

## Lesión premaligna escamosa del cuello uterino, un enfoque actualizado

Fernando E. de la Torre Rendón\*

### RESUMEN

La nomenclatura y concepto de las lesiones premalignas del epitelio escamoso del cuello uterino han evolucionado en los últimos 32 años, a partir de la detección del VPH en las atipias coilocíticas y lesiones displásicas reportadas por Meisels y su grupo, y Puroola y Salvia. En este tiempo se ha revelado la falta de reproducibilidad del diagnóstico histopatológico y el uso heterogéneo de los criterios de clasificación, tanto para la histología como para citología. Entre los progresos relevantes se encuentran las clasificaciones de Richart y el Sistema Bethesda. Con el desarrollo de la inmunohistoquímica y biología molecular se ha comprendido la patogenia y evolución de estas lesiones y han provocado la incorporación de diversos marcadores moleculares para establecer el diagnóstico histológico y citológico, desde el genoma viral hasta la alteración de proteínas celulares por la infección de VPH (p16) y marcadores de proliferación o maduración celular (Ki-67, p63 y ciclina E). Este estudio revisa la evolución conceptual y tecnológica de las nomenclaturas de lesiones intraepiteliales del cuello uterino, además de proporcionar información actualizada de los criterios de diagnóstico histológico y el uso de los marcadores moleculares.

**Palabras claves:** NIC, lesión intraepitelial escamosa, p16, condiloma.

### ABSTRACT

In the past 60 years there has been a development of several classifications and enlightening information on premalignant squamous lesions of the cervix uteri. Since the simultaneous disclosure that human papillomavirus (HPV) was involved in cervical dysplasias and so-called "koilocytic atypias" by Meisels et al. and Puroola y Salvia 32 years ago, the growth of knowledge and technology is enormous. Along this time the lack of reproducibility and discordance of cytological and histopathological diagnosis has been evident. Two breakpoints were the proposal of the Richart's nomenclature for CIN and the cytological classification of Bethesda. Advances in immunocyto-histochemistry and molecular biology imprinted the new style of histological and cytological diagnosis complemented with molecular markers, from HPV genome to protein markers for molecular disarrangements during the oncogenic process: p16. Also the identification of overexpression of proliferation and cell maturation markers: p63, Ki-67 and cyclin E. This conceptual and technological evolution is discussed and an up-to-date review of the histological criteria of diagnosis and the use of the current molecular markers as well.

**Key words:** CIN, intraepithelial squamous lesion, p16, borderline atypia, condiloma.

### NOMENCLATURA DE LAS LESIONES ESCAMOSAS PREMALIGNAS

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

- 1) La clasificación de displasias (Reagan<sup>1,2</sup> 1953)
- 2) La clasificación de neoplasia intraepitelial cervical o NIC (Richart<sup>3</sup> 1967)
- 3) La clasificación del Sistema Bethesda<sup>4,5</sup> (1988)

La Organización Mundial de la Salud, en su Clasificación Histológica Internacional de Tumores<sup>6</sup> de 1975, incorporó la clasificación de displasias. En su penúltima revisión<sup>7</sup> (1994) aceptó, indistintamente, la nomenclatura de Richart<sup>3</sup> (NIC) y Reagan<sup>4</sup> (displasias); sin embargo, a partir de 2003<sup>5</sup> se aprobó la clasificación de NIC y la de *lesiones intraepiteliales escamosas*, según la propuesta del Sistema Bethesda.<sup>4,5,8</sup> Aunque la nomenclatura de este último se propuso para el estudio citopatológico, por razones naturales se incorporó a la histopatológica. La Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA2-1994)<sup>9</sup> estableció, de acuerdo con la OMS, denominar a las alteraciones

\* Sección de Patología Quirúrgica, Hospital Regional Adolfo López Mateos, ISSSTE, México, DF.

Correspondencia: Dr. Fernando E. de la Torre Rendón. Rodríguez Saro 613, colonia Del Valle, CP 03100, México, DF. E-mail: dlt46@prodigy.net.mx

Recibido: julio, 2008. Aceptado: septiembre, 2008.

La versión completa de este artículo también está disponible en: [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)

pre malignas como displasias o NIC y, a partir de 2007 se incluyó la nomenclatura de Bethesda.<sup>10</sup>

Además de estas clasificaciones, que se basan fundamentalmente en la evaluación del grado de la alteración morfológica, Meisels y colaboradores<sup>11-13</sup> propusieron, entre 1976 y 1981, dos alteraciones morfológicas específicas: 1) condiloma ordinario y 2) condiloma atípico.

Esta nomenclatura, que alude al diagnóstico etiológico, es una definición más precisa del término propuesto por Koss (*atipia coliocítica*).<sup>14</sup> Aunque dichas categorías definen diferentes grados de alteración, la terminología se refiere, evidentemente, a la infección producida por el virus de papiloma humano (VPH) y se mencionará como clasificación eminentemente etiológica. La consecuencia de estos dos enfoques a la misma alteración, uno relacionado con el grado histológico y el otro a la causa, ha sido la combinación de ambos conceptos en la nomenclatura diagnóstica cotidiana (por ejemplo: condiloma ordinario y displasia moderada o condiloma atípico y NIC 3). Otros eluden la terminología etiológica y, siguiendo la vieja escuela, simplemente clasifican el grado de la lesión como displasia o neoplasia intraepitelial.

Si se considera que en la mayor parte de las lesiones premalignas del cuello uterino, cualquiera que sea su grado o cantidad de coliocitos, se ha demostrado por técnicas de biología molecular el genoma del VPH, entonces el diagnóstico preciso será la identificación del agente causal (VPH) mediante técnicas moleculares específicas; de lo anterior, resulta que el diagnóstico etiológico (infección por VPH), con base en la morfología, tiene limitaciones. Cuando hay coliocitos irrefutables, el diagnóstico es confiable mediante citología o biopsia; sin embargo, la ausencia de coliocitos no excluye la infección viral, como en las displasias intensas o NIC de alto grado.

El tratamiento actual de estas lesiones no se relaciona con la demostración causal del proceso, sino por su grado histopatológico y localización anatómica, además de la extensión en relación con el canal cervical.

