evaluar una prueba diagnóstica que mejora la detección de células del cérvix que podrían llegar hasta cáncer. Esta prueba ayudará a los otros estudios como la colposcopia y la biopsia del cérvix

El procesamiento de las muestras del exfoliado del cérvix o llamado papanicolaou se utilizarán en la investigación llamada:

#### “EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN CITOLOGÍA DE FROTE CERVICAL E HISTOLOGÍA CON TINCIÓN P16”

- 2) El investigador dará los resultados al o los médicos a cargo de su caso y si usted lo solicita será notificada a través de ellos.
- 3) No serán entregadas los resultados a terceras personas.
- 4) La muestra y su procesamiento podrá conservarse hasta que sea de utilidad en el estudio. La investigación durará 24 meses a partir del 2013.
- 5) Los científicos investigadores no entregarán las muestras a ninguna tercera parte, cumpliendo con esto privacidad y confidencialidad.

#### Procedimiento

Se extraerá una sola muestra de exfoliado cervical, la cual se realizará con material descartable y desinfectado (estéril). Esta muestra se obtiene al iniciar la colposcopia, estudio por el que usted consultó a esta clínica. La muestra es similar a la de un

papanicolaou donde más adelante se observaran células coloreadas con reactivos especiales; por lo tanto las molestias son similares a la toma de un papanicolaou, siendo el dolor temporal el más frecuente.

Con éstas muestras se realizarán las pruebas de coloración, las cuales se llevarán a cabo en el laboratorio de Biomédica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de Patología de Universidad Clinic de Barcelona España, lo que avala la calidad de las mismas.

Esta muestra será enviada a los laboratorios mencionados y en 6 meses se tendrá su resultado .

#### Riesgos e incomodidades

Los riesgos del estudio son casi nulos en la paciente, ya que solamente se obtendrá una muestra de exfoliado cervical con material estéril y descartable.

#### Quienes pueden participar

Mujeres que son referidas a la Unidad de Colposcopia del INCAN, con un resultado de papanicolaou anormal. Que no haya tenido tratamiento de radioterapia, quimioterapia o conización cervical y que no esté embarazada.

#### Beneficios potenciales

Los beneficios por participar en este estudio pueden ser:

En un futuro aplicar una prueba más precisa en las mujeres Guatemaltecas, que consultan a colposcopia para complementar los estudios y detectar mejor las lesiones premalignas.

Aportar información para el médico tratante en la institución donde está siendo tratada.

Recibir información del estudio si así lo desea.

#### Alternativas

La única alternativa es no participar en el estudio. Al negarse a colaborar con el estudio no afecta la atención médica en esta institución donde esta siendo tratada.

#### **Costos financieros**

No hay gastos para usted por participar en este estudio.

Dudas pueden realizarla con el investigador ALBERTO GARCÍA GONZÁLEZ

Tel. 57152257

Si está interesada en participar favor leer y llenar la boleta que se le presenta a continuación. A las pacientes analfabetas se les leerá por el personal médico o por algún familiar que le acompañe.



Anexo 6. Consentimiento informado

Nombre de la paciente \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_ No de registro Médico \_\_\_\_\_

Institución a que pertenece \_\_\_\_\_

Con la firma de este documento, dejo constancia, yo \_\_\_\_\_, que he sido informada acerca del estudio que se realizará en las muestras que me tomaron previamente. He recibido además una copia de la información al paciente, sobre la investigación. El médico ha resuelto personalmente las dudas que he planteado con respecto a la investigación.

Además he sido informado del derecho que tengo de retirarme de este estudio, sin que afecte la atención médica dada por esta institución.

Autorizo al médico y equipo de investigación a recabar la información que requiere la ficha del estudio, manteniendo la confidencialidad de los datos. Acepto voluntaria y libremente participar en esta investigación.

\_\_\_\_\_  
Firma o huella de la paciente

\_\_\_\_\_  
Testigo/ enfermera(o) ò médico

Anexo 7. Ficha de recolección de datos de colposcopia y estudios

Registro de Colposcopia \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de la Paciente: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Antecedentes G.O. Gestas \_\_\_\_\_ Paras: \_\_\_\_\_ Cesáreas: \_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_ UR: \_\_\_\_\_

Anticonceptivo: \_\_\_\_\_

Nombre del examinador: \_\_\_\_\_

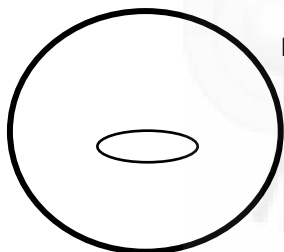
Indicación de la Colposcopia: (Resultado de citología) \_\_\_\_\_

**Estudios Previos**

Resultado de Citología Exfoliativa: \_\_\_\_\_ y/o

Biopsia: \_\_\_\_\_

Hallazgos Colposcópicos:



Leucoplaquia  Epitelio Acético Positivo  Ectopia

Punteado/Base  Mosaico  Vaso(s) Atípico(s)

Unión escamo columnar Visible  No visible

Otros

Observaciones \_\_\_\_\_

No de Biopsias en cérvix: \_\_\_\_\_ Legrado Endocervical

Impresión Colposcópica: \_\_\_\_\_

**Resultado Histología / Hematoxilina Eosina** No Registro de patología: \_\_\_\_\_



## Anexo 8. Instrucciones del kit Cintec Plus

### I. Nombre del producto

CINtec® PLUS Kit

### II. Uso previsto

Para uso en diagnóstico in vitro.

