

Diez años de p16 en biopsia de cérvix, ¿vale la pena su uso rutinario?

José de Jesús Curiel Valdés*

RESUMEN

En la cadena diagnóstica del cáncer cervicouterino la biopsia es el juez final. Es ya un hecho demostrado que el VPH es un agente causal necesario pero no único y que crea displasia que evoluciona a cáncer invasor en una proporción baja de casos inicialmente infectados. La zona de transformación tiene una apariencia microscópica muy diversa y está se complica cuando es infectada y transformada por el VPH; las imágenes son frecuentemente sobreinterpretadas como lesiones y, en menor frecuencia, subvaloradas como metaplasias. Ello dio origen al desarrollo de marcadores para tratar de evitar esta confusión de diagnóstico. El que destaca es p16 y, aunque se ha demostrado su bondad sobre todo en lesiones de alto grado, su uso no se ha aplicado de manera rutinaria. Esta revisión tiene como objetivo mostrar a ya casi 10 años de publicados los hallazgos y la experiencia en la aplicación de este marcador en la biopsia de cérvix.

Palabras clave: P16, biopsia de cuello uterino, NIC, displasia de cuello uterino, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

In the cervical uterine cancer diagnosis chain, the biopsy is categorical, and is a fact that HPV is involved in this event but not the only cause, it creates dysplasia and only in a few of the initially infected cases, cancer. The microscopic appearance of the transformation zone of the cervix is complex and specially when infected by HPV, these microscopic images are frequently misdiagnosed as CIN and in a few cases as metaplasia. Some molecular markers to clear this issue where developed and p16 is the most highlighted of them, and despite that is very useful especially in high-grade lesions it is not used routinely. This review deals with the experience of almost 10 year with this marker in uterine cervix.

Key words: p16, biopsy of cervix, CIN, Dysplasia of Cervix Uteri, Immunohistochemistry.

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres en México. La biopsia sigue siendo el procedimiento estándar para el diagnóstico, indicada por una citología anormal y seleccionado el sitio de la toma de biopsia por la colposcopia. Ya es un hecho demostrado que el CaCu es ocasionado por el virus del papiloma Humano (VPH) y precedido por displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Estos cambios obedecen a los oncogenes del VPH E6 y E7. E6 afecta primordialmente al gen P53 y E7 al gen retinoblastoma (Rb).

Los estudios sobre la acción del oncogén E7 del HPV sobre el gen retinoblastoma (Rb)¹⁻⁸ se iniciaron dirigidos hacia el área ginecológica desde 1997 y en especial al cérvix en su relación con el VPH; han demostrado la desregulación dependiente de VPH que afecta al cromosoma 9 y cambia al gen p16 que controla la producción de p16INK4A. El gen Rb es responsable del ciclo de reproducción celular normal. Cuando este gen es metilado o hipofosforilado por la proteína E7 del HPV se afecta la regulación de la acción en el ciclo celular. El gen Rb normalmente regula las proteínas CDK4 y CDK6, que son ciclíninas implicadas en el ciclo celular. Éstas tienen una acción oncogénica (iniciar la reproducción celular). En células normales, CDK4 y CDK6 están reguladas por inhibidores de ciclina cinasa p16INK4A. Esta proteína se acumula por el gen Rb dañado y es detectada por inmunohistoquímica. Específicamente, en casos de NIC, p16 es un producto indirecto, siempre presente cuando el VPH daña la célula, y generalmente ausente en el tejido normal del cuello del útero o en lesiones reactivas inflamatorias; esto lo hace un marcador ideal. Varios estudios

* Academia Mexicana de Cirugía.

Correspondencia: José de Jesús Curiel Valdés. Laboratorio Grupo Diagnóstico S.C. Hamburgo 306, Col. Juárez CP 06600, México D.F. Correo electrónico: drcurielp16@grupodiagnostico.com

Este artículo debe citarse como: Curiel Valdés JJ. Diez años de p16 en biopsia de cérvix, ¿vale la pena su uso rutinario? Patología Rev Latinoam 2012;50(4):293-304.

recentes¹⁻¹¹ demuestran que p16 está presente en NIC y que la correlación con Southern Blot y PCR o hibridación *in situ* muestra la existencia de virus de alto riesgo y de algunos de bajo riesgo.

Aplicación en biopsia de cérvix

Klaes y sus colaboradores,¹² en un trabajo entre expertos ginecopatólogos dirigido a documentar el error interobservador en biopsias de cérvix y p16, encontró sólo 40% de concordancia con todos los grados de NIC; mientras que si se utiliza p16 para diagnosticar estos casos la correlación se elevaba a 97%. Murphy¹¹ y Keating¹³ mostraron también que p16 es un complemento útil en el diagnóstico de NIC. El trabajo de Klaes es significativo porque pone en evidencia el problema de la concordancia diagnóstica y, precisando más, de la discordancia diagnóstica. Si tomamos en cuenta que la biopsia de cérvix es el procedimiento estándar o de referencia para el diagnóstico de NIC y nuestro diagnóstico no es corroborado en una segunda opinión significa que existe una subjetividad importante.

Los criterios de las lesiones de cérvix han sido ya descritos en múltiples libros tanto de patología quirúrgica como de patología cervical. Se analizan parámetros que comprenden cambios en núcleo y citoplasma, así como mitosis, dándole valor al sitio del epitelio donde se encuentran, capas basales o superficiales. Nucci y sus colaboradores,¹⁴ en el artículo: "Redefiniendo NIC", motivados por esta misma dificultad de un diagnóstico reproducible, precisan algunos criterios, tipos de epitelio de origen de las lesiones y utilizan también las consideraciones del estatus de VPH de cada lesión con respecto a los de alto y bajo riesgo. La experiencia en México de esta variabilidad de diagnóstico ha sido documentada¹⁵ entre 60 patólogos mexicanos; la concordancia en el análisis de una muestra con histología convencional con NIC 1 fue de 52.5% y en NIC 2 de 18%. El diagnóstico de esas mismas muestras con p16 elevó a 100% la concordancia del diagnóstico en ambos casos (NIC 1 y NIC 2). p16 es un marcador inmunohistoquímico (IHQ) seguro, objetivo y claro, con 100% de sensibilidad y especificidad, tiñe tanto núcleo como citoplasma con una gama de intensidad de 1 (+) a 3 (+++). Las células epiteliales afectadas en el área lesionada pueden ser consideradas (en su porcentaje de positividad de p16) como esporádicas (< 5%), focales (5 a 25%) o difusas (> 25%) de acuerdo con los criterios de Klaes.¹²

