

Incorporación de biomarcación con p16 y Ki-67 como criterio objetivo en el diagnóstico de biopsias cervicales. Resultados

C. Álvarez¹, S. Melesi¹, A. Sica¹, G. Garrido¹, A. Feijó¹, M. C. Rodríguez¹, M. Rosasco¹, V. Carbonatti¹, Tec. G. Ordoqui²

Resumen

Con la finalidad de aumentar la exactitud diagnóstica en biopsias cervicales y legrados endocervicales se realiza biomarcación con p16 y Ki-67 en casos con diagnóstico histológico de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 y de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado con sospecha de mayor lesión. Estos diagnósticos morfológicos con hematoxilina y eosina presentan dificultades en el diagnóstico diferencial con lesiones de mayor gravedad, como las neoplasias intraepiteliales cervicales grado 3 y de menor entidad como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y lesiones no neoplásicas. La marcación con p16 y Ki-67 que identifica infecciones por virus del papiloma humano de alto riesgo, es una

herramienta de seguridad que complementa el diagnóstico histológico permitiendo alcanzar un diagnóstico más certero. La interpretación histopatológica de la biopsia cervical tiene un rol importante en la selección del seguimiento y tratamiento de las pacientes con estas lesiones precursoras del cáncer cervical asociadas a infecciones por virus del papiloma humano. En este estudio los resultados de la marcación con p16 y Ki-67 se correlacionan con los hallazgos del diagnóstico morfológico con hematoxilina-eosina y con el resultado del estudio de conizaciones realizadas como seguimiento. Nuestros resultados así como los aportados por otros autores apoyan la incorporación de esta técnica que permite predecir el hallazgo de lesiones más severas como neoplasias intraepiteliales cervicales grado 3 o mayores en estudios subsiguientes. En esta serie las conizaciones realizadas en los casos de marcación positiva p16/Ki67 mostraron la presencia de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado en 81% incluyendo 27% de neoplasias intraepiteliales grado 3. *Palabras clave:* cérvix, lesiones escamosas intraepiteliales, p16, Ki-67, seguimiento.

1 Laboratorio Dra. Carmen Álvarez, Montevideo, Uruguay
labcas@adinet.com.uy

Dirección técnica: Dra. Carmen Álvarez

2 Laboratorio G. Ordoqui, Montevideo, Uruguay

Abstract

Biomarking with p16 and Ki-67 was performed to enhance the diagnostic accuracy of cervical biopsies and endocervical curettage specimens in cases with histological diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesions, grade 2 cervical intraepithelial neoplasms and low-grade squamous intraepithelial lesions that warranted ruling out a more serious condition. Hematoxylin and eosin staining provides morphological diagnoses, but it may not suffice to rule out more serious lesions, including grade 3 cervical intraepithelial neoplasms and minor lesions, such as low-grade squamous intraepithelial neoplasms and non-neoplastic lesions. Both p16 and Ki-67 identify high-risk human papillomavirus infections; they are safety tools that complement the histological diagnosis, increasing its accuracy. The histopathological interpretation of cervical biopsies plays a key role when deciding the follow-up and therapy to be applied to patients presenting with these HPV-associated lesions, precursors of cervix cancer. In this study, p16 and Ki-67 labeling findings correlate with the H&E morphological diagnosis and with the result of subsequent follow-up conizations. Our results are consistent with those found by other authors, supporting the incorporation of this technique as a useful tool to predict the finding of more severe lesions, including grade \geq cervical intraepithelial neoplasms in subsequent studies. In this series, the conizations performed in p16/Ki67-positive cases showed the presence of high-grade squamous intraepithelial lesions in 81% including 27% grade 3 intraepithelial neoplasms.

Key words: cervix, squamous intraepithelial lesions, p16, Ki-67, follow-up.

Resumo

A fim de aumentar a precisão do diagnóstico em biópsias cervicais e curetagem endocervical é realizada biomarcação com p16 e Ki-67 em casos que tem histologicamente confirmada a presença de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau-neoplasia cervical grau 2 e lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau suspeitas de uma lesão maior. Estes diagnósticos morfológicos com hematoxilina e eosina apresentam dificuldades no diagnóstico dife-

rencial com lesões mais graves tais como neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 e menor como lesões de baixo grau não neoplásicas. Rotulado com p16 e infecções Ki-67 identificando papilomavírus humano de alto risco, é uma ferramenta de segurança que complementa o diagnóstico histológico permitindo alcançar um diagnóstico mais preciso. A interpretação histopatológica de biópsia do colo do útero tem um papel importante na seleção de monitorização e tratamento de pacientes com estas lesões precursoras do cancro cervical associado com infecções de papilomavírus humano. Neste estudo, os resultados de rotulagem com p16 e Ki-67 correlacionam-se com as conclusões do diagnóstico morfológico com hematoxilina-eosina e com o resultado do estudo da conização realizada como acompanhamento. Nossos resultados e os de outros autores defendem a incorporação desta técnica para prever a descoberta de lesões mais graves, tais como neoplasia cervical intra-epitelial grau 3 ou superior em estudos posteriores. Nesta série as conizações realizadas em casos com ligação positiva p16/Ki67 mostrou a presença de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau em 81% incluindo 27% a neoplasia intraepitelial grau 3. *Palavras-chave:* colo do útero, lesões escamosas intraepiteliais, p16, Ki-67, acompanhamento.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay el cáncer de cuello uterino es el tercero en incidencia, quinto en mortalidad en tasas estandarizadas por edad en la mujer. La tasa de incidencia es 14,46 casos por 100.000 y la de mortalidad es de 5,33.⁽¹⁾