El CINtec® PLUS Kit es un ensayo inmunocitoquímico para determinar cualitativamente y de manera simultánea las proteínas p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en preparaciones citológicas cervicales.

El uso de este kit está previsto para laboratorios de citología. La interpretación de los resultados debe realizarla un profesional certificado basándose en la historia clínica del paciente y en otras pruebas diagnósticas realizadas.

### III. Resumen y explicación del dispositivo

#### Base científica

El control de la progresión de la división del ciclo celular eucariótico está efectuado por un complejo mecanismo de expresiones controladas y modificaciones postraduccionales (p. ej., fosforilación) de las proteínas que regulan el ciclo celular. La proteína p16<sup>INK4a</sup> tiene una función crucial en la regulación del ciclo celular eucariótico. Es parte del control mediado por la proteína retinoblastoma (pRB) de la transición de las fases G1 a S y provoca la detención del ciclo celular durante el proceso de diferenciación celular. Por lo tanto, p16<sup>INK4a</sup> tiene un efecto antiproliferativo cuando se expresa durante la progresión del ciclo celular. En células epiteliales terminales diferenciadas, la expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> se regula a niveles que normalmente no se pueden detectar mediante la inmunocitoquímica. [26;30]

Ki-67 es una proteína asociada con la proliferación que se puede detectar en el núcleo de las células, únicamente, durante la proliferación. Los análisis profundos del ciclo celular han revelado que el antígeno Ki-67 está presente en niveles detectables en todas las fases y, también, en la mitosis, mientras que las células en reposo o inactivas en la fase G<sub>0</sub> no muestran expresión de este antígeno. [3;23].

Como las células con sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> sólo pueden proliferar activamente si su sistema de control del ciclo celular está dañado, la expresión del marcador de proliferación Ki-67 y del marcador p16<sup>INK4a</sup> dentro de una misma célula se deberían excluir mutuamente bajo condiciones fisiológicas normales. Por lo tanto, la expresión conjunta de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> en determinadas células se podría considerar como un indicador de desregulación del sistema de control del ciclo celular de las estas células.

En casos de neoplasia cervical, se ha detectado una fuerte sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> como consecuencia de la inactivación funcional de pRb causada por la oncoproteína E7 de los virus papiloma humano de los tipos de alto riesgo (VPH-AR) [13;21]. Como E7 es necesaria para establecer y mantener el fenotipo maligno

## IV. Reactivos

### Material suministrado

Cada kit incluye los siguientes materiales suficientes para realizar 50 pruebas. El número de las pruebas se basa en el uso de 200 µL de los reactivos por cada portaobjetos.

#### 1 Peroxidase-Blocking Reagent

**Reactivo de bloqueo de la peroxidasa**

11,5 mL, listo para su uso

Peróxido de hidrógeno al 3% que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).

La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

#### 2 Primary Antibodies Solution

**Solución de anticuerpos primarios**

11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16<sup>INK4a</sup>, clon E6H4 y anticuerpo monoclonal de conejo antihumano Ki-67, clon 274-11 AC3, suministrado en 50 mM de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) y proteína estabilizante.

#### 3 Visualization Reagent HRP

**Reactivo de visualización HRP**

11,5 mL, listo para su uso

Reactivo de polímero conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-ratón purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas. La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

#### 4 Visualization Reagent AP

**Reactivo de visualización AP**

11,5 mL, listo para su uso

Reactivo de polímero conjugado con fosfatasa alcalina y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-conejo purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas. La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

5 **DAB Buffered Substrate**

**Sustrato tamponado DAB**  
18,0 mL

Solución de tampón sustrato, pH 7,5, que contiene peróxido de hidrógeno < 0,1%, estabilizantes, potenciadores y un agente antimicrobiano.

6 **DAB Chromogen**

**Cromógeno DAB**  
0,85 mL

Solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina.

La solución de cromógeno (DAB) es nociva. Consulte las siguientes frases de riesgo y seguridad:

R40 Posibles efectos cancerígenos.

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

R68 Posibilidad de efectos irreversibles.

S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37 Úselese indumentaria y guantes de protección adecuados.

**NOTA:** aunque la diaminobencidina está relacionada estructuralmente con la bendidina, no hay pruebas de la carcinogenicidad de la diaminobencidina.

Consulte las normas nacionales, regionales o locales para la eliminación del producto.

La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

7 **Naphthol Phosphate Substrate**

**Sustrato naftol fosfato**  
25,0 mL,

Solución de tampón sustrato, pH 9,2, que contiene naftol-AS-TR-fosfato como sustrato, estabilizantes, potenciadores y un agente antimicrobiano.

8 **Fast Red Chromogen**

**Cromógeno Fast Red**  
1,33 mL, solución de cromógeno Fast Red.

9 **Epitope Retrieval Solution 10x**

**Solución de recuperación del epítipo 10x**

500 mL, 100 mM de EDTA, pH 8,0, que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).