Otra publicación mexicana¹⁶ que correlaciona la colposcopia con biopsia con HE y p16 en 460 casos encontró un sobrediagnóstico de 18.5% con HE, comparado con el diagnóstico complementado con p16. La cifra resultaría poco significativa. Sin embargo, el análisis detallado del cambio de diagnóstico en los tres niveles de NIC y metaplasia es muy significativo, con una $p = 0.002$. La información se resume en el Cuadro 1. Las metaplasias cambiaron en 61.8% de los casos, NIC 1 56.7%, en NIC 2 92.8% y NIC 3 25%. Si dividimos en LBG y LAG los cambios serían de metaplasia a LBG: 44.5% y a LAG 3.2%. La LBG cambia solo 7.8% a LAG y pasan a metaplasia 49%. LAG a metaplasia solo 5% y 55% a LBG. El valor predictivo positivo es de 0.56 y el negativo 0.59; la sensibilidad 0.75 y la especificidad 0.38. Estas cifras fueron obtenidas de 2003 a 2005; es decir, con el inicio de la experiencia en el uso de p16 de manera rutinaria en todas las biopsias de cérvix. Los datos son semejantes a los obtenidos por Klaes. Ello indica que la aplicación de los parámetros aparentemente bien definidos para la clasificación no son correctamente aplicados o se requiere revalorarlos para hacerlos más confiables. Una opinión reciente de Mark Stoler en un congreso de Eurogin dice "la falsa seguridad de una biopsia falsa positiva como NIC, crea en el colposcopista también la falsa seguridad de que la imagen colposcópica es una enfermedad y compromete seriamente la correlación colpo-cito-histológica". La trascendencia clínica no es menor y Nucci¹⁴ y Elit¹⁷ hacen mención de ello ya que, igual que en México, Estados Unidos y Canadá, muchos clínicos en casos de NIC 1 realizan tratamiento exagerado y extenso en mujeres cuyo diagnóstico real era sólo una metaplasia. En la mayor parte de los estudios que se realizan sobre VPH y NIC se toman en cuenta sólo las LAG, NIC 2, 3 o superiores, para diseñar nuevas estrategias de cribado, como para diagnóstico molecular, marcadores de IHQ o mutación genética; y las LBG son minimizadas debido a que la enorme mayoría de ellas involucionan solas. Esto deja un hueco importante en cuanto a la precisión diagnóstica que requieren estas lesiones.

¿Cuándo usarlo?

Dadas las consideraciones anteriores la pregunta es ¿se debería usar p16 de manera rutinaria? La mayoría de los patólogos mexicanos no la realizan y una minoría lo hace a solicitud de los ginecólogos o colposcopistas. La pregunta expresa sería: ¿quien lo debe solicitar? Nucci¹⁴ comenta

Cuadro 1. Análisis detallado del cambio de diagnóstico

<i>Metaplasia inicial</i>	128 Casos	100%	<i>NIC 1 Inicial</i>	296	100
Cambio de diagnóstico	61	47.7	Cambio de diagnóstico	168	56.8
NIC 1	57	44.5	Metaplasia	145	49.0
NIC 2	2	1.6	NIC 2	18	6.1
NIC 3	2	1.6	NIC 3	5	1.7
NIC 2 inicial	28	100	NIC 3 inicial	12	100
Cambio de diagnóstico	26	92.9	Cambio de diagnóstico	3	25
Metaplasia	1	3.6	Metaplasia	1	8.3
NIC 1	21	75	NIC 1	1	8.3
NIC 3	4	14.3	NIC 2	1	8.3

Cambio de diagnóstico en casos de coloscopia con biopsia con p16; el diagnóstico inicial con HE y el que cambió fue utilizando la integración de HE con p16.

Modificada de Curiel Valdes Rev de Enfermedades del Tracto Genital Inferior 2008;2:45-51, con permiso del editor.

que se debe usar en casos de duda ya que el diagnóstico generalmente se logra hacer de manera sencilla y directa. Esto, como se ha evidenciado en el error de concordancia entre expertos, requiere un cierto grado de “humildad” por parte del patólogo en admitir que un pequeño fragmento de tejido puede ser difícil de diagnosticar y que requiere más de unos segundos de atención.

Como parte de una revisión que está en progreso en casos de una segunda opinión en mujeres con diagnóstico de NIC o con discrepancia entre estudios de colposcopia, citología, colposcopía y biopsia, se seleccionaron al azar 27 casos que hubieran tenido documentado un diagnóstico previo histológico y cuyas laminillas y bloque originales fueron revisados y realizado p16 y, en algunos casos, Ki67 y L1 de cápsula viral. El diagnóstico con HE se realizó utilizando la clasificación de Richart¹⁸ como NIC y de Bethesda¹⁹ en LAG y LBG. El diagnóstico inicial de revisión se realizó en las laminillas originales con la tinción de HE y posteriormente se hizo el diagnóstico integral con p16. Se realizó colposcopia y citología en la mayor parte de los casos, datos que se comentan pero no se analizan en detalle ya que no es el objeto de este trabajo. De los 26 casos inicialmente llegaron 3 como metaplasias, 20 como LBG y 4 LAG. De las 3 metaplasias, 2 (66%) cambiaron a LAG y una se confirmó el diagnóstico. De las 20 LBG se confirmaron 6 (30%) y cambiaron a metaplasia 13 (65%) y 1 (5%) a LAG. De las 4 LAG 2 se corroboraron (50%) y se diagnosticó sin lesión a las otras 2 (50%) que correspondieron a metaplasia con atrofia en una e hiperplasia de células parabasales en otra (Cuadro 2). La