A nivel mundial se reportan tasas de 15,2 y 7,8 casos por 100.000 habitantes respectivamente, siendo algo más elevadas en los países de bajos ingresos alcanzando una incidencia de 17,8 por 100.000 habitantes.⁽²⁾ La infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HPV-HR) se encuentra asociada al desarrollo de las lesiones precursoras intraepiteliales y el carcinoma escamoso cervical.⁽³⁻⁵⁾

A fines de la década de 1970, Zur Hausen sugirió que podía haber una asociación entre el virus del papiloma humano (HPV) y el cán-

cer cervical. Un gran número de estudios epidemiológicos, clinicopatológicos y moleculares posteriormente vincularon la presencia de tipos específicos de HPV al desarrollo de cánceres anogenitales y sus precursores y ahora se acepta que los HPV de alto riesgo juegan un papel crítico en la patogénesis de la mayoría de los cánceres cervicales y sus lesiones precursoras.⁽⁵⁾

En 1988 en Maryland, el primer taller de trabajo sobre el Sistema Bethesda de clasificación de las lesiones escamosas intraepiteliales cervicales (SIL) tomó en consideración el diferente estado biológico de las infecciones por HPV activas y las lesiones con mayor riesgo de progresión a lesión precancerosa y finalmente a cáncer, estableciendo dos grados: alto y bajo grado (HSIL y LSIL).⁽⁶⁾

Existen lesiones morfológicas de alto y bajo grado y tipos virales de alto y bajo riesgo, siendo en la actualidad ampliamente aceptado (WHO, 2014) que la mayoría de las lesiones de bajo grado, LSIL (80-85%), son debidas a infección con tipos de HPV de alto riesgo (HPV-HR) y los restantes LSIL verdaderos son causados por tipos de HPV de bajo riesgo (HPV-LR).^(3-5,7)

La interpretación histopatológica de la biopsia cervical tiene un rol importante en la selección del seguimiento y manejo de las mujeres con hallazgos anormales en el test citológico de Papanicolaou, los test de HPV-DNA y otros antecedentes que determinan su referencia a colposcopia y/o tratamientos.^(2,8)

El Proyecto LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions*) para la estandarización de los diagnósticos histológicos en lesiones asociadas a HPV propone la utilización de biomarcación con p16 en las siguientes situaciones: [1] para realizar el diagnóstico diferencial entre una lesión escamosa intraepitelial de alto grado y metaplasia escamosa inmadura, atrofia y cortes tangenciales; [2] en el diagnóstico de CIN2, que morfológicamente se ubica entre una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado y una lesión precancerosa; [3] casos con discrepancia profesional; [4] casos con discrepancias citohistológicas que deben ser referidos a colposcopia.^(9,10)

La proteína p16 se sobreexpresa como resultado de la transformación en la vía oncogénica. En el cuello uterino puede ocurrir la sobreexpresión de p16 en asociación con infecciones por HPV de alto riesgo, entre ellos el tipo viral oncogénico 16, lo que ha llevado a confusiones en la terminología.

A pesar de su asociación con las infecciones por HPV y de su similitud terminológica con el HPV 16, p16 no es una proteína viral.⁽¹¹⁾

Desde el año 2002 se utiliza la detección por inmunohistoquímica de la sobreexpresión de la proteína p16 como marcador sustituto de la fase de transformación de la infección HPV de alto riesgo. Posteriormente, este método se suplementa con utilización de Ki-67, marcador de proliferación celular. Las células que han sido transformadas por una infección HPV-HR permanecen proliferativas y son positivas para p16 y Ki-67.^(3-4,12-15)

La incorporación de estas dos técnicas de biomarcación p16 y Ki-67, entre otras técnicas actualmente propuestas, permitirían implementar estrategias de seguimiento y tratamiento más adecuadas, disminuyendo el riesgo de cáncer cervical así como la morbilidad asociada a intervenciones innecesarias.^(10-12,15-16)

El objetivo de este estudio es analizar la concordancia entre el diagnóstico histológico emitido en biopsias cervicales (Bp) y/o legrados endocervicales (LEC) y el resultado de la marcación con p16 y Ki-67 realizada en dichas muestras cervicales, así como su correlación con el resultado histológico en los conos LEEP (CL) o quirúrgicos (CQ) realizados. Planteamos evaluar el rol de estas técnicas en la clasificación de las pacientes portadoras de lesiones escamosas precursoras cervicales, lo que validaría su incorporación al diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluye biopsias de cuello uterino y/o LEC recibidas en el laboratorio procedentes de diversas instituciones de salud a las que se les realiza marcación con p16 y Ki-67.

Las muestras se reciben fijadas en formol, se ingresan con numeración correlativa y se incluyen para su procesamiento con técnicas habituales y tinción con hematoxilina-eosina (HE).