## 10 CINtec® PLUS Mount

### Montaje CINtec® PLUS

18,0 mL, medio de montaje permanente con una base acuosa para la conservación permanente de los preparados en portaobjetos con tinción con peroxidasa y fosfatasa alcalina como sistemas de visualización. Contiene 7,7 mmol/L de azida sódica (NaN<sub>3</sub>)

### Preparación de las muestras citológicas

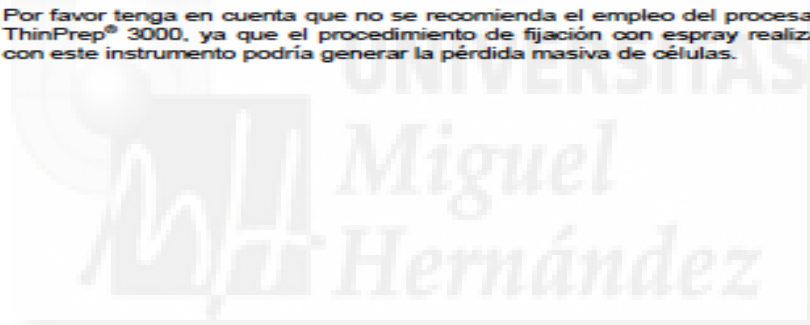
Las muestras citológicas deben manipularse de manera adecuada para conservar adecuadamente dichas muestras para procedimientos de inmunocitoquímica. Sobre las muestras se deben realizar los métodos habituales de procesamiento celular.

Se pueden usar los portaobjetos ThinPrep® (Hologic™ Inc.) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante en un procesador de portaobjetos del sistema ThinPrep® 2000, (Hologic™ Inc.) o portaobjetos del sistema BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante, así como portaobjetos preparados manualmente (frotis convencionales).

#### Notas:

1. Preparación de las muestras ThinPrep®:

Por favor tenga en cuenta que no se recomienda el empleo del procesador ThinPrep® 3000, ya que el procedimiento de fijación con espray realizado con este instrumento podría generar la pérdida masiva de células.



## 2. Preparación de las muestras BD SurePath™:

Se ha comunicado ocasionalmente que el almacenamiento del material celular posterior al procedimiento de enriquecimiento en agua, puede tener un efecto negativo sobre la señal inmunocitoquímica; recomendamos que durante la preparación de los portaobjetos para la prueba con CINtec® PLUS respete siempre las instrucciones expuestas a continuación para evitar cualquier riesgo de pérdida de señal:

- a. Preparación de los portaobjetos **directamente** después del procesamiento de los portaobjetos con papanicolaou
  - i. En cuanto se haya realizado la tinción papanicolaou del respectivo portaobjetos BD SurePath™, se podrá preparar un segundo portaobjetos para cada caso.
  - ii. Coloque un segundo set de portaobjetos etiquetados en los soportes para portaobjetos.
  - iii. Si emplea el PrepStain™ con versión GYN 1.1 ó 1.2 para la preparación de portaobjetos, seleccione el programa "Sólo transferencia" ("Transfer only").
- b. Preparación posterior **de portaobjetos con pellets celulares enriquecidos** tras la preparación de portaobjetos Pap
  - i. Retire los soportes con los tubos del sistema PrepStain™ y añada aproximadamente 2 mL de líquido conservante BD SurePath™ a cada tubo.
  - ii. Tape los tubos y los podrá almacenar a temperatura ambiente hasta 4 semanas o refrigerados (2 – 8°C) hasta 6 meses.
  - iii. Si va a preparar un portaobjetos para CINtec® PLUS con una muestra almacenada, esta deberá atemperarse previamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Comience con el segundo paso de centrifugado del proceso de enriquecimiento GYN y realice el resto de los pasos del procedimiento de preparación.
- c. Preparación de portaobjetos **con el material de muestra restante** que permaneció en el vial de muestra original (aproximadamente 2 mL)
  - i. Añada 8 mL de líquido conservante BD SurePath™ al material restante en el vial BD SurePath™ (aprox. 2 mL)
  - ii. La muestra diluida se debe procesar con el PrepMate™ usando las técnicas convencionales y en el PrepStain™ usando la versión GYN 1.1 ó 1.2 para la preparación de portaobjetos con el programa "Sólo transferencia" ("Transfer only")

Inmediatamente después de la preparación, los portaobjetos ThinPrep® o BD SurePath™ deben fijarse en etanol al 99% durante 10 minutos hasta 1 hora y dejar secar durante 20 minutos hasta 16 horas (durante la noche). Las preparaciones citológicas ThinPrep® o BD SurePath™ no deben ser fijadas con reactivo de fijación pulverizable para muestras citológicas (spray) que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix®, Merck).

Los frotis convencionales deben fijarse con reactivo de fijación pulverizable (spray) para muestras citológicas que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix<sup>®</sup>, Merck) inmediatamente después de la recogida de las muestras.

Antes de comenzar con el procesamiento de inmunotinción, se deberán rehidratar todas las muestras siguiendo el protocolo específico expuesto en el apartado 2.1.