Cuadro 2. Diagnósticos inicial y final

Casos	<i>Diagnóstico inicial</i>	<i>Diagnóstico final</i>	Casos	%
3	Metaplasia	Metaplasia	1	33
		LAG	2	66
20	LBG	Metaplasia	14	70
		LAG	6	30
4	LAG	Metaplasia	2	50
		LAG	2	50
27			27	

sugerencia en la literatura sobre su uso es^{14,22} que se debe en primer lugar estandarizar y probar en cada laboratorio, con casos claramente diagnosticados, el grado de tinción, familiarizarse con su interpretación. Utilizarlo en todos los casos de duda diagnóstica o discrepancia de opiniones, en todos los casos de LAG ya que siempre debe ser positivo. Utilizar marcadores complementarios en los casos de duda en LBG, como ki67 y L1, de cápsula de VPH. Añadiendo que sólo se adquiere experiencia familiarizándose con casos de práctica de rutina diaria; esto ayuda a la “humildad” de reconocer que no es tan sencillo el diagnóstico correcto de NIC.

Criterios diagnósticos

Valorando la causa de los cambios realizados en estas dos series, e integrando el diagnóstico de HE con p16 se encontraron tres causas primordiales de confusión de diagnóstico entre metaplasia y NIC 1 o LBG: Figuras 1 a 6. 1. Metaplasia eosinófila¹⁴ o intermedia (figuras 1A y B)

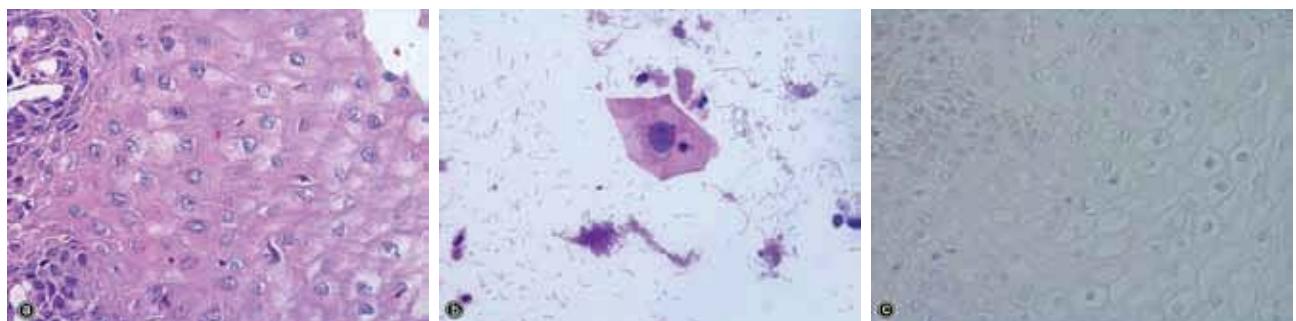


Figura 1. A) Detalle con HE de metaplasia eosinófila o intermedia, los núcleos son de tamaño semejante desde la capa basal a la superficie, la distancia entre los núcleos es muy homogénea y el citoplasma es muy amplio y eosinófilo. Aunque en la capa superficial tienen 3 veces más tamaño que el de una célula superficial normal. Esto se aprecia en el estudio citológico, imagen B), que frecuentemente es reportado como LBG, NIC 1. En C) se aprecia el p16 negativo. El diagnóstico original era de LBG, NIC 1.

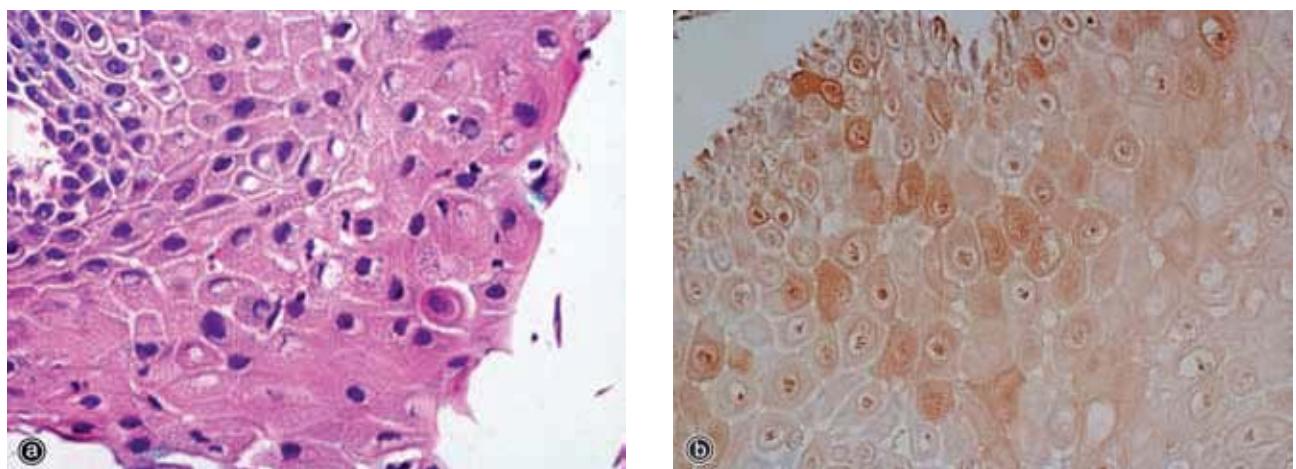


Figura 2. A) HE con mínima pérdida de polaridad y maduración, densidad nuclear menor a 50%, su tamaño es ligeramente menor o igual al de la capa basal. Hay ocasional atipia y hay un disqueratocito. Ese caso tiene PCR con VPH 16. El diagnóstico inicial era de NIC 1, LBG. La atipia esporádica no es suficiente para diagnosticar NIC. En B) p16 es esporádico nuclear (++) y citoplásmico focal (+) a ++; esto refleja la presencia de VPH 16 que se interpreta en la literatura como negativo para NIC y sólo estadio de portador sano.