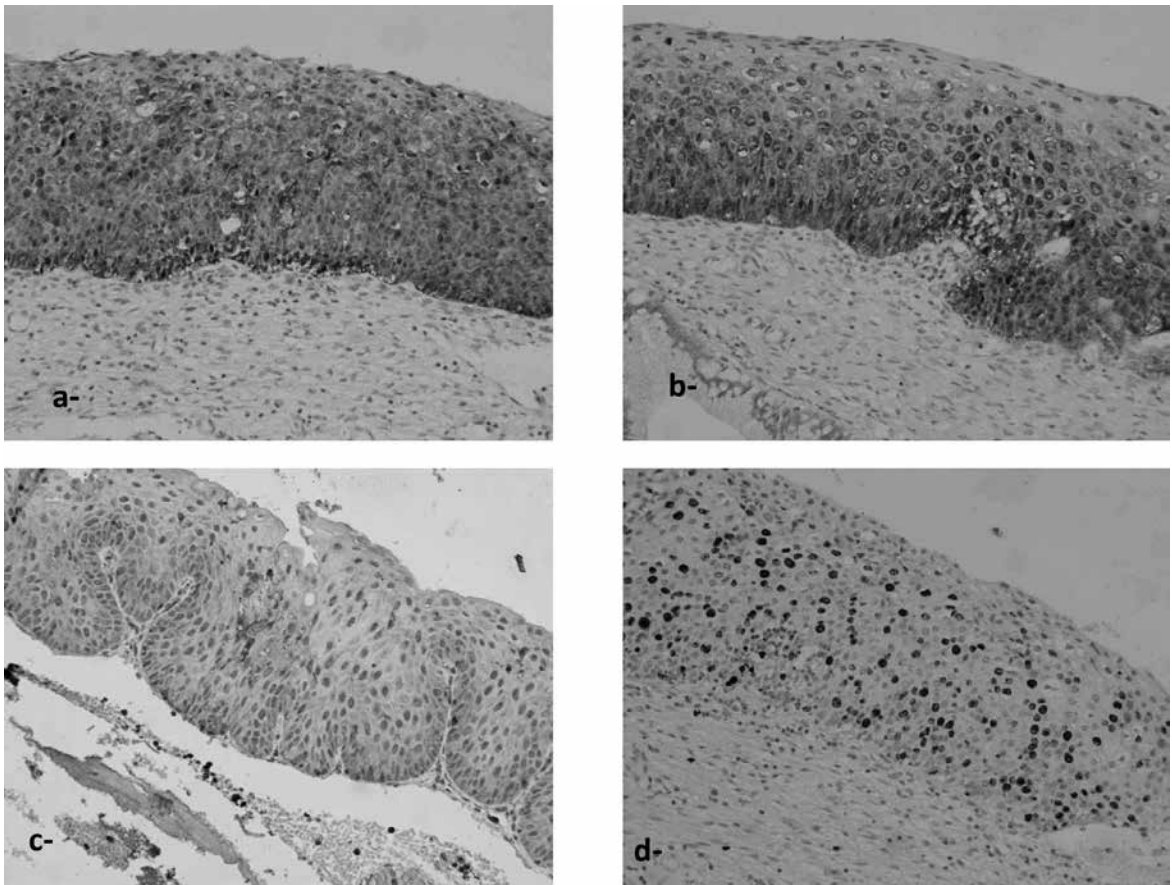


FIGURA 1.

Marcación positiva p16 y Ki-67 en lesiones intraepiteliales escamosas de alto y bajo grado. 20x.

a, b) HSIL p16; c) LSIL p16; d) HSIL Ki-67

El diagnóstico es realizado por los patólogos del equipo del laboratorio de acuerdo a criterios y protocolos pre-establecidos utilizando el Sistema Bethesda para la clasificación de las lesiones escamosas intraepiteliales: alto grado (HSIL, CIN2 y CIN 3) y bajo grado (condiloma viral-CIN1).

Se analizan 416 biopsias y/o LEC provenientes de una población abierta comprendidas en el período 1 de enero de 2015 al 31 de julio de 2017. Estos 416 casos corresponden a diagnósticos morfológicos con HE de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado con lesión HSIL-CIN2 y lesiones de bajo grado con sospecha de mayor lesión (LSIL+?), subgrupo que se define para este estudio. Este subgrupo LSIL+? representa aproximadamente 10% de todos los diagnósticos LSIL emitidos en ese período. En los casos en que el diagnóstico histológico con HE es de LSIL y no plantea

sospecha de mayor lesión, de acuerdo a la recomendación del proyecto LAST 2012, no se realiza marcación con p16.⁽⁹⁾

El material se envía a un laboratorio externo que realiza marcación sobre cortes sucesivos de tejido con p16 (clona BioSb/16P04JC2) y Ki-67 (DAKO/MIB-1).

En esta serie no se incluyen casos de CIN3 o carcinoma invasor ni LSIL sin sospecha de mayor lesión.

La lectura de la inmunomarcación de las técnicas p16 y Ki-67 se realiza de acuerdo a los criterios propuestos por distintos autores citados.^(5,7,11,17-18)

Cuando la tinción p16 es positiva fuerte y difusa en la mitad inferior del epitelio se considera que la lesión es un SIL.⁽⁵⁾ Es una tinción citoplasmática y nuclear. Se considera negativa cuando la tinción es focal, irregular y exclusivamente en las capas superficiales.⁽¹¹⁾ En casi

todos los HSIL la tinción es fuerte y difusa en el espesor del epitelio, marcando la capa basal, parabasal y media, con o sin tinción de estratos superficiales. En un tercio a la mitad de lesiones LSIL se observa tinción fuerte y difusa en capas basales y parabasales del epitelio aunque la tinción también puede ser focal. Los epitelios normales y lesiones inflamatorias / reparativas son negativos para p16.^(5,19-22) Por su parte, Miralpeix et al.⁽¹⁸⁾ realizan un análisis cuantitativo de los casos positivos identificando tinción en las tres capas epiteliales, tercio inferior, dos tercios y/o más, alcanzando a todo el espesor epitelial, que tuvimos en cuenta.