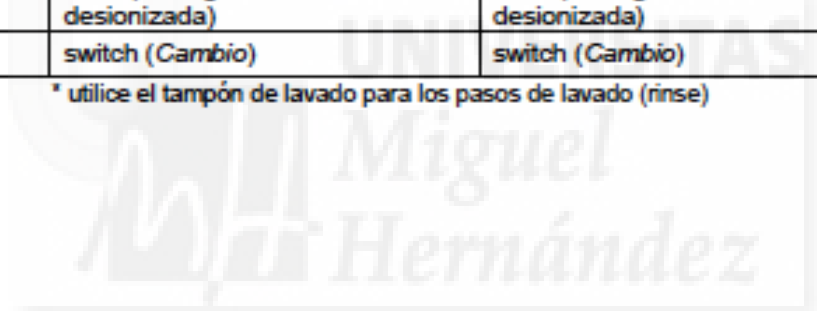
A continuación se adjunta el resumen de la programación:

Paso del programa	Preparaciones citológicas ThinPrep® y frotis convencionales	Preparaciones citológicas BD Surepath™
1	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
2	Peroxidase-Blocking Reagent (Reactivo de bloqueo de la peroxidasa) 5 minutos	Peroxidase-Blocking Reagent (Reactivo de bloqueo de la peroxidasa) 5 minutos
3	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
4	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos
5	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
6	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos
7	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
8	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
9	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
10	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos
11	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
12	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
13	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
14	Switch (cambio)	Switch (cambio)
15	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos



16	rinse (con agua destilada o desionizada)	Rinse (con agua destilada o desionizada)
17	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
18	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos
19	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
20	—	<b>Autostainer LabVision:</b> "Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos <b>Autostainer Dako:</b> "Substrate" step: Fast Red (Paso "Sustrato": Fast red) 15 minutos
21	—	rinse* (Lavado)
22	rinse (con agua destilada o desionizada)	rinse (con agua destilada o desionizada)
23	switch (Cambio)	switch (Cambio)

\* utilice el tampón de lavado para los pasos de lavado (rinse)





## VIII. Interpretación de los resultados

El procedimiento del CINtec® PLUS Kit genera dos productos de reacción de distinto color: uno marrón que se precipita en el lugar donde hay antígeno p16<sup>INK4a</sup> y uno rojo que se precipita en el lugar donde hay antígeno Ki-67. La tinción de células con color marrón (citoplasma y/o núcleo) indica la sobreexpresión de la p16<sup>INK4a</sup>. La tinción de células con color rojo (núcleo) indica la expresión de Ki-67. Las células con ambas tinciones mostrarán una tinción marrón citoplasmática con un núcleo típicamente de color rojo intenso. Antes de interpretar los resultados, un patólogo/citotécnico cualificado con experiencia en procedimientos inmunocitoquímicos y formado en la interpretación de los portaobjetos de tinción de CINtec® PLUS debe evaluar los controles positivos y negativos. La interpretación de los resultados debe realizarla un profesional certificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

La interpretación de las muestras citológicas cervicales con tinción de CINtec® PLUS Kit, se deberá realizar evaluando la presencia de las células cervicales epiteliales que muestran ambas tinciones, la tinción marrón citoplasmática y la tinción roja del núcleo, que son indicativos de una expresión simultánea de p16 y Ki-67.