La nomenclatura, con base en el grado de alteración (histológica o citológica), tiene elementos pronósticos y de riesgo más útiles en la práctica clínica. Es cierto que el diagnóstico etiológico complementa la información de la enfermedad; no obstante, debe considerarse que limitar este concepto a los casos en los que haya coliocitos, es una imprecisión completa. El elemento más importante para la decisión clínica se tiene con el grado de la lesión,

independientemente de la detección o no del virus.

La nomenclatura, por grados, se ha simplificado desde que se establecieron las propuestas del grupo del Sistema Bethesda<sup>4,5</sup> de la siguiente manera:

- 1) Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado:
  - a) Infección por VPH (condiloma ordinario)
  - b) Displasia leve o NIC 1
- 2) Lesión intraepitelial escamosa de alto grado:
  - a) Displasia moderada o NIC 2
  - b) Displasia intensa o NIC 3
  - c) Carcinoma epidermoide *in situ* (debe incluirse, también, al condiloma atípico)

Las ventajas más simples de esta terminología son:

- a) Evita la discordancia entre diferentes patólogos al definir únicamente dos variables.<sup>15-18</sup>
- b) Mejor comprensión para clínicos y pacientes.
- c) Mayor utilidad clínica, ya que los médicos deben enfrentarse casi siempre a dos opciones de tratamiento (seguimiento o extirpación conservadora).
- d) Correlación entre los dos grados, el riesgo de progresión y tipos virales.

La clasificación en sólo dos grados es más cercana a la posibilidad real del diagnóstico morfológico y de la terapéutica actual, además de la biología de las lesiones premalignas. Si es posible incluir en el informe histopatológico el diagnóstico causal, comprobado o presuntivo, no altera la decisión clínica. No se recomienda usar la nomenclatura de Bethesda para lesiones premalignas fuera del cuello uterino, ya que es diferente la historia natural y significado de las neoplasias intraepiteliales y los condilomas de la vulva, ano o pene.

La nomenclatura de Bethesda se ha filtrado, naturalmente, al diagnóstico histopatológico, lo que tiene la lógica de nomenclatura unitaria para las enfermedades, independientemente del procedimiento utilizado para identificarlas. No obstante, la clasificación de NIC para histopatología sigue usándose ampliamente en Estados Unidos.<sup>19</sup> La clasificación de Richart está firmemente arraigada en la histopatología, pero el uso de dos clasificaciones distintas para la misma enfermedad parece insensato. Quizás emplear *neoplasia intraepitelial de bajo y alto*

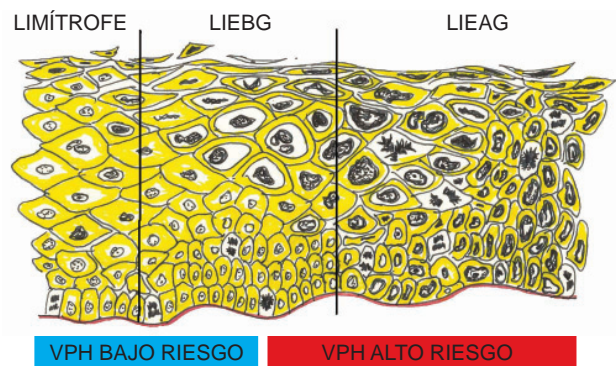
grado, en sustitución de *lesión intraepitelial escamosa de bajo y alto grado*, puede vincular a la costumbre y el pragmatismo. Una recomendación práctica para el reporte histopatológico es incluir la nomenclatura equivalente de Bethesda, aunque se asiente el diagnóstico de NIC o los grados de condiloma como primera categoría. Es conveniente para fines estadísticos, comprensión de los clínicos y pacientes, y para la correlación citohistológica. Contrario a lo que ocurre en vulva, el ano o pene, considerar como alteraciones independientes los condilomas del cuello uterino y la neoplasia intraepitelial del mismo, es una costumbre poco sustentable hoy en día y carente de significado clínico. La obsesión por esta separación implica tiempo de observación que no reditúa en ventajas prácticas. Son dos enfoques de clasificación complementarios y no excluyentes. No debe haber diagnóstico de *condiloma* en el cuello uterino sin graduarse histológicamente.

#### CONCEPTO ACTUAL DE LA LESIÓN ESCAMOSA PREMALIGNA DEL CUELLO UTERINO

La relación entre el virus del papiloma humano (VPH) y las lesiones premalignas del cuello uterino se estableció en 1976, cuando Meisels y su grupo,<sup>11,12</sup> y Purola y Savia<sup>20</sup> observaron lesiones planas en la mucosa, con características morfológicas (coilocitosis) semejantes a las de condilomas de los genitales externos, y la demostración subsiguiente del VPH mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica. En la siguiente década, con el progreso de las técnicas de recombinación de ADN *in vitro* y la identificación del genoma del VPH fue posible demostrar el genoma viral en la mayor parte de las lesiones escamosas premalignas.

En la actualidad se acepta el papel importante del VPH en todas las variantes morfológicas de NIC o lesión intraepitelial escamosa, con diferentes patrones de alteración molecular mediante estudios de inmunohistoquímica o genética molecular. El predominio de 15 tipos principales de VPH de alto riesgo, en tejidos de carcinoma epidermoide invasor en mujeres de diferentes regiones geográficas,<sup>21,22</sup> y la escasa frecuencia (< 10 %) del de bajo riesgo ha permitido considerar dos tipos de enfermedad por dicho virus: aquella producida por VPH que no se encuentra en el cáncer invasor y, en consecuencia, el riesgo de transformación cancerosa es mínima (enfermedad por VPH de bajo riesgo); y la otra corresponde a

la producida por un virus de mayor potencial oncogénico detectado en pacientes con cáncer (enfermedad por VPH de alto riesgo). Esta nueva visión de la enfermedad obliga a reordenar el significado de las lesiones premalignas en este contexto. Si bien, dentro del Sistema Bethesda se encuentra un primer enfoque dual con base en su patrón morfológico. Esto es parcialmente correcto, en relación con su potencial de riesgo. Si se considera que los VPH de alto riesgo producen lesiones de bajo y alto, y que los VPH de bajo riesgo generalmente se asocian con lesiones de bajo grado, la figura 1 puede ser comprensible.