También aplicamos, como lo sugiere Galgano et al.,⁽²²⁾ una evaluación cuantitativa cuando la tinción es fuerte y difusa, tomando en consideración que se extienda hacia arriba desde la membrana basal, en proporción al grado lesional. Figura 1.

En la tinción con Ki-67 las lesiones de alto grado presentan positividad difusa, alcanzando a los dos tercios superiores del epitelio y las de bajo grado en el tercio inferior o la mitad del mismo. En los epitelios normales y reactivos la positividad queda limitada al estrato basal y parabasal. Figura 1.^(5,11,23-24)

El diagnóstico diferencial que realizamos en los casos de LSIL con sospecha de mayor lesión y HSIL-CIN2 es con las imágenes de atrofia, metaplasia escamosa inmadura, proliferaciones escamosas reactivas⁽⁵⁾ y cortes tangenciales, etc. Los distintos autores también señalan que en los casos de CIN2 es importante descartar lesiones de mayor entidad como HSIL-CIN3 y de menor entidad como lesiones LSIL y lesiones no neoplásicas como epitelios reactivos/reparativos con las que el CIN2 comparte elementos morfológicos.^(9,11,17)

La técnica de marcación se clasifica en negativa o positiva para HPV-HR. El resultado de la marcación con p16 en conjunto con las imágenes morfológicas de la HE permiten re-clasificar las lesiones en 3 categorías: [1] negativa HPV-HR, [2] positivo LSIL/HPV-HR y [3] positivo HSIL/HPV-HR.

En los casos de discordancia se revisaron las láminas alcanzándose un diagnóstico de consenso para su clasificación.

RESULTADOS

Se realiza el análisis de 385 biopsias de cuello uterino y/o LEC sobre un total de 416 pares biopsicos e inmunomarcados, cuya distribución se expresa en la Tabla 1, observándose 196 casos (51%) de lesiones histológicas LSIL+? y 189 HSIL-CIN2 (49%).

TABLA 1.

Biopsias cervicales con marcación p16/Ki-67

	CASOS (n)	%
LSIL (CIN 1) con sospecha de mayor lesión (+?)	196	51
HSIL (CIN 2)	189	49
TOTAL	385	100

Total 416 casos.

Se excluyen 31 casos (25 lesiones no representadas en cortes de inmunohistoquímica y 6 metaplasias inmaduras atípicas)

Se excluyen 25 casos con lesiones no representadas en los cortes de inmunohistoquímica y 6 con diagnóstico morfológico inicial de metaplasia inmadura atípica (MIA).

Ciento noventa y ocho (198) casos tienen seguimiento mediante conos (CL o CQ). Los 30 casos seguidos por biopsias y/o LEC no se incluyen para estudio.

El Gráfico 1 permite ver la distribución de los casos con marcación negativa y positiva HPV-HR en los dos grupos de estudio LSIL+? y HSIL-CIN2.

La Tabla 2 muestra los mismos resultados que el Gráfico 1 poniendo en evidencia que los casos con marcación negativa HPV-HR totalizan 46 casos (23%) en el grupo de LSIL+? y 1 caso (0,5%) en el grupo de los HSIL-CIN2. En total los que presentan marcación positiva HPV-HR en ambos grupos son 338 casos (88%) y con marcación negativa HPV-HR 47 casos (12%). Estos valores se observan en el Diagrama 1: los casos positivos HPV-HR corresponden a 94 LSIL (28%) y 244 HSIL (72%).

El Gráfico 2 muestra el tipo de seguimiento implementado según el resultado de la marcación en la biopsia previa. Los diagramas sectoriales muestran que en 198 casos, a 30 (15%) se les realiza una biopsia o LECy a 168 (85%) como (CL o CQ).

GRÁFICO 1.

Hallazgos de la marcación en los diagnósticos histológicos

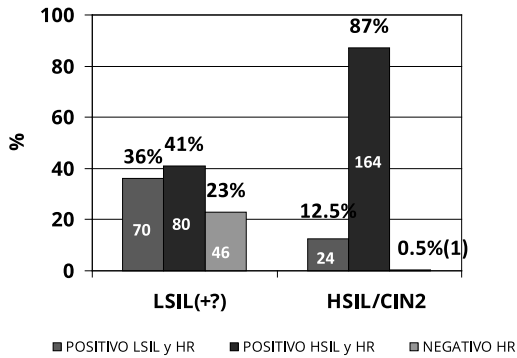


TABLA 2.

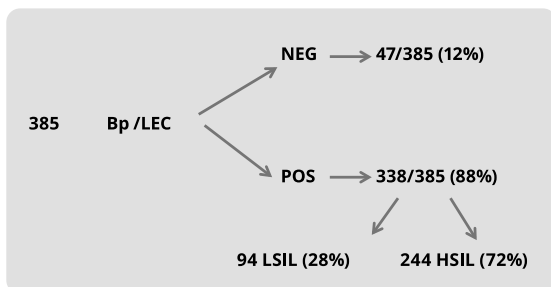
Hallazgos de la marcación en los diagnósticos histológicos

Marcación p16/Ki-67 *	Diagnóstico histológico			
	LSIL +?		HSIL-CIN2	
	n	%	n	%
Negativo HPV-HR	46	23	1	0.5
Positivo LSIL y HPV-HR	70	36	24	12.5
Positivo HSIL y HPV-HR	80	41	164	87
TOTAL	196	100	189	100

* 385 casos (47 Neg.; 338 Pos.)