definida como conservación del tamaño del núcleo grande basal hasta la superficie con crecimiento del citoplasma y sin producción de glucógeno, lo que da un aspecto intensamente eosinófilo. No hay aumento de la densidad celular y se conserva la polaridad. El tamaño del núcleo es generalmente superior a tres veces lo que sería el de la célula superficial, lo que en criterios de Bethesda sería NIC 1; esta confusión es frecuente en estudios de citología (Figura 1B). 2. Hiperplasia basal o parabasal con cambios regenerativos crean pérdida de polaridad y maduración con presencia de algunas mitosis que dan la impresión de estar en capas más alejadas de la basal y son interpretadas como presentes en células displásicas cuando en realidad

son solo células basales o parabasales (Figuras 7 y 8). 3. Presencia de glucógeno que es confundido de manera importante con coilocitosis. El análisis detallado de las células con glucógeno muestra que el núcleo no está crecido, puede tener cierta lobulación por defecto de fijación y el halo perinuclear no está bien definido y no existe refuerzo de la periferia del halo como en el coilocito (Figuras 9 y 10). Este halo está dado por la ruptura del citoesqueleto por el E4 del VPH, al plegarse a la periferia se condensa de manera muy importante en la membrana citoplásrica dando la característica eosinófila intensa en la periferia. El halo de glucógeno es difuso y deshilachado en la mayoría de los casos. Todos estos casos fueron negativos a p16 y

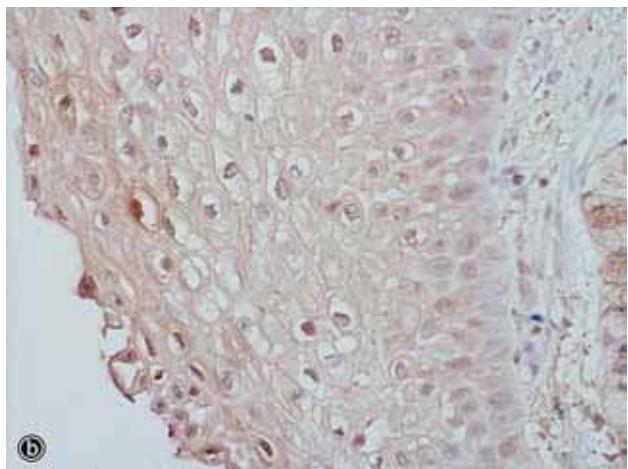
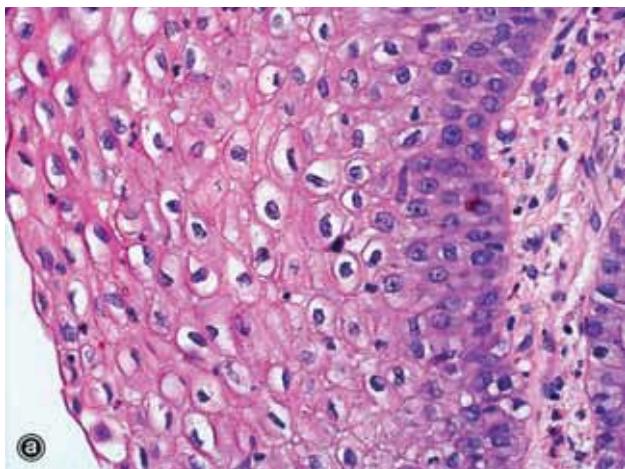


Figura 3. A) Se aprecia otro caso en el que hay una capa basal ordenada, dos parabasales y el resto es epitelio que madura hacia la superficie. Los núcleos disminuyen de tamaño hacia la superficie y adquieren glucógeno; esto, junto con una celularidad menor a 50% no apoya la presencia de lesión. Este caso fue inicialmente diagnosticado como NIC 1 con coilocitos. PCR con VPH 31. En B) el p16 es positivo esporádico, reflejando la presencia viral, sin lesión de NIC. Este caso tiene diagnóstico de metaplasia madura con presencia de glucógeno.

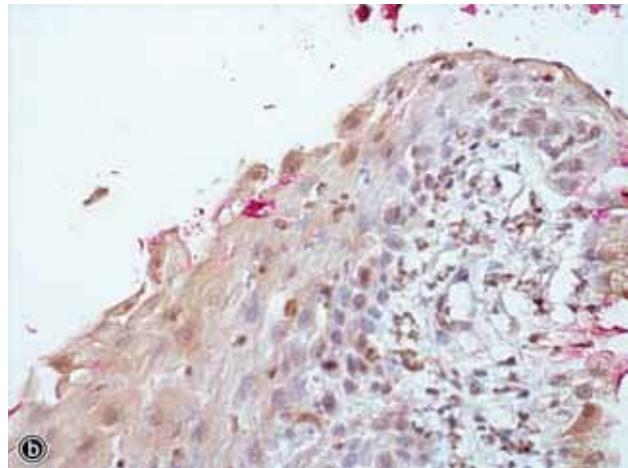
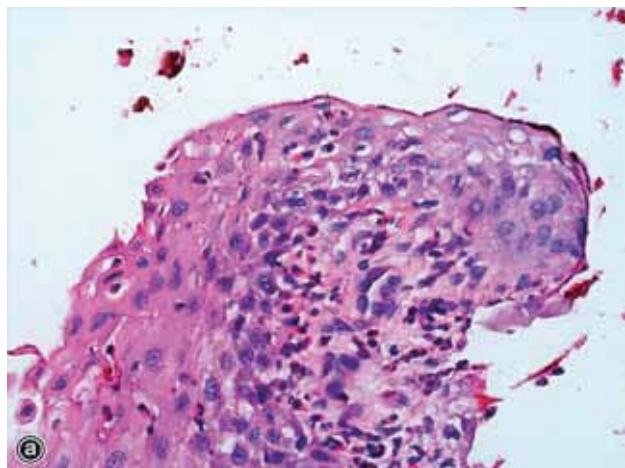


Figura 4. A) Un epitelio con metaplasia inmadura delgada con cuando mucho 7 capas, con una capa basal y parabasal con leve pérdida de polaridad y núcleos más juntos que sugirieron LAG. Hacia la superficie el citoplasma aumenta de tamaño y la densidad celular es menor a 50%, aunque hay leve hiperchromatismo la cromatina es fina. En B) el p16 es esporádico y + en intensidad; este tipo de positividad es reportado como negativo en la literatura.