**Figura 1.** Esquema que muestra la relación entre la clasificación morfológica y el grupo de riesgo de VPH.

Como se aprecia, el diagnóstico de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) traduce dos situaciones diferentes de riesgo asociado con la evolución a cáncer, y su valor pronóstico es limitado. Entre 50 y 85% de las LIEBG se asocian con VPH de alto riesgo,<sup>23-35</sup> demostrado por técnicas de biología molecular (PCR, HC2 o ISH). El rango de positividad probablemente refleja la inconsistencia y diferente metodología del diagnóstico morfológico de LIEBG. Sólo la identificación del tipo de VPH permite establecer el riesgo de progresión. El diagnóstico de lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG) implica, generalmente, infección por VPH de alto riesgo y el pronóstico del diagnóstico morfológico es alto. En otras palabras, el diagnóstico de LIEBG no implica, necesariamente, bajo riesgo y su significado puede ser tan malo como el diagnóstico de LIEAG, en cuanto a riesgo de progresión se refiere, a menos que se identifique el tipo de VPH implicado.

El significado clínico de esta subdivisión es indiscutible si se plantean diferentes esquemas de tratamiento y seguimiento para la mujer con enfermedad por VPH de bajo o

alto riesgo. Si el objetivo médico principal es disminuir la mortalidad por carcinoma cervicouterino, el mayor esfuerzo debe ser hacia el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por VPH de alto riesgo, especialmente en los programas de salud poblacional. El enfoque principal del diagnóstico actual es identificar la enfermedad de VPH de alto riesgo y sus expresiones morfológicas: LIEAG y un grupo de LIEBG.

Es poco probable que el modelo tradicional de precáncer-cáncer (NIC-1, NIC-2, NIC-3 carcinoma invasor) sea vigente hoy en día.<sup>26</sup>

### CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

Se ha señalado la correspondencia limitada entre enfermedad por VPH de diferente riesgo y los patrones morfológicos, especialmente la LIEBG. No obstante, la buena correspondencia de LIEAG con los VPH de alto riesgo le da un gran valor al diagnóstico morfológico preciso. Las alteraciones generales de lesiones premalignas, histológicas y citológicas se resumen en los cuadros 1 y 2.

**Cuadro 1.** Alteraciones histológicas generales de las lesiones intraepiteliales escamosas del cuello uterino

<i>Criterios mayores</i>	<i>Criterios menores</i>
Anisoneuclosis	Mitosis por arriba delestrato basal
Pleomorfismo nuclear	Mitosis anormales
heterocromasia	Proliferación de células basales
	Engrosamiento epitelial (acantosis)
	Papilomatosis
	Paraqueratosis

Trejo O, Hurtado H, de la Torre FE, Ojeda J, Tamariz E, López JL. Atlas de Patología Cervical, México, 1999;pp:58 (reproducida con autorización).

El diagnóstico microscópico consiste en la combinación de diversas alteraciones primarias, enunciadas en los cuadros anteriores: mientras más de estas aparezcan en una lesión, la confiabilidad del diagnóstico será mayor. De igual manera, a mayor intensidad de los cambios, mayor será el grado de la lesión.

Para realizar el diagnóstico histológico hay alteraciones con mayor peso que otras, señaladas como criterios mayores, pues su sola presencia es suficiente para clasificarlas como lesiones intraepiteliales, aún sin las otras. Al igual que en la citología, las alteraciones nucleares tienen ma-

**Cuadro 2.** Alteraciones citológicas generales de las lesiones intraepiteliales escamosas del cuello uterino

#### **Nucleares**

Macronucleosis  
Hendiduras y lobulaciones  
Contorno angulado  
Irregularidad del contorno nuclear  
Hiperchromatismo  
Gránulos gruesos de cromatina  
Engrosamiento de la membrana nuclear  
Anisonucleosis  
Heterocromasia

#### **Citoplásmicas**

Halos perinucleares

Trejo O, Hurtado H, de la Torre FE, Ojeda J, Tamariz E, López JL. Atlas de Patología Cervical, México, 1999;pp:59 (reproducida con autorización).

yor significado que la alteración de la estructura. Deben tenerse las preparaciones adecuadas, cortes seriados y buena capacitación citológica; disponer de anticuerpos para el estudio de inmunohistoquímica (Ki 67, p63 y p16) y la correlación con biología molecular para enfrentar los casos problema.

Para efectuar el diagnóstico citológico, la combinación de las diferentes alteraciones permite una clasificación confiable. Los cambios señalados en los incisos 1 a 9 constituyen lo que se denomina *atipia nuclear o discariosis*. Pueden encontrarse con o sin halos perinucleares. Si coexisten con los halos perinucleares (con márgenes delineados) se denomina *coilocitosis*.

La coilocitosis no se enlistan como alteración primaria, ya que es una combinación de halos perinucleares con atipia nuclear. Es una alteración secundaria, característica de infección por VPH. Puede observarse o no en cualquier grado de lesión intraepitelial. Cuando coexiste, indudablemente significa una lesión premaligna y debe graduarse. Se recomienda la revisión actualizada de Nucci y Crum,<sup>27</sup> así como los magníficos textos de Fu<sup>28</sup> y Crum<sup>29</sup>.