DIAGRAMA 1.

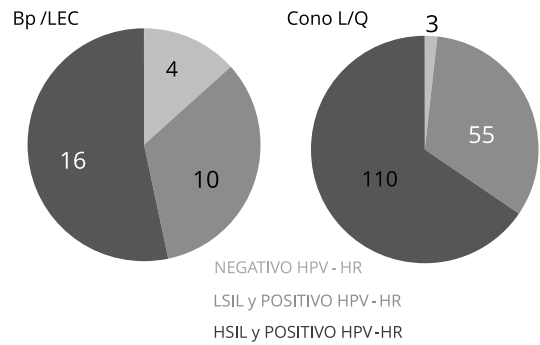
Hallazgos en biopsias. Resultados de marcación HPV-HR / Histología



En los Diagramas 2 y 3 (pág. 63) se observan los resultados de la marcación en las 3 categorías de reclasificación relacionadas con los resultados histológicos en los conos.

GRÁFICO 2.

Distribución de los casos y tipo de seguimiento. Resultado de la marcación



La Tabla 3 (abajo) resume las lesiones encontradas en los 165 conos cuando la marcación HPV-HR fue positiva en las biopsias previas. Se encuentran 134 (81%) casos de HSIL y 31 (19%) de LSIL. No se incluyen los 3 conos con marcación negativa HPV-HR.

TABLA 3.

Resumen de los hallazgos histológicos en conos con marcación positiva HPV-HR en biopsias previas

Diagnóstico histológico	n	%
HSIL-CIN3	*36	22
HSIL-CIN2	98	59
LSIL	31	19
TOTAL	165	100

HSIL 134 (81%)

*36/134 (27%)

El Diagrama 4 (abajo) presenta los hallazgos histológicos en las conizaciones realizadas en los casos positivos HPV-HR. En el 19% de los casos (31/165) las lesiones corresponden a LSIL y 81% (134/165) a HSIL.

DIAGRAMA 4.

Hallazgos histológicos en conos con marcación positiva HPV/HR en biopsias previas

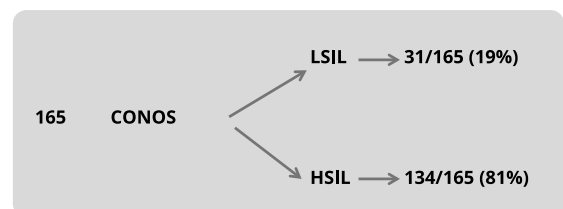


DIAGRAMA 2.

Diagnóstico histológico en 58 conos y su relación con biopsias LSIL+? de acuerdo con la marcación HPV-HR

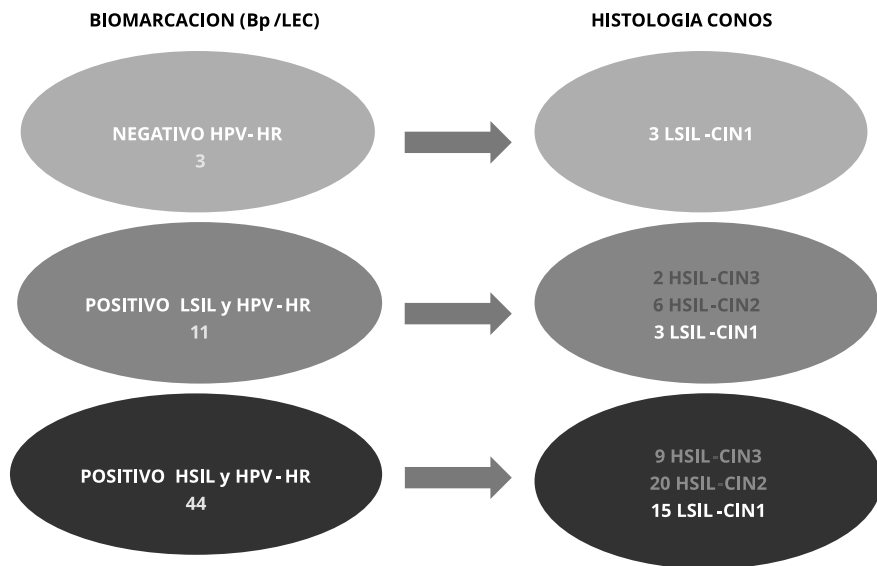
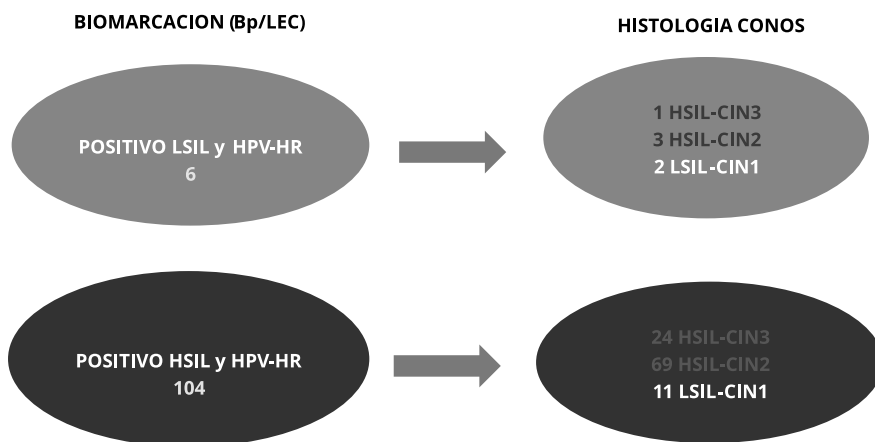


DIAGRAMA 3.