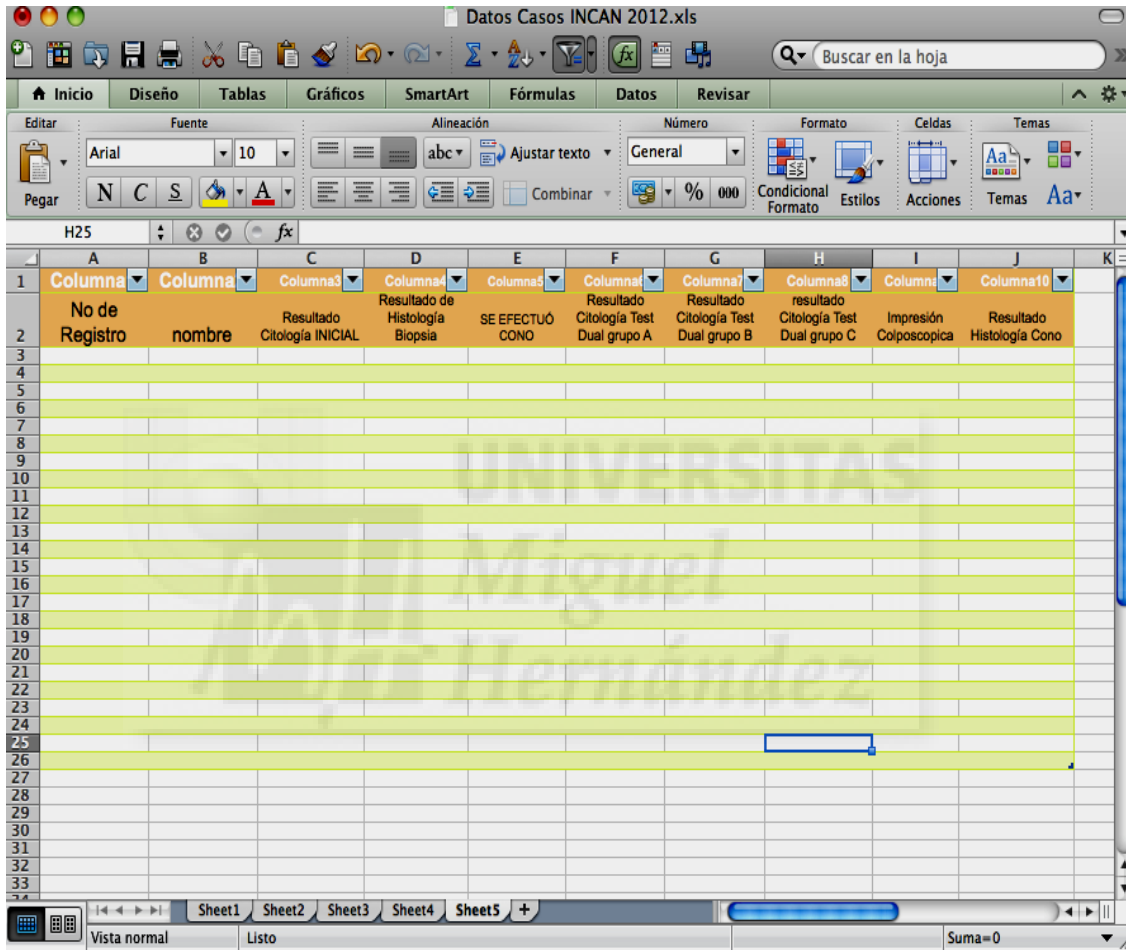
La presencia de una o más células cervicales epiteliales con la presencia de ambas tinciones, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo dentro de la misma célula, se interpreta como un resultado positivo del test CINtec® PLUS.

Si no se detectan células cervicales epiteliales con la presencia de ambas, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo, se interpreta con un resultado negativo del test CINtec® PLUS.

Por favor tenga en cuenta que la presencia de células cervicales epiteliales que muestren inmunoreactividad a tan sólo uno de los dos marcadores (como por ejemplo sólo la tinción marrón por p16 o sólo la tinción roja por Ki-67) no se considerarán un resultado positivo del test CINtec® PLUS; incluso si ambos tipos de células cervicales que muestran una inmunoreactividad se encuentran en la misma muestra citológica.

Si se detectaran células con indicación de discariosis severa que no presenten la tinción de ambos marcadores, p16 y Ki-67, los criterios morfológicos de interpretación no se deben ignorar.

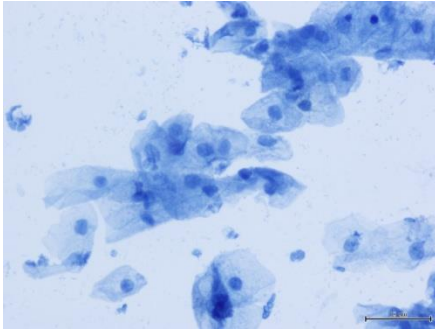
Anexo 9. Base de datos de pacientes en Excel



Anexo10. Atlas de tinciones con inmunohistoquímica de exfoliados y biopsias cervicales.  
Fotos obtenidas de las muestras procesadas en la Facultad de Ciencias médicas- USAC

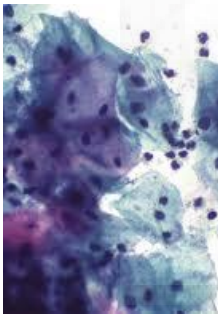
### **CITOLOGÍA**

#### **CAMBIOS BENIGNOS O INFLAMATORIOS**



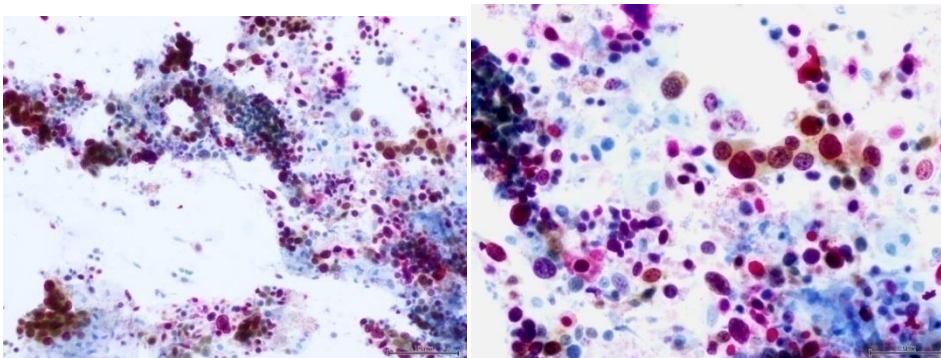
Relación núcleo citoplasma normal, presencia o no de bacterias o flagelados