L1 de cápsula de VPH, colposcópicamente tenían áreas acotorreactivas tenues, en ocasiones mosaico fino y con la tinción de lugol la imagen es heterogénea, lo que indica presencia de glucógeno. Hubo seguimiento de algunas de ellas cuando al menos por un año y se encontró que la imagen se conservaba idéntica, sin cambios, situación que no sucede con cualquier tipo de lesión que al involucionar o evolucionar se modifica de manera importante.

En los casos de LBG y LAG los orígenes de confusión fueron también tres: 1. Metaplasia inmadura con displasia leve, es decir una displasia en un epitelio inmaduro o atrófico que tiene poco grosor y las atipias ocupan todo el grosor del epitelio; esto sería requisito para LAG. Sin embargo, los cambios nucleares de hiperchromatismo, densidad de cromatina y refuerzo de membrana nuclear no son suficientes en calidad para sustentar LAG (figuras

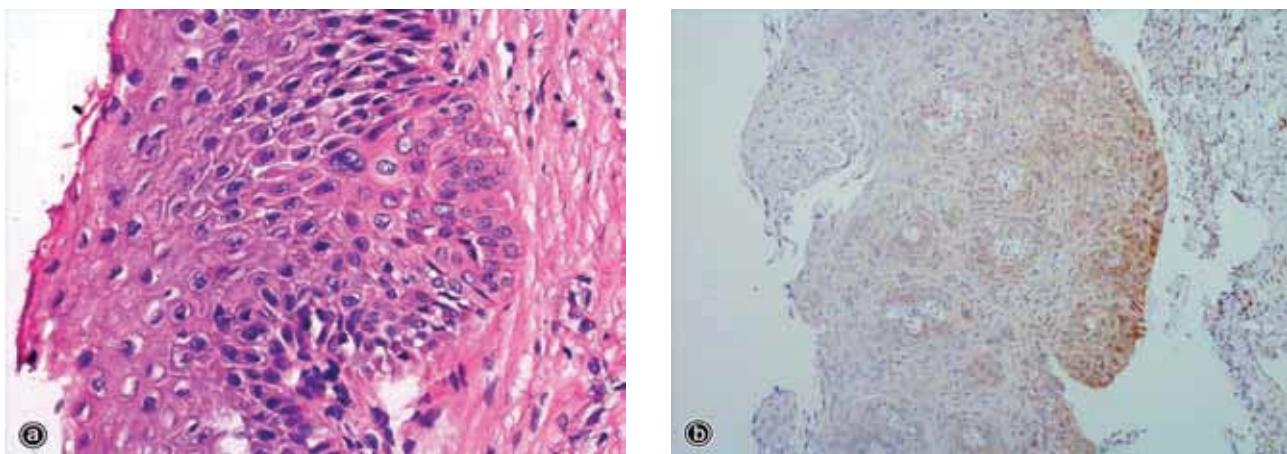


Figura 5. A) Otro caso de metaplasia diagnosticado como LBG, el corte es ligeramente tangencial y crea una capa basal más amplia. Si apreciamos que hacia la superficie las células tienen abundante citoplasma eosinófilo y los núcleos tienen una separación entre sí muy grande y no crecen, son datos que no sustentan LBG. En B) se aprecia el p16 positivo + basal esporádico en el núcleo y en forma focal en el citoplasma. También es interpretado como negativo. Este grado de positividad se ha encontrado en casos de metaplasia con VPH de alto riesgo y se ha considerado como en fase de reposo.

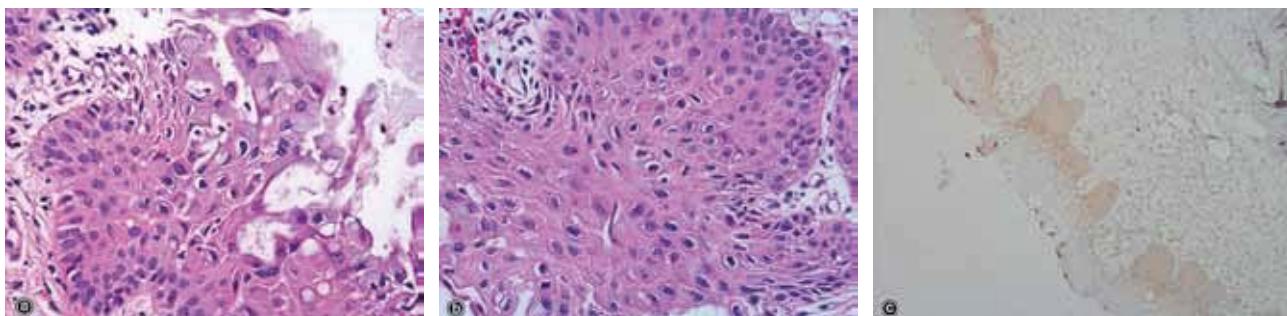


Figura 6. A) y B) muestran metaplasia que sustituye a glándulas y que es responsable de la imagen en mosaico en la colposcopia; es frecuente que exista pérdida de polaridad y leve hipercromatismo. Es difícil valorar la maduración y en la superficie se conservan células endocervicales que son, en este caso, de metaplasia tubaria. Estos cambios sugieren LAG; sin embargo, la valoración minuciosa del núcleo no muestra caracteres de LAG. C) La tinción de p16 es negativa ya que es sólo citoplásica +.