Diagnóstico histológico en 110 conos y su relación con biopsias HSIL-CIN2 de acuerdo con la marcación HPV-HR



DISCUSIÓN

El diagnóstico histológico se considera el estándar de oro en que se basan las conductas clínicas a pesar de la variabilidad inter e intraobservador constatada por los distintos autores. La concordancia diagnóstica es mayor en los extremos de un espectro que incluye en uno epitelios normales y reactivos y en otro lesiones de displasia severa – carcinoma in-

traepitelial y carcinoma invasor. Esta concordancia disminuye en el nivel displasia leve – condiloma viral y displasia moderada (HSIL-CIN 2). Actualmente se considera necesario incorporar técnicas de biomarcación para aumentar la exactitud diagnóstica en el estudio morfológico con HE.^(11,17)

La marcación con p16 y Ki-67 es una herramienta de seguridad en el diagnóstico his-

tológico ya que define presencia o ausencia de lesión, permite gradación de lesiones y ayuda en la realización del diagnóstico diferencial entre los diferentes grados de SIL y lesiones no neoplásicas, ya mencionadas, como inflamación, lesiones reactivas/reparativas, atrofia, metaplasia reactiva, metaplasia inmadura atípica, lesiones escasamente representadas, lesiones pequeñas, cortes tangenciales, lesiones con artefactos.⁽¹¹⁾ Existen lesiones con diferenciación aberrante en las que se sobreexpresa la proteína p16, como se puede ver en la metaplasia escamosa y aisladas células endocervicales. La combinación de anticuerpos detectando p16 y Ki-67, marcador de la progresión del ciclo celular, permite identificar las células verdaderamente transformadas por el HPV-HR.^(11,12,16)

Como se vio en la Tabla 1, se realiza marcación en 196 casos de LSIL con sospecha de mayor lesión y 189 casos de HSIL-CIN2. El proyecto LAST propone marcación con p16 para lesiones HSIL-CIN2. En esta serie hemos incluido para marcación este subgrupo de lesiones LSIL con sospecha de mayor lesión en base a las dificultades diagnósticas mencionadas en la histología.

En el Gráfico 1 y Tabla 2, en las 196 lesiones que se diagnostican por histología como LSIL+?, 46 (23%) de los casos son negativos para HPV-HR. Ciento cincuenta casos son positivos para infección HPV-HR; se reclasifican como HSIL en 80 casos (41%) y se confirman como LSIL 70 casos (36%). Estos 70 LSIL con positividad para infección HPV-HR se observan en general en el contexto histológico de un epitelio estratificado maduro con sus estratos superficiales conservados y que presentan en grado variable las alteraciones características de acción viral HPV.

Ciento ochenta y nueve (189) lesiones que se diagnostican por histología como HSIL-CIN2 presentan marcación positiva para HPV-HR y se reclasifican confirmando el diagnóstico histológico de HSIL-CIN2 en 164 casos (87%) y LSIL 24 casos (12,5%). A diferencia de otros autores,^(11,18,25) señalamos la alta concordancia en esta serie de marcación positiva HPV-HR y el diagnóstico histológico inicial de HSIL-CIN2.

Si analizamos en conjunto el grupo de 385 biopsias diagnosticadas como LSIL+? y HSIL-CIN2 a las que se les hizo marcación vemos que 47 casos (12%) son negativos para HPV-HR. Trescientos treinta y ocho casos (338, 88%) son positivos para HPV-HR. Se destaca que en este grupo positivo se reclasifican como LSIL 94 casos (28%) y 244 casos (72%) como HSIL-CIN2. Ver Diagrama 1.

En el diagnóstico histológico de LSIL con dudas de mayor lesión es donde más incide la variabilidad de la interpretación histológica por lo que es necesario considerar todos los diagnósticos diferenciales que se han mencionado. Se debe recordar la presencia de cortes tangenciales del epitelio que dan imágenes de aumento aparente del número de capas basales y parabasales, confiriendo un aspecto inmaduro. Además se pueden observar algunas mitosis en los epitelios reactivos/reparativos, inflamación, presencia de hiperchromasia e irregularidad de la distribución nuclear, elementos que pueden ser origen de sobrediagnóstico histológico de HSIL.

Destacamos que 23% de casos de LSIL con dudas de mayor lesión son negativos para HPV-HR y puede tratarse de lesiones de bajo grado, LSIL, por infecciones por HPV de bajo riesgo (HPV-LR).

La información obtenida de la base de datos permitió analizar el tipo de seguimiento realizado como se muestra en el Gráfico 2. En los 198 casos con diagnóstico histológico e inmunomarcados, a 168 se les hizo tratamiento ablativo mediante conización LEEP o quirúrgica en un plazo no mayor a 4 meses; 165 casos corresponden a biopsias previas con marcación HPV-HR positiva y 3 casos con marcación negativa. A sólo 30 casos se les realiza biopsia y/o LEC post marcación.