#### **LEIBG**

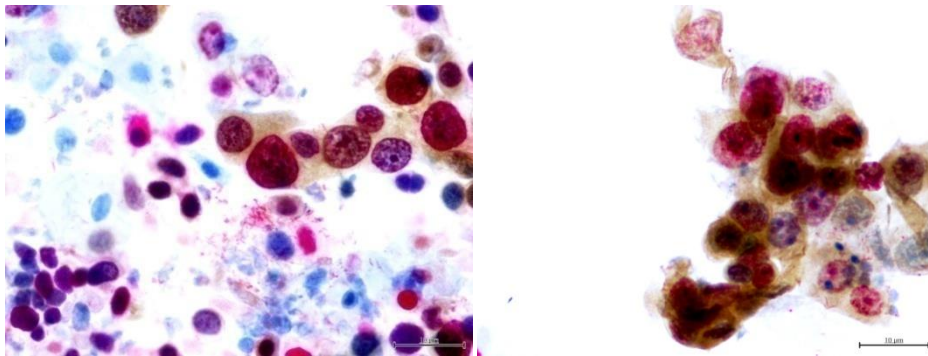


Presencia de células con núcleo rodeado de halo blanco (Coilocytosis)

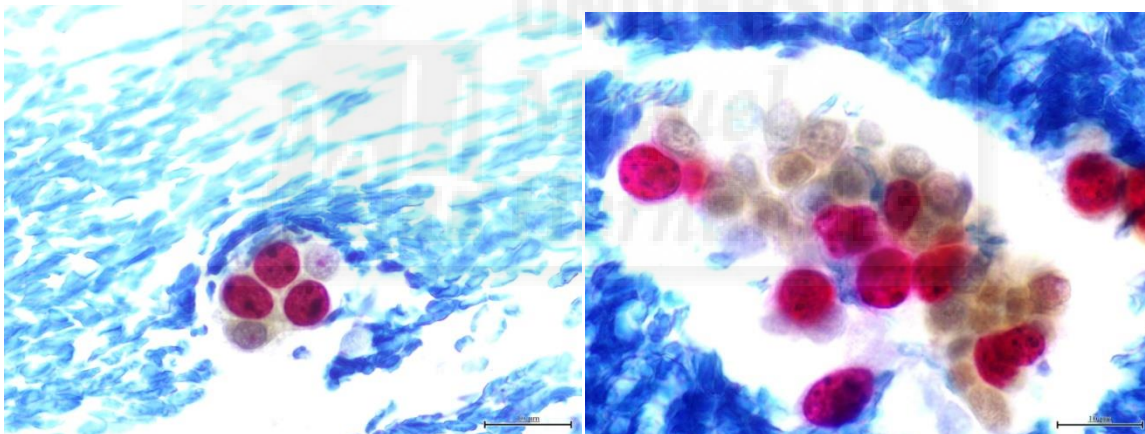
#### **LEIAG**



Tinción de núcleos color rojo y citoplasma color café marrón (positivo para P16 y Ki67)



Observe la pérdida relación núcleo citoplasma, los núcleos se ven más grandes y hay nucléolos