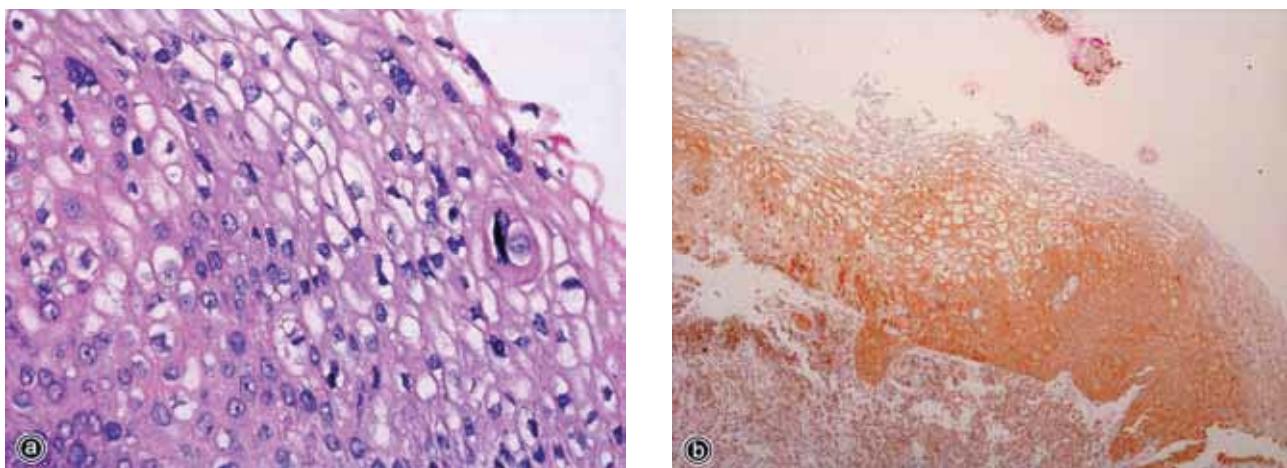


Figura 7. LBG en A) con presencia de coilocitos en forma irregular; hay clara pérdida de polaridad, núcleos grandes, lobulados y está afectando desde la capa basal a la superficie. En B) p16 es difuso, de predominio basal, citoplásico y nuclear +++.

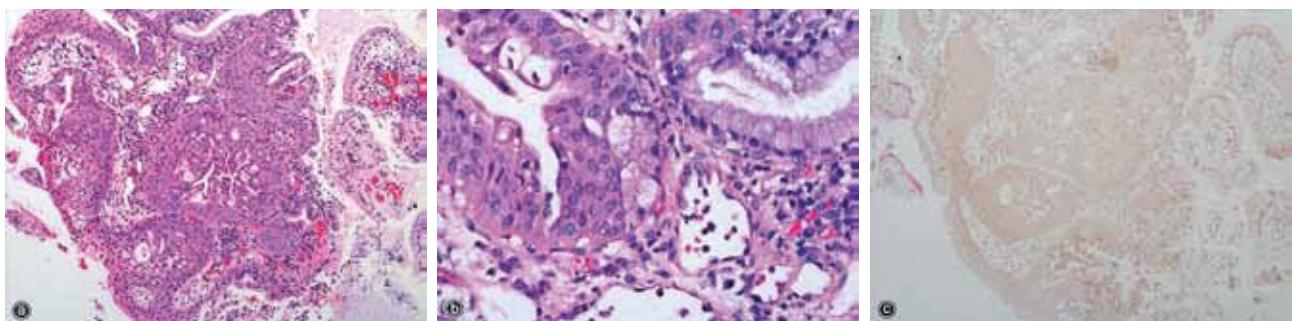


Figura 8. Caso semejante al de la figura 6. En A) panorámica y detalle en B). La metaplasia es todavía más inmadura y con células de reserva; la apariencia de inmadurez puede sugerir LAG por la tendencia a sobreposición de los núcleos. Hay glándulas normales y un denso infiltrado inflamatorio. En C) p16 negativo.

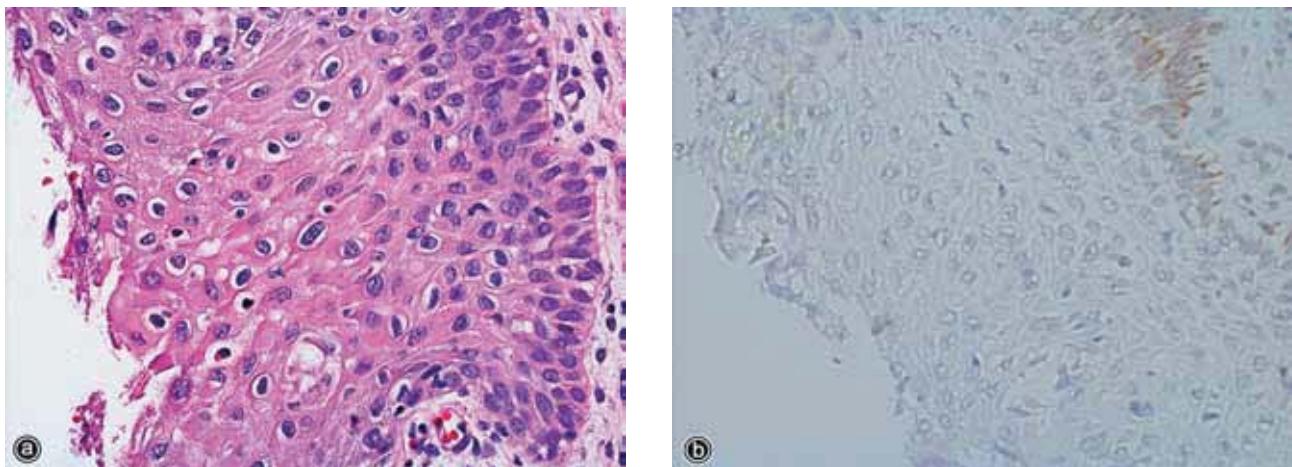


Figura 9. A) Metaplasia atípica, desarreglo de capa basal, leve hiperchromatismo. Halos perinucleares. La observación minuciosa muestra que podemos seguir las dos capas basales en una hilera y que hacia la superficie no crecen los núcleos. Los halos son de glucógeno. En B) p16 negativo.