### **Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado**

Corresponde a la displasia leve, NIC I o condilomas ordinarios. La mayor parte de estas lesiones muestra características de condilomas ordinarios y hay coilocitosis (cuadro 3).<sup>30</sup>

Un subtipo especial LIEBG lo constituye la metaplasia papilar inmadura o condiloma inmaduro.<sup>31-33</sup> Es una variante poco común o quizá mal diagnosticada como cervicitis o pólipo cervical. Se asocia con infección por VPH de



**Cuadro 3.** Características de la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

Habitualmente hay coilocitosis  
 Proliferación de células basales (hasta 30% del espesor del epitelio)  
 Actividad mitótica, comúnmente restringida a la capa basal  
 La atipia predomina en las capas medias y superficiales del epitelio  
 Poca o nula atipia de células basales

Puede haber grados variables de papilomatosis, paraqueratosis, queratosis o engrosamiento del epitelio, o extensión hacia las glándulas endocervicales. Trejo O, Hurtado H, de la Torre FE, Ojeda J, Tamariz E, López JL. Atlas de Patología Cervical, México, 1999; pp:60 (reproducida con autorización).

bajo riesgo y, dado que la atipia es mínima, el diagnóstico solamente se realiza en conocimiento de la información colposcópica. El epitelio es semejante a la metaplasia escamosa inmadura con mínima atipia (similar a la metaplasia inmadura plana que es mucho más frecuente). Si la configuración papilar no es clara en el material histológico o si la información clínica es inadecuada, puede clasificarse como negativo a LIE. La inmunohistoquímica para Ki-67 puede ser útil.

**Lesión intraepitelial escamosa de alto grado**

Corresponde a displasia moderada, intensa; carcinoma epidermoide *in situ*, NIC II, III y condiloma atípico. Puede haber coilocitosis o no (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Características de la lesión intraepitelial escamosa de alto grado

Proliferación de células inmaduras atípicas (30 a 100% del espesor del epitelio)  
 Atipia moderada a intensa en todo el espesor del epitelio, incluida la capa basal que se encuentra desorganizada  
 Actividad mitótica aumentada y con figuras por arriba de la capa basal  
 Mitosis atípicas  
 Puede haber coilocitosis, comúnmente asociada con atipia intensa y pleomorfismo nuclear

Puede haber grados variables de papilomatosis, paraqueratosis, queratosis o engrosamiento del epitelio, o extensión hacia las glándulas endocervicales.

Trejo O, Hurtado H, de la Torre FE, Ojeda J, Tamariz E, López JL. Atlas de Patología Cervical, México, 1999 (reproducida con autorización).

Según el patrón morfológico se señalan dos variantes, una con evolución parcial de maduración y coilocitosis con atipia intensa, reflejada por pleomorfismo e hiper cromasias nucleares intensos (NIC 2 o condiloma atípico); y la otra

con inmadurez en más de 60% del epitelio, sin coilocitosis y con menor grado de pleomorfismo nuclear (NIC 3).

La metaplasia inmadura atípica plana<sup>27,34</sup> puede o no corresponder a LIE. Habitualmente son difíciles de clasificar sin el estudio inmunohistoquímico o la identificación molecular de VPH; la reacción de p63 muestra positividad en todas las células, como corresponden a una proliferación inmadura.<sup>28</sup> La evaluación de actividad proliferativa es intensa mediante Ki-67, sugiere LIE. Según el grado de atipia, puede corresponder a LIEBG o LIEAG. Es conveniente aplicar p16 o correlacionar estos resultados con HC II/captura de híbridos.

La denominada *displasia eosinofílica* es una subvariante de LIEAG descrita en el 2004.<sup>35</sup> No tiene significado clínico especial y únicamente es una versión inmadura de LIE en el epitelio metaplásico, con citoplasma acidófilo abundante (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Principales diferencias morfológicas entre lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado

	Bajo grado	Alto grado
Coilocitosis	++++	++/-
Atipia	Leve a moderada	Moderada a intensa
Capa basal	Ordenada y sin atipia	Desorganizada y con atipia
Hiperplasia basal	< 30%	>30 %
Mitosis	Capa basal	Basales y suprabasales
Mitosis atípicas	No hay	+/-

**DESEMPEÑO EN EL DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO ¿ESTÁNDAR DE ORO?**

La evaluación de una paciente con sospecha de lesión intraepitelial escamosa de cualquier grado (LIE) requiere, de acuerdo con consensos internacionales y de la misma Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA2-1994):<sup>9,10</sup> estudios de citología, colposcopia y biopsia. Estos procedimientos pueden complementarse con biología molecular e inmunohistoquímica. La citología y colposcopia tienen variantes de mayor o menor aceptación (citología convencional, citología de base líquida, cervicografía, microcolpohisteroscopia); sin embargo, los procedimientos básicos y generalmente aceptados en la mayor parte de los países son la citología y colposcopia convencio-

nales, además del estudio histopatológico con tinción de hematoxilina-eosina. La sensibilidad y especificidad de cada uno y sus variantes es versátil, según el diagnóstico final que se pretende evaluar (infección por VPH, LIE o carcinoma invasor) y la institución. Es bien conocido que la sensibilidad y especificidad de la citología convencional y colposcopia muestran valores recíprocos; no obstante, la sensibilidad de la colposcopia es mejor (87 a 90%) que la citología (60 a 70 %), pero la especificidad de ésta última es mayor (88 a 99 vs 69%);<sup>36,37</sup> los mejores valores se consiguen al combinar los dos procedimientos. El estudio histopatológico se considera el indicador más confiable de la presencia o ausencia de la enfermedad (LIE); sin embargo, deben considerarse los siguientes factores que influyen en su eficiencia:

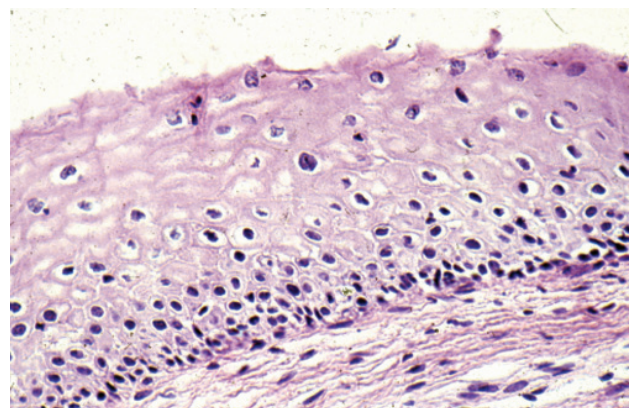
- 1) Calidad, posibilidades y limitaciones de la colposcopia para seleccionar las zonas de lesión probable.<sup>38</sup>
- 2) Las lesiones por VPH muestran un espectro histológico amplio y la separación entre LIEBG y atipia reactiva o entre LIEAG y LIEBG puede ser muy subjetiva en ciertos casos.
- 3) Los simuladores histológicos de LIE pueden resultar falsos positivos, difíciles de solucionar exclusivamente en opiniones individuales.<sup>27,29</sup>
- 4) La interpretación es subjetiva y su certeza está definida por la experiencia del observador y los criterios que aplica, además de la calidad técnica de las preparaciones histológicas.<sup>26</sup>
- 5) La coincidencia entre observadores es mala en algunos patrones morfológicos.<sup>15-18,39</sup>