El Diagrama 2 muestra los resultados de la histología en los 58 conos realizados en el grupo de LSIL con sospecha de mayor lesión. En los 3 casos con marcación negativa HPV-HR los conos muestran lesiones LSIL y al analizar los antecedentes se encuentran tests citológicos de Papanicolaou con diagnóstico LSIL, ASC-H o HSIL-CIN2 reiterados y biopsias LSIL.

Cincuenta y cinco (55) casos son posi-

tivos HPV-HR. En las 11 biopsias y/o LEC con LSIL se encuentran 8 HSIL (6 CIN2 y 2 CIN3) y 3 LSIL. En las 44 biopsias y/o LEC con HSIL se encuentran 29 HSIL (20 CIN2 y 9 CIN3) y 15 LSIL.

Importa destacar que al considerar en conjunto estas 55 conizaciones se encuentra 33% LSIL (18/55) y 67% HSIL (37/55).

El Diagrama 3 muestra los resultados de la histología en los 110 conos realizados en el grupo de HSIL-CIN2, positivos para HPV-HR. Al reclasificar las biopsias luego de la marcación resultan 6 casos con LSIL y 104 HSIL. En los 6 casos de biopsias y/o LEC con LSIL se encuentran 4 HSIL (3 CIN2 y 1 CIN3) y 2 LSIL. En las 104 biopsias y/o LEC con HSIL los conos muestran 93 HSIL (69 CIN2 y 24 CIN3) y 11 LSIL.

Importa destacar que al considerar en conjunto estas 110 conizaciones se encuentra 12% de LSIL (13/110) y 88% HSIL (97/110).

La literatura describe el hallazgo de lesiones HSIL-CIN3 o mayores en estudios subsiguientes a la marcación con p16 y/o Ki-67. Maniar KP, Nayar R, et al., 2015,⁽²³⁾ encuentran 26% de lesiones CIN3 o más en los conos subsiguientes siendo esta cifra de 28% para Miralpeix et al., 2016.⁽¹⁸⁾ En esta serie se encuentra CIN3 en 36 de 134 conos con HSIL (27%), lo que coincide con los valores aportados por los autores. Ver Tabla 3.

Como se señala en la literatura y en las recomendaciones LAST la marcación tiene importancia en la reclasificación de las lesiones "equivocas" para lograr un diagnóstico histológico más certero y que permita predecir lesiones más severas en estudios subsiguientes.

En esta serie de casos positivos para HPV-HR y con seguimiento por conización en un plazo no mayor a 4 meses, reiteramos el hallazgo de 81% (134 casos) de HSIL, CIN2 y CIN3 y 19% (31 casos) de LSIL. (Diagrama 4).

Cuando la marcación resulta negativa, no se debe descartar que las lesiones puedan ser causadas por HPV-LR (HPV de bajo riesgo).⁽⁷⁾ El 80-85% de los LSIL se deben a infección HPV-HR, siendo el 15-20% restante LSIL verdaderos causados por HPV de Bajo Riesgo. La prevalencia de HPV en lesiones de bajo grado y de grado elevado es similar, aproximadamente 80-90%.^(5, 26-32)

CONCLUSIONES

La serie analizada comprende 416 casos de biopsias y legrados endocervicales, realizando marcación p16/Ki-67 a 385 casos. Trescientos treinta y ocho (338, 88%) fueron positivos para HPV-HR y 47 (12%) negativos. En 165 conos estudiados en pacientes portadoras de HPV-HR se encontraron 134 casos (81%) de HSIL, correspondiendo a CIN2 98 casos (73%) y a CIN3 36 casos (27%); 19% fueron conos con LSIL. No se encontraron carcinomas invasores.

Se destaca la alta concordancia, 87%, entre el diagnóstico morfológico con HE de HSIL-CIN2 y la marcación positiva HPV-HR. En el grupo LSIL con sospecha de mayor lesión por HE y marcación positiva para HPV-HR el hallazgo de lesiones HSIL-CIN2 es de 41%.

Distintos autores investigan la capacidad de la marcación con p16/Ki67 y de otros marcadores, para predecir la presencia de lesiones más severas en estudios subsiguientes. En esta serie que analiza los hallazgos en conos realizados en los casos positivos p16/Ki-67 la presencia de HSIL es de 81% e incluye lesiones de CIN2 y CIN3.

Estos resultados señalan que las pacientes portadoras de infecciones HPV-HR deben ser seguidas estrechamente por la posibilidad de presentar lesiones HSIL. Sin embargo, el método de marcación con p16 no tiene un rol claro en la reclasificación con la finalidad de bajar el grado lesional ya que la histología final mostró lesiones de menor grado en menos del 10% de las conizaciones.

De acuerdo a resultados de la literatura y de esta serie la incorporación de esta metodología de marcación histológica no sólo puede tener un lugar en la predicción de lesiones más severas en estudios subsiguientes, sino que también permite la estratificación de las pacientes para seleccionar su mejor seguimiento y tratamiento.

La biomarcación con p16/Ki-67 de las lesiones cervicales escamosas asociadas a la infección por el virus del papiloma humano, es una herramienta de seguridad que complementa el diagnóstico histológico con HE.