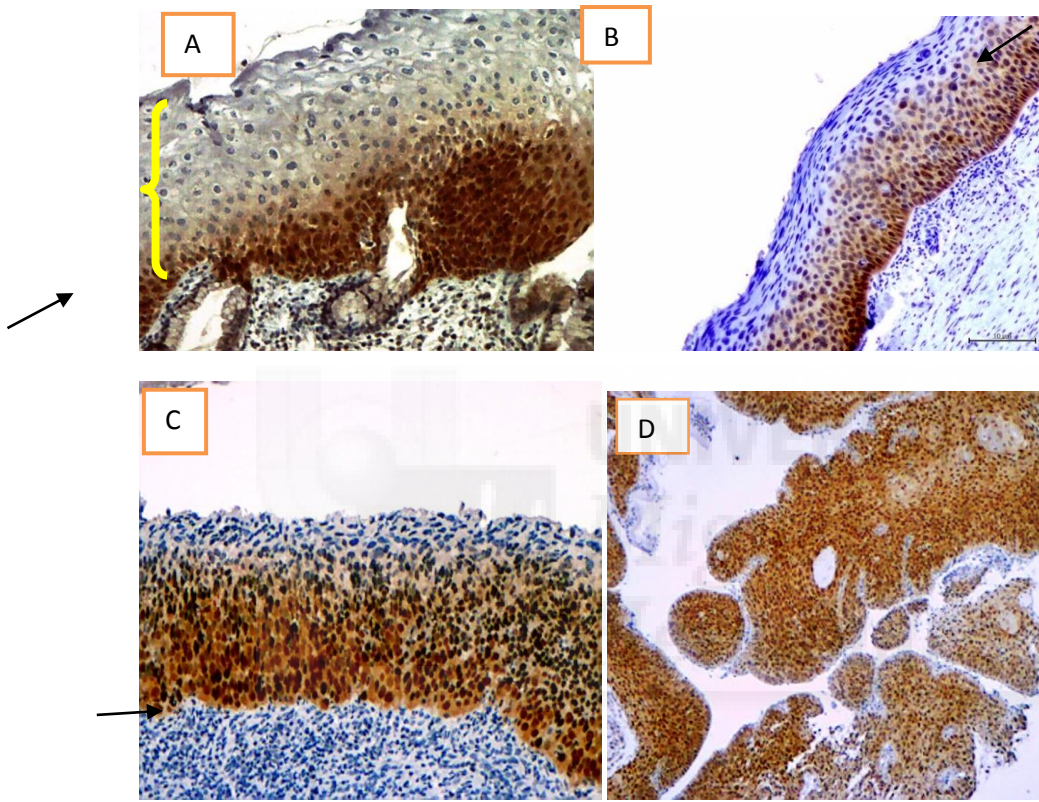


Observe los núcleos rojos con nucléolos más oscuros dentro del mismo



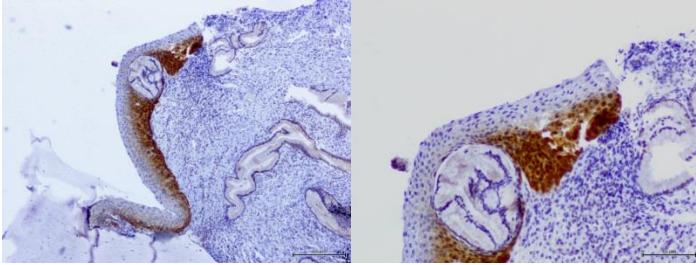
## HISTOLOGÍA

### Cortes de biopsias del cérvix con Inmunohistoquímica P16



**Biopsias del cérvix.** Teñidas con inmunohistoquímica la proteína P16, se observa color marrón citoplasma y núcleo de las células transformadas. Se muestran Lesiones preinvasivas (aquellas que no atraviesan la capa basal y se encuentran en el epitelio únicamente, ver las flechas señalan la capa basal y las llaves el epitelio) y la Invasiva (aquella que ya penetra o invade la capa basal). Dentro de las lesiones preinvasivas se clasifican 2 tipos de bajo y alto grado dependiendo del grosor epitelial afectado. Ver imagen A es de bajo grado (afecta sólo tercio inferior del epitelio); imágenes B y C afectan más del tercio inferior. Por último la imagen D es cáncer invasivo no se preservan los límites del epitelio, penetrando la capa basal. Fotos de Investigación del Dr. Alberto García G, Centro de Investigación Biomédica/Facultad de Ciencias Médicas USAC.