La falta de correlación citohistológica o colpohistológica no necesariamente se debe a limitaciones de la citología o colposcopia.<sup>38,40,41</sup> Los factores mencionados pueden provocar la descalificación injusta de los procedimientos al fallar el estudio histológico. En las últimas décadas el progreso tecnológico ha pretendido mejorar el desempeño de la citología y el estudio histopatológico para establecer el diagnóstico de LIE. Afortunadamente, la mejor coincidencia, sensibilidad y especificidad se logran para la LIEAG aún sin técnicas de biología molecular o inmunohistoquímica. La mayor parte de resultados falsos positivos en histología ocurre en relación con la LIEBG.<sup>15-18,39</sup>

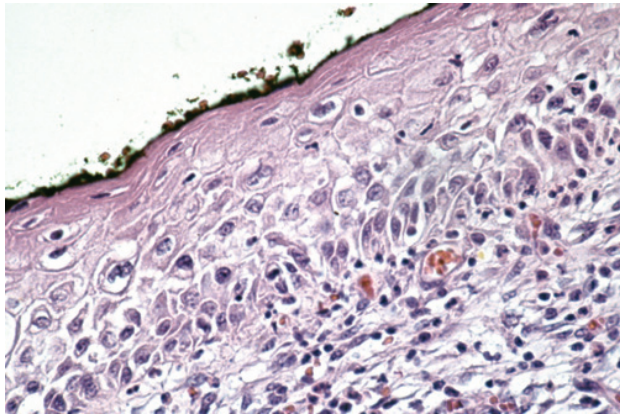
Al conocer las limitaciones del diagnóstico morfológico, citológico e histológico, se han considerado algunas

recomendaciones para disminuir el subdiagnóstico y sobrediagnóstico en la citología y la histopatología:

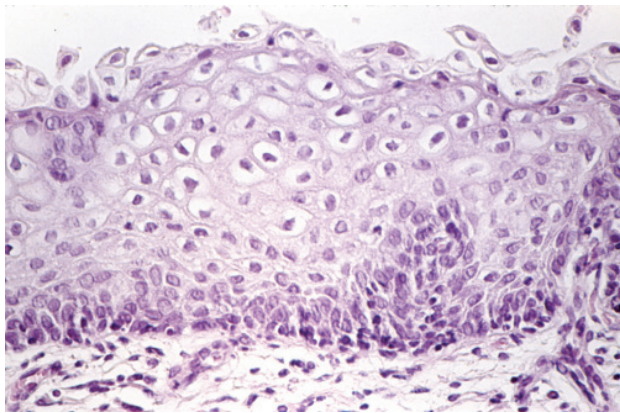
- a) Utilizar nomenclatura que exprese la imposibilidad de asegurar la LIE en algunos casos: el Sistema Bethesda ha incluido, desde 1988, ASCUS y AGUS para estas imágenes no concluyentes, y a partir de la revisión del 2001 se han convertido en ASC-US (atipia de células escamosas de significado indeterminado), ASC-H (atipia de células escamosas a favor de lesión intraepitelial escamosa de alto grado) y AG (atipia glandular). Aunque estos términos no son extrapolables a la histología, se han propuesto otros para los casos indefinidos: alteraciones sugerentes pero no concluyentes de atipia limítrofe (*borderline atypia*), atipia escamosa no diagnóstica y condiloma limítrofe (figuras 2 a 4).<sup>28-30</sup>
- b) Reforzar el estudio histopatológico convencional con técnicas de inmunohistoquímica para Ki-67, p16 o biología molecular (hibridación *in situ*). Los casos con alteraciones incompletas (cuadros 1 a 4) o leves no deben clasificarse de manera definitiva con la histología convencional; se recomienda el estudio de inmunohistoquímica (especialmente Ki-67 para sospecha de LIEBG y Ki-67 + p16 para sospecha de LIEAG),<sup>28,29</sup> la captura de híbridos (probable LIEAG?) y una segunda revisión por otro patólogo. Esta clasificación debe provocar en el reporte únicamente seguimiento clínico.
- c) Utilización de criterios y clasificaciones consensados por los expertos y las organizaciones de salud (Norma Oficial Mexicana, OMS, Sistema Bethesda).



**Figura 2.** Atipia (limítrofe) que sugiere LIEBG pero no es concluyente, es focal con halos perinucleares pero no puede concluirse coilocitosis, es mejor practicar una correlación citológica, y utilizar inmunohistoquímica y biología molecular.



**Figura 3.** Atipia escamosa limítrofe. Muestra alteraciones incompletas. El estudio de PCR fue negativo.



**Figura 4.** Atipia escamosa limítrofe, probablemente reactiva; es mínima aunque hay hiperplasia de células basales.

- d) Participación en programas y cursos formales de actualización y capacitación.
- e) Programas de control y aseguramiento de calidad.<sup>42</sup>

### BIOLOGÍA MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

En el cuadro 6 se señalan las principales pruebas para el apoyo de procedimientos convencionales. Ninguna de estas se utiliza como sustitutos de la citología, colposcopia o biopsia y son estudios complementarios. Si aceptamos que la tecnología actual permite, únicamente, dar tratamiento a las lesiones producidas por el VPH y no a la infección misma, es posible entender la relevancia del diagnóstico morfológico. La tecnología molecular aumenta la confiabilidad del análisis morfológico y agrega elementos de objetividad.<sup>28,29,43-55</sup>