Bibliografía

- 1 Barrios E & Garau M. Cancer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *An Facultad Med (UnivRepúbUrug)*. 2017;4(1):9-47
- 2 Lim S, Lee MJ, Cho I, Hong R, Lim S. Efficacy of p16 and Ki-67 immunostaining in the detection of squamous intraepithelial lesions in a high-risk HPV group. *Oncol Lett*. 2016 Feb;11(2):1447-1452.
- 3 ZurHausen H (1977) Human Papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 78:1-30
- 4 Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2 (5):342-350
- 5 Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnet BM. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. (6ª edición). 2011. New York DodrechtHeilderberg London. Springer. Chap 5 Precancerous Lesions of the Cervix. Wright T, Ronnett B, Kurman R, Ferenczy A. 194-252
- 6 Solomon D. El Sistema Bethesda para informar la citología cervical. Nayar R, Wilbur D. C. Ed Journal, 3a edición, 2016
- 7 Kurman RJ, Carcangiu ML, Simon Harrington C, Young RH. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4th Edition. IARC. 2014, Chap 7 Squamous cell tumors and precursors. p172-182.
- 8 Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. European CINtec Histology Study Group: Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2010;133:395-406.
- 9 Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16:205-242.
- 10 Clinton LK, Miyazaki K, Ayabe A, Davis J, Tauchi-Nisshi P, Shimizu D. The LAST guidelines in clinical practice: implementing recommendation for p16 use. *Am J Clin Pathol*. 2015 Dec;144(6):844-9
- 11 Torres FJ, Alameda F, Ordi J, Costa I. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico y en el manejo de las lesiones de cuello uterino. *Rev Esp Patol* 2012; Vol 45:86-95.
- 12 Ziemke P. p16/Ki-67 Immunocytochemistry in Gynecological Cytology: Limitations in Practice. *Acta Cytol*. 2017;61(3):230-236.
- 13 Ziemke P, Marquardt K, Griesser H: Predictive value of the combined use p16/Ki-67 immunocytochemistry in low-grade squamous intraepithelial lesions. *Acta Cytol*. 2014;58:489-494.
- 14 Schmidt D, Bergeron CH, Denton KJ, et al. p16/Ki-67 Dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL. *Papanicolaou cytology*. *Cancer Cytopathol* 2011;119:158-166.
- 15 Roche CIN Tec plus 2013-12-11
- 16 Bergeron C, Von Knebel M. The role Cytology in the 21st Century: The integration of Cells and Molecules. *Acta Cytol* 2016; 60:540-542.
- 17 Pinto AP, Crum CP, Hirsch M. Molecular Markers of Early Cervical Neoplasia. *Diagn Histopathol (Oxf)*. 2010 October 1; 16(10):445-454.
- 18 Miralpeix E, Solé-Sedeño JM, Mancebo G, Lloveras B, Bellosillo B, Carreras R, Alameda F. Value of p16 (INK4a) and Ki-67 Immunohistochemical Staining in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 Biopsies as Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 in Cone Results. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2016 Feb;38(1):1-8.
- 19 Hariri J, Oster A. The Negative Predictive Value of p16ink4a to Assess the Outcome of Cervical Intraepithelial Neoplasia 1 in the Uterine Cervix. *Int J Gynecol Pathol*. 2007; 26:223-228.
- 20 Wang SS, Trunk M, Schiffman M et al. 2004. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(8):1355-1360.
- 21 Zhang Q, Kuhn L, Denny LA et al. 2007. Impact of utilizing p16INK4a immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening tests. *Int J Cancer* 120(2):351-356.
- 22 Galgano M, Castle P, Atkins A, Brix W, Nassau S, Stoler M. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. *Am J Surg Pathol*. Vol 34,(8):1077-1087
- 23 Isaacson C, Kessis TD, Hedrick L et al. 1996. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 56(4):669-674.
- 24 Queiroz C, Silva TC, Alves VA et al. 2006. P16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesion. *Pathol Res Pract* 202(2):77-83.
- 25 Maniar KP, Sanchez B, Paintal A, Gursel D, Nayar R. Role of the Biomarker p16 in Downgrading –IN2 Diagnoses and Predicting Higher-grade Lesions. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:1708-1718.
- 26 de Sam Lazaro S, Newbill CP, Berlin M, Morgan TK. P16 Staining of Cervical Biopsies May Decrease the Frequency of Unnecessary Loop Electrosurgical Excision Procedures. *J Low Genit Tract Dis*. 2016 Jul;20(3):201-6.
- 27 Cheah PL, Nazarina AR, Teoh KH, Looi LM. Correlation of p16INK4a immunorexpression and human papillomavirus (HPV) detected by in-situ hybridization in cervical squamous neoplasia. *Malays J Pathol*, 2016 Apr;38(1):33-8
- 28 Wright TC, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, Ridder R. Triage of HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol* 2017 Jan;144(1):51-56.
- 29 Zhong P, Li J, Gi Y, Liu Y, Wang A, Sun Y, Lu L. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict high risk human papillomavirus infection with CIN1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Mar 1;8(3):2979-2986.
- 30 Gajanin R, Gajanin Z, Gajanin V, Gojkovic Z, Ljubojevic V. Immunohistochemical expression of p16INK4a in Inflammatory, Preneoplastic and Neoplastic Cervical Lesions. *Med Pregl*. 2015 Mar-Apr;68(3-4):85-92.
- 31 Kanthiya K, Khunrarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3201-6.

- 32 Miyamoto S, Hasegawa J, Morioka M, Hirota Y, Kushima M, Sekizawa A. The association between p16 and KI-67 immunohistostaining and the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. Int J Gynaecol Obstet. 2016 Jul;34(1):45-8.