11 y 12). El leve aumento del tamaño del citoplasma y la conservación de cierto grado de maduración a la superficie indican LBG; todos estos casos tuvieron tinción de p16 sólo en el tercio inferior o la mitad inferior y no en todo el espesor (Figuras 10 y 12). 2. Atipia coilocítica, aunque en pocos casos pero es confundida con displasia severa o LAG. Al comparar con la positividad de p16 se aprecia que estas células muy pleomórficas no se tiñen con p16 ya que no existe aún daño de E7 viral al gen Rb; una tinción adicional realizada de L1 de cápsula para 17 cepas

de VPH mostró en todos los casos que son coilocitos. 3. La atrofia y los cortes tangenciales (Figura 13) del tejido son causa de confusión. Los fragmentos laminares de tejido en una biopsia son difíciles de orientar en sentido perpendicular y se obtiene un corte de toda la capa basal que es la que se observa; esto da la falsa impresión de que hay crecimiento nuclear en todo el espesor y la presencia de mitosis son causa del diagnóstico de LAG en casos de metaplasia o NIC 1. En todos estos casos p16 es negativo en metaplasias o de tinción débil, esporádica o focal en

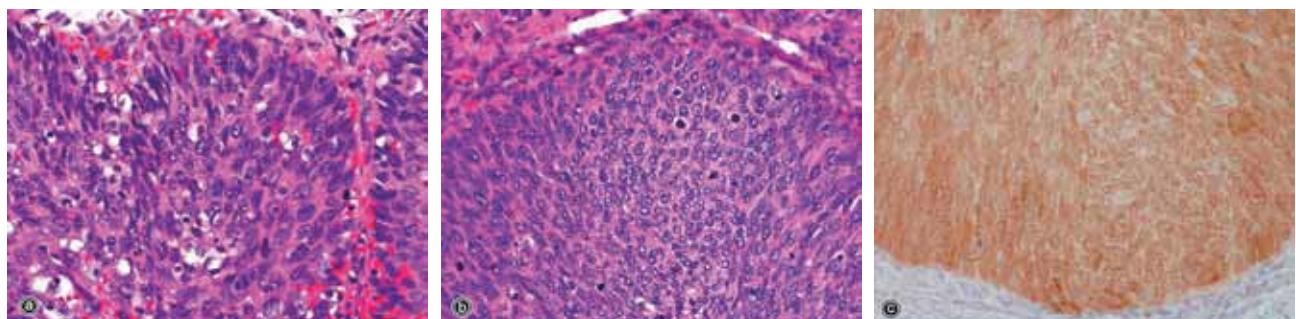


Figura 10. LAG en dos imágenes; A) y B) que no muestran duda, hipercromatismo, núcleos sobrepuertos, citoplasma escaso, mitosis evidentes y en C) p16 positivo nuclear y citoplásmico +++, con extensión difusa en 100% de las células. Comparando estas atipias con las que se confundieron con LAG puede apreciarse claramente la diferencia.

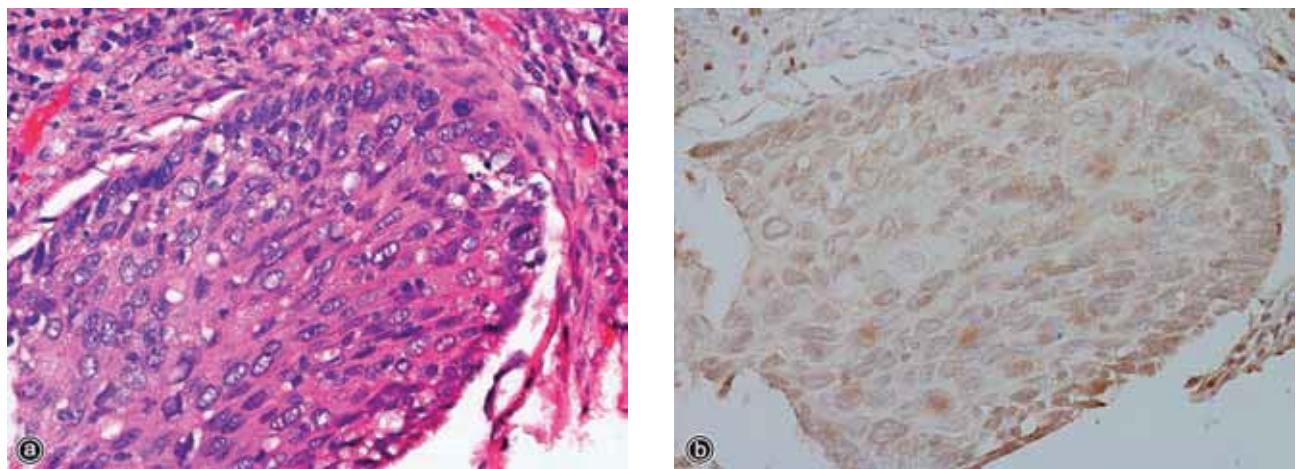


Figura 11. LBG sin coilocitosis en A), atipia nuclear en todo el espesor, con citoplasma de mediano tamaño, densidad nuclear de 60%. B): p16 nuclear + a ++ en casi todos los núcleos.

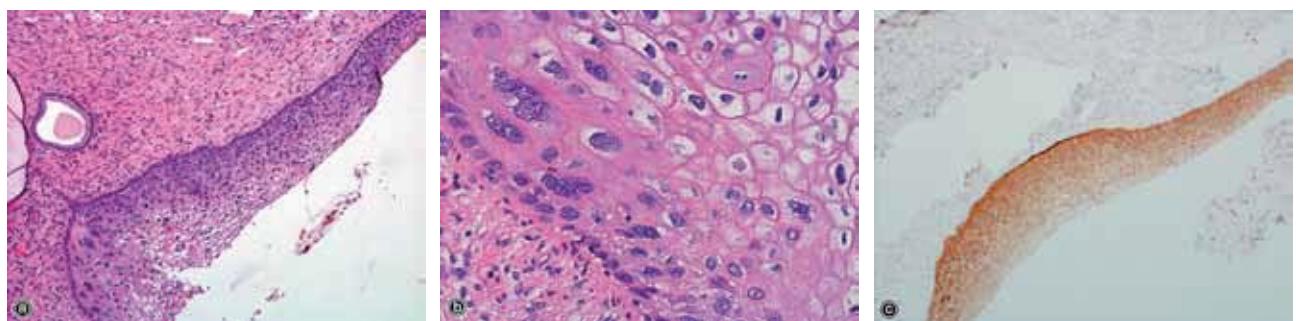


Figura 12. LBG panorámica y detalle en A) y B), con coilocitosis. Fue confundida con LAG por la atipia nuclear en la capa basal y parabasal; a pesar del tamaño nuclear la cromatina es fina y son cambios más de coilocitosis que de displasia. Tienen citoplasma abundante y hacia la superficie se vacuolan por la coilocitosis. En C) p16 es positivo difuso, citoplásmico y nuclear +++, de predominio en tercio basal. La tipificación mostró VPH 16.