Amerita especial mención la técnica de captura de híbridos (HC2),<sup>TM</sup> ya que, aunque no requiere la integridad morfológica para la demostración del ADN viral,<sup>56</sup> se considera que, para ciertas situaciones, debe utilizarse en combinación con la citología de base líquida. Su uso cada vez más extenso en la práctica clínica requiere que el patólogo no solamente se familiarice con sus principios e indicaciones sino que en el mismo laboratorio de patología realice la prueba. Es la única prueba aprobada por la FDA para uso clínico y ya se está evaluando para la detección primaria en México y otros países, combinada o seguida del estudio citológico.<sup>57</sup> Es de gran utilidad, también, para resolver los casos de falta de correlación citocolpohistológica y en el seguimiento del paciente. Su sensibilidad y valor pronóstico negativo para LIEAG es alta (90 a 100%); sin embargo, su especificidad es variable (62-96%) y valor pronóstico positivo bajo (9 a 15%).<sup>56</sup> Ya que es un procedimiento de detección viral y no de detección morfológica, pueden entenderse estos valores. Un sitio semejante lo ha ocupado la PCR, aunque con las limitantes de su excesiva sensibilidad (se requiere identificar a las mujeres con lesiones epiteliales, especialmente las de alto grado, y no indiscriminadamente a todas aquellas con infección por VPH) y falta de estandarización. Recientemente se introdujo otra prueba de detección para VPH de alto riesgo, estandarizada para uso clínico (Invader® TWT), y se encuentra en evaluación por la FDA.

Las técnicas de inmunohistoquímica (cuadro 7) e hibridación *in situ* son útiles, en diferente proporción, para:

- 1) Resolver los casos dudosos:
  - a) Atipia reactiva vs LIEBG
  - b) LIEBG vs LIEAG
  - c) Metaplasia inmadura vs LIE
  - d) Atrofia con atipia vs LIE
  - e) Metaplasia transicional vs LIE
- 2) Control de calidad.<sup>42,58</sup>

El uso de p16, un inhibidor de proliferación celular descubierto en 1993,<sup>59</sup> se ha difundido para establecer el diagnóstico desde el 2001, y se considera un buen marcador de infección por VPH de alto riesgo, ya que el bloqueo de pRb, que produce la proteína E7 del virus, evita a su vez la retroalimentación negativa de la proteína 16. Se ha propuesto que mejora la coincidencia interobservador<sup>46,51</sup> y se reporta positividad en 90 a 100% de las LIEAG,<sup>25,43,49</sup>



**Cuadro 6.** Principales diferencias moleculares de posible utilidad diagnóstica entre las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grados

	<i>Bajo grado</i>	<i>Alto grado</i>
Antígeno de VPH (cápside)	Positiva en coilocitos	Positiva en coilocitos
Ki 67	Positivo en > 30% de los núcleos, en las capas suprabasales o ambos	Intensamente positivo en > 30% de los núcleos y en > 30% del espesor del epitelio
p16	Negativa o positiva focal	Positividad en banda
p63	< 30% de espesor (basal y parabasal)	> 30% de espesor
Ciclina E	Positiva en las capas superiores	Débil o negativa
Hibridación <i>in situ</i>	VPH de bajo o alto grados	VPH de alto grado
Integración del genoma del VPH	No	Positiva
Captura de híbridos para VPH de alto riesgo	± (casi 80% relacionado con VPH de alto riesgo)	Positiva
PCR	VPH de bajo o alto riesgos	VPH de alto riesgo

**Cuadro 7.** Marcadores de inmunohistoquímica en el diagnóstico diferencial de las alteraciones intraepiteliales escamosas del cuello uterino

	<i>P16</i>	<i>Ki 67</i>	<i>P63</i>	<i>ISH</i>	<i>HC2</i>
Atipia reactiva	N	Basal	Basal	N	N
Metaplasia inmadura	N	Basal	Todo el espesor	N	N
Atrofia con atipia	N	N	Variable	N	N
Metaplasia transicional	N	Basal escaso	-	N	N
Metaplasia papilar inmadura	N	Escaso	Variable	VPH bajo riesgo	N
LIEBG	Negativo o positivo focal	Positivo en los 2/3 superiores del epitelio	< 30% de espesor (basal y parabasal)	VPH bajo o alto riesgo	Positivo
LIEAG	Positivo en banda > 30% de espesor	Intensamente positivo en todo el espesor del epitelio	> 30% de espesor	VPH alto riesgo	Positivo

N Negativo; ISH Hibridación in situ; HC2 Captura de híbridos para VPH de alto riesgo.

y en 30 a 60% de las LIEBG.<sup>25,49</sup> Sin embargo, debe entenderse que es una demostración indirecta del VPH y no la evidencia directa del agente causal. Las LIEAG pueden ser negativas a p16 (hasta 18%)<sup>25,45-47,60,61</sup> y hay lesiones no relacionadas con VPH que resultan positivas,<sup>62</sup> especialmente las glandulares benignas y malignas. En algunos estudios se ha encontrado sobreexpresión de p16 en cánceres no genitales asociados con VPH<sup>43</sup> y en carcinomas de otros órganos no relacionados con VPH. En citología pueden ser un problema los casos de atrofia, metaplasia tubaria, epitelios endometrial y endocervical o metaplasia escamosa (inclusive tricomonas) que dan positividad inespecífica a p16 y no siempre hay correlación con HC2.<sup>48,52</sup> En histología se recomienda usarlo en

conjunto con Ki-67,<sup>60</sup> ya que las lesiones de alto grado revelan, característicamente, intensa proliferación, aún con p16 negativo.<sup>55</sup> Debe graduarse la intensidad de la reacción en los estudios citológicos<sup>52</sup> e histopatológicos<sup>43,60</sup> y usar índices (*scores*) de puntuación, en citología, para eludir la positividad inespecífica en células normales.<sup>63</sup> Se recomienda adquirir experiencia en cada laboratorio con estos marcadores antes de usarse de manera regular.<sup>27</sup> Actualmente, su principal aplicación es la resolución de casos histológicos ambiguos. Su uso indiscriminado encarece, innecesariamente, los costos de la medicina; debe seleccionarse su aplicación a situaciones específicas en histopatología y la decisión dependerá del patólogo, no del clínico. El uso de p16 comparte las limitaciones de



la inmunohistoquímica en otras áreas de la patología: criterios variables por los patólogos para clasificación de los grados de NIC (esto hace difícil la comparación de resultados de diferentes trabajos, especialmente para NIC 1 y NIC 2), falta de estandarización en la graduación de la tinción (*scores*), diferentes clonas de anticuerpos y afinidad heterogénea de los anticuerpos.