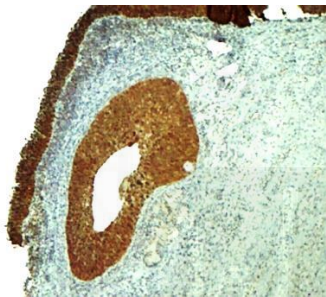
LEIAG



Aumento 10X

Aumento 20X

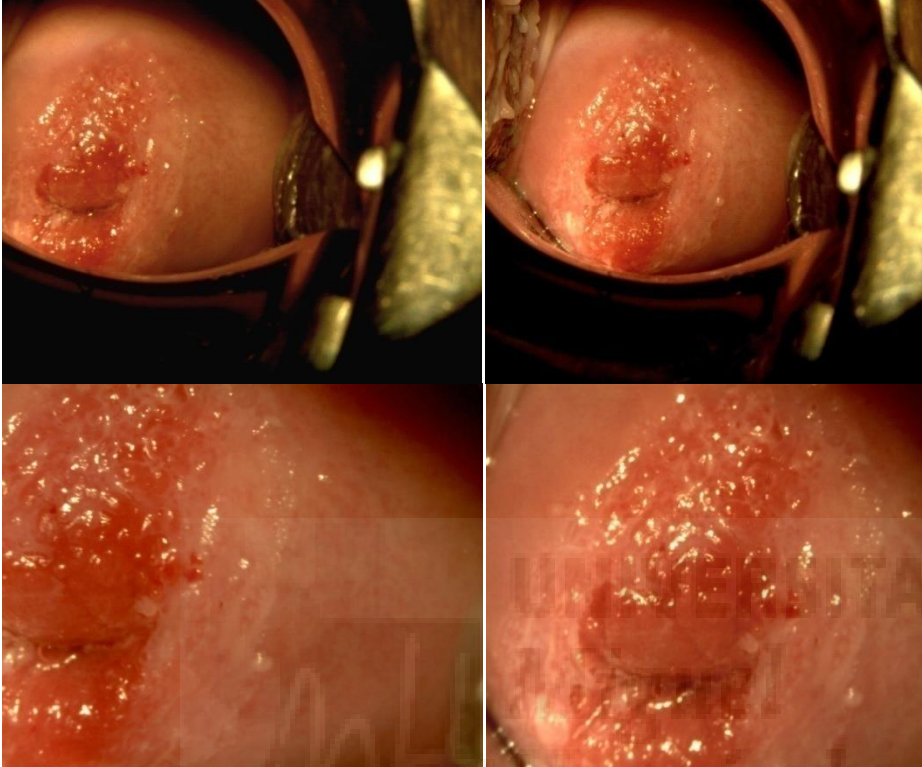
LEIAG CON EXTENSIÓN GLANDULAR



UNIVERSITAS  
Miguel  
Hernández

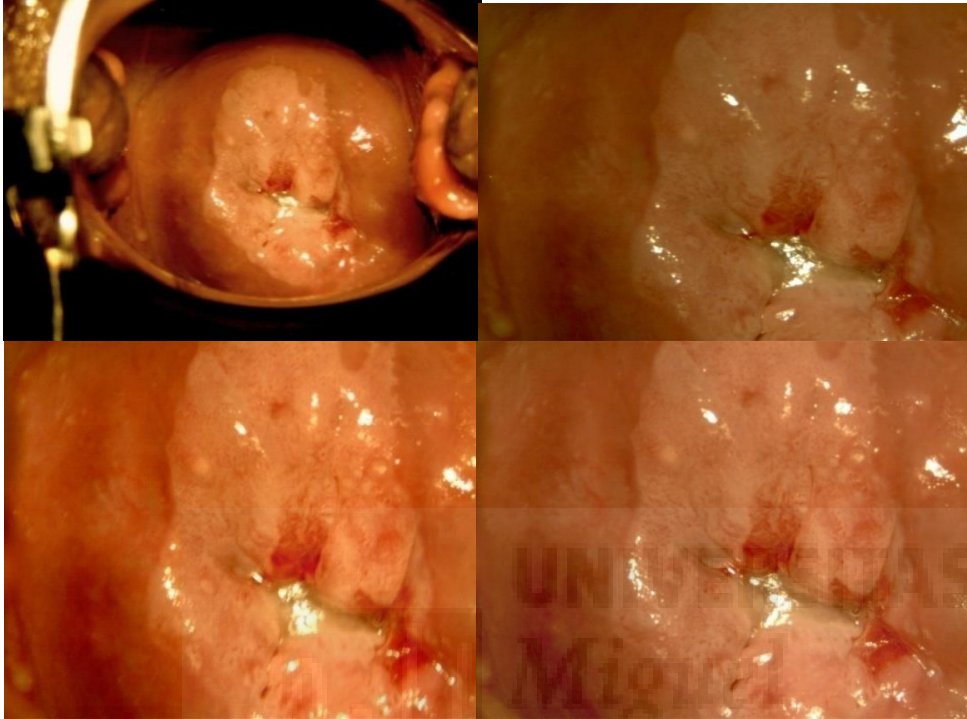
Anexo 11. Imágenes por colposcopia.

POCO SIGNIFICATIVA



Zonas blancas tenues, asociados o no a ectopia

COLPOSCOPIA SIGNIFICATIVA

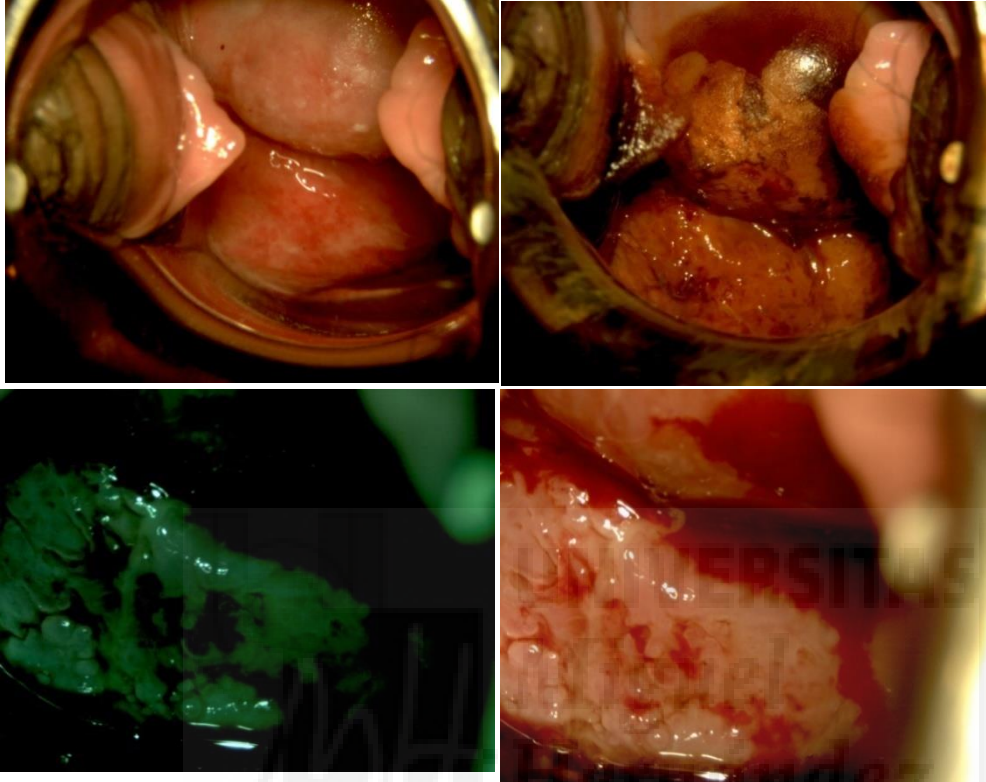


Epitelio acético blanco asociado a vasos tipo mosaico y/o base grueso

Hernandez



COLPOSCOPIA MUY SIGNIFICATIVA



Epitelio con pérdida de la continuidad, epitelio blanco grisáceo, vasos atípicos.