Debido a que un grupo de las LIEBG son negativas a p16, su utilidad para distinguir éstas de las atipias reactivas es limitado. Se ha planteado la conveniencia de utilizar Ki-67 para estas lesiones, ya que la tasa de proliferación es más alta en las LIEBG y debe haber positividad en por menos 30% de los núcleos con o sin positividad en células de capas altas. No obstante, aún con Ki-67 hay lesiones difíciles de clasificar, porque de igual manera hay casos *límitrofes* con la inmunohistoquímica y los procesos regenerativos son todo un reto. El uso de anticuerpos contra ciclina E puede ayudar, lo mismo que anticuerpos contra antígenos de VPH, pero la sensibilidad de estos últimos es baja. Esta parte del espectro morfológico, aunque tiene ventajas con la inmunohistoquímica, requiere del análisis cuidadoso de todos los elementos (histología, inmunohistoquímica, citología y tipificación de VPH). La morfología llega a sus límites más bajos de confiabilidad en este extremo del espectro.

En citología hay varias propuestas para el uso de p16. Algunos trabajos apoyan su utilidad en la detección citológica como marcador de lesiones por VPH de alto riesgo,<sup>64,65</sup> no obstante, en esta última aplicación se requieren más evaluaciones y su uso indiscriminado no está aprobado o consensado. Su mayor evaluación ha sido para resolver casos de duda citológica, especialmente ASC-H. La citología de base líquida, complementada con marcadores moleculares (p16, ProEx C o hibridación *in situ*),<sup>25,48,52-54,64,65</sup> es una combinación que, aparentemente, mejora la sensibilidad y especificidad, pero su uso es todavía limitado por el costo, opiniones divergentes o porque su evaluación es aún incompleta. Algunos trabajos<sup>25</sup> revelan un mejor VPP de p16 + CBL que la HC2 y en otros son más efectivos que la captura de híbridos (HC2), específicamente cuando se evalúa ASC-H.<sup>48</sup> Su utilidad queda condicionada a que la toma citológica incluya las células de la lesión. Su aplicación se considera apropiada en los casos clasificados como ASC-US, ASC-H o AG.<sup>52</sup> Estudios preliminares sugieren que la identificación combinada con topoisomerasa II- $\alpha$  (TOP2A) y proteína-2 de mantenimiento de minicromo-

soma (MCM2), mediante inmunohistoquímica (ProEx C<sup>®</sup>),<sup>53,54</sup> puede ser una técnica más específica que p16. El advenimiento de las vacunas contra VPH, las campañas poblacionales de detección temprana (muchas de ellas reforzadas con técnicas moleculares de identificación de VPH) y las técnicas de biología molecular para apoyar el diagnóstico citológico e histológico, influirán en los próximos años para reducir el número de biopsias y procedimientos terapéuticos innecesarios.

#### Aseguramiento y control de calidad en histopatología

Las recomendaciones orientadas para mejorar el desempeño de los patólogos en ésta área son:<sup>42,51,58,66</sup>

- 1) Realizar una segunda revisión de los casos positivos o dudosos (preferentemente en discusión conjunta).
- 2) Revisión regular de los casos con discrepancia citopohistológica.<sup>42,67</sup>
- 3) Auditoría interna.
- 4) Auditoría externa.
- 5) Correlación de los diagnósticos con estudios de inmunohistoquímica y biología molecular.<sup>44,58</sup>

#### REFERENCIAS

1. Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y. Cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of uterine cervix. *Cancer* 1953;6:224-35.
2. Reagan JW, Hamonic MJ. The cellular pathology in carcinoma in situ: A cytohistopathological correlation. *Cancer* 1956;8:385-402.
3. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin. Obstet Gynecol* 1967;10:748-84.
4. National Cancer Institute Workshop Report. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1989;262
5. Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. 2nd ed. New York: Springer, 2004.
6. Poulsen HE, Taylor CW, Sobin LH. Histological typing of female genital tract tumours. International Histological Classification of Tumours No. 13. Geneva: World Health Organization, 1975.
7. Scully RE, Bonfiglio T, Kurman RJ, Silverberg S, Wilkinson EJ. Histological typing of female genital tract tumours. World Health Organization, International Histological Classification of Tumours. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 1994.
8. Tavassoli FA, Devilee P. Tumours of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2003.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer del cuello del útero. Diario Oficial de la Federación, Viernes 6 de marzo de 1998, México.

10. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino. Diario Oficial de la Federación, Jueves 31 de mayo de 2007, México.
11. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976;20:505-9.
12. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol* 1977;21:379-90.
13. Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, et al. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol* 1981;7-16.
14. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1956;63:1245-61.
15. Cocker J, Fox H, Langley FA. Consistency in the histological diagnosis of epithelial abnormalities of the cervix uteri. *J Clin Pathol* 1968; 21:67.
16. Bellina JH, Dunlap WP, Riopelle MA. Reliability of histopathologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Southern Med J* 1982;75:6-8.
17. Robertson AJ, Anderson JM, Beck JS, Burnett CA, Et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1989;42:231-8.
18. De Vet HC, Knipshild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, et al. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 1990;43:1395-8.
19. Wright TC, Cox JT, Massad LS, Carlson J, et al. Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:295-304.
20. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977;21:26-31.
21. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
22. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
23. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16 INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005;29:674-9.
24. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, et al. Overexpression of p16 INK4A as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:347-53.
25. Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD. The predictive value of p16INK4a and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2004;122:894-201.
26. Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnosis: an ALTS report. *Am J Clin Pathol* 2007;127:805-15.
27. Nucci M, Crum CP. Redefining early cervical neoplasia: recent progress. *Adv Anat Pathol* 2007;14:1-10.
28. Fu YS. Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva. Major Problems in Pathology, Vol. 21, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 2002.
29. Crum CP, Lee KR. Diagnostic gynecologic and obstetric pathology. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006;pp:267-320.
30. Trejo O, Hurtado H, de la Torre FE, Ojeda J, Tamariz E, López JL. Atlas de Patología Cervical, México, 1999;pp:58-60
31. Crum CP, Egawa K, Fu YS, Lancaster WD, et al. Atypical immature metaplasia. A subset of human papillomavirus infection of the cervix. *Cancer* 1985;51:2214-9.
32. Ward BE, Saleh AM, Williams JV, Zitz JC, Crump CP. Papillary immature metaplasia of the cervix: a distinct subset of exophytic cervical condiloma associated with HPV-6/11 nucleic acid. *Mod Pathol* 1992;5:391-5.
33. Staten PL, Hines JF, Kost ER. A descriptive evaluation with follow-up of the clinical significance of atypical immature squamous metaplasia of the cervix. *J Lower Genital Tract Dis* 2000;4:30-33.
34. Mosher RE, Lee KR, Trivijitsilp P, Crum CP. Cytologic correlates of papillary immature metaplasia (immature condyloma) of the cervix. *Diagn Cytopathol* 1998;18:416-21.
35. Ma L, Fisk JM, Zhang RR, Ulukus EC, et al. Eosinophilic dysplasia of the cervix: a newly recognized variant of cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1474-84.
36. Gullota G, Margariti PA, Rabitti C, Balsamo G, et al. Cytology, histology, and colposcopy in the diagnosis of neoplastic non-invasive epithelial lesions of the cervix. *Eur J Gynaec Oncol* 1997;18:36-38.
37. Tremont-Lukats IW, Teixeira GM, Vásquez J, Hernández D. Validity of colposcopy to identify and grade squamous intraepithelial lesions among venezuelan women. *Eur J Gynaec Oncol* 1997;18:57-60.
38. Kirkup W, Singer A, Hill AS. The accuracy of colposcopically directed biopsy in patients with suspected intraepithelial neoplasia of the cervix. *Br J Obstet Gynaecol* 1980;87:1-4.
39. Woodhouse SL, Stasny J, Styer P, Kennedy M, et al. Interobserver variability in subclassification of squamous intraepithelial lesions: results of the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1079-84.
40. Chappatte OA, Byrne DI, Raju KS, Nayagam M, Kenney A. Histological differences between colposcopic-directed biopsy and loop excision of the transformation zone (LETZ): a cause for concern. *Gynecol Oncol* 1991;43:46-50.
41. Cejtin HE, Chronopoulos FT, Meyer PM, Massad LS. Correlating preoperative cytology and colposcopic biopsy with final histology after conization. *J Lower Genital Tract Dis* 1998;2:87-92.
42. Joste NE, Crum CP, Cibas ES. Cytologic/histologic correlation for quality control in cervicovaginal cytology: experience with 1,582 paired cases. *Am J Clin Pathol* 1995;103:32-34.
43. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153:1741-74.
44. Keating J, Cyiko A, Riethdorf S. Ki-67, cyclin E, and p16 INK4A are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25:884-91.
45. Klaes R, Friederich T, Spitkovsky D, Ridder R, et al. Overexpression of p16 INK4A as a specific marker for dysplastic

- and neoplastic epithelial cells of the cervix. *Int J Cancer* 2002;92:276-84.
46. Klaes R, Benner A, Friederich T, Ridder R, et al. p16 (INK4A) immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1387-99.
  47. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, et al. p16 INK4A expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16:665-73.
  48. Nieh S, Chen S, Chu T, Lai HC, et al. Is p16 INK4A expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear?. A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005;97:35-40.
  49. Benevolo M, Mottolise M, Marandino F, Vocaturo G, et al. Immunohistochemical expression of p16 INK4A is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006;19:384-91.
  50. Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, et al. Immunohistochemical expression of p16 (INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low grade squamous intraepithelial lesions. *J Lower Genital Tract Dis* 2007;11:98-104.
  51. Curiel JJ. Biopsia del cuello uterino ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico?. Utilidad de p16 INK4A para lograrlo. *Ginecol Obstet Méx* 2007;75:615-20.
  52. Duncan L, Jacobs S, Hubbard E. Evaluation of p16INK4a as a diagnostic tool in the triage of Pap smears demonstrating atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer Cytopathol* 2008;114:34-48.
  53. Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin. Cancer Res* 1999;5:2121-2132.
  54. Shroyer KR, Homer P, Heinz D, Singh M. Validation of a novel immunocytochemical assay for topoisomerase II- $\alpha$  and minichromosome maintenance protein 2 expression in cervical cytology. *Cancer Cytopathol* 2006;108:324-30.
  55. Mittal K, Soslow R, McCluggage WG. Application of immunohistochemistry to gynecologic pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:402-23.
  56. Clavel C, Masure M, Bory J-P, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001;89:1616-23.
  57. Kuhn L, Denny L, Pollack A, Lorincz A, et al. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:818-25.
  58. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, Manos MM, et al. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology: Correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types. *Am J Clin Pathol* 1994;102:182-7.
  59. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-7.
  60. Kalof AN, Cooper K. p16INK4A immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2006;13:190-4.
  61. Branca M, Ciotti M, Santini D, di Bonito L, et al. P16(INK4A) expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization of disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004;23:354-65.
  62. Hashi A, Xu JY, Kondo T, Hashi K, et al. p16 INK4A overexpression independent of human papillomavirus infection in lobular endocervical glandular hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2006;25:187-94.
  63. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, et al. Evaluation of a nuclear score for p16INK4A-stained cervical squamous cells in Liquid-Based Cytology samples. *Cancer Cytopathol* 2005;105:461-7.
  64. Bibbo M, Klump W, DeCocco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002;46:25-29.
  65. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, et al. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002;27:365-70.
  66. Nakhleh RE, Fitzgibbons PL. Quality management in anatomic pathology. College of American Pathologists, Northfield, Ill. 2005.
  67. Dodds LG, Sneige N, Villarreal Y, Fannig CV, et al. Quality-assurance study of simultaneously sampled, non-correlating cervical cytology and biopsies. *Diagn Cytopathol* 1993; 9:138-44.