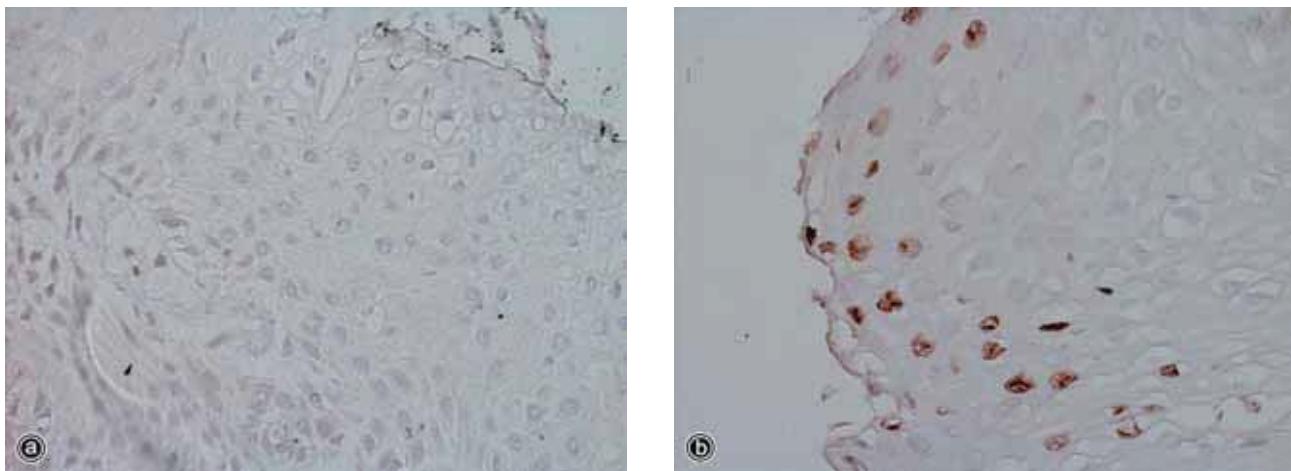


Figura 13. A) Células que en HE sugerían coilocitosis y con L1 de VPH son negativas. B) caso de L1 de cápsula positivo en coilocitos.

LBG, cuando debe ser de tinción difusa e intensa tanto nuclear como citoplásica en LAG. El análisis detallado de los núcleos no muestra cambios que sustenten LAG. En este grupo entran los casos de penetración a glándulas que tiene un componente inmaduro y que son confundidos con invasión o LAG.

Integración a la clínica

El contexto clínico es importante, la colposcopia en México es cada vez más utilizada, inclusive como método de cribado, con o sin citología. El análisis de las imágenes acitorreactivas de la colposcopia en correlación real de la biopsia con p16¹⁵ muestra que 53.7% de ellas representan realmente una lesión, el resto son metaplasias. Un error común es apoyar la decisión del diagnóstico histológico, en casos de duda, en el dato clínico de una imagen acitorreactiva. Un ejemplo sería la presencia de halos perinucleares para darles el valor de coilocitos o una metaplasia inmadura con displasia. Otro factor es PCR o CH2 de un VPH de alto riesgo y de mayor peso el que sea 16 o 18. Estos pueden ser casos de portadoras sanas sin enfermedad; VHP positivo por cualquier método no valida la presencia de NIC. Un caso informado recientemente de CH2 negativa con una biopsia con LAG fue presentado como un error de la CH2²³. En el análisis de las imágenes de las fotografías de la biopsia publicadas en ese caso se trata de una metaplasia inmadura y la que ilustra LBG en epitelio vecino son halos de glucógeno. Este caso ilustra la confusión que se puede crear. A nivel mundial es aceptado que todas las LAG necesariamente son positivas a

una CH2, tanto que en una mujer con CH2 negativa está demostrado que nunca tiene LAG y hasta por un período de 3 a 5 años. El error de este caso creó confusión y duda de que existan casos que no contienen virus y son de alto grado, lo cual no es posible.

En la revisión rutinaria de biopsias de cérvix generalmente se encuentra que la impresión en panorámica y a gran aumento es realizada con poca acuciosidad con los resultados ya mencionados. Después de la experiencia de correlacionar HE con p16, Ki67 y L1 de cápsula viral, y regresar a detectar cuál fue la causa del error se adquiere un aprendizaje que logra disminuir a 15% el cambio de diagnóstico y la confusión generalmente es entre metaplasias y LBG.

Un algoritmo sugerido

Al revisar una biopsia es útil hacerse una serie de preguntas cuya respuesta facilita la orientación a un diagnóstico.

1. ¿De qué sitio fue tomada la biopsia? y ¿está bien orientada?: unión escamo columnar, zona de transformación, exocérvix o endocérvix, o varias de ellas. No es lo mismo una displasia en un epitelio delgado que en uno grueso. Es excepcional encontrar coilocitosis en epitelio delgado, el VPH para completar su ciclo episomal requiere un epitelio grueso. La metaplasia inmadura es muy frecuente y puede tener mitosis, leve desarreglo y sustitución de glándulas endocervicales. Epitelios atróficos son causa de sobrediagnóstico con LAG. Cuando el epitelio en el corte queda de manera tangencial se aprecian sólo las capas basales y esto ha sido causa de confusión con LAG. En

todos estos casos es importante observar minuciosamente la cromatina nuclear, pleomorfismo celular y si hacia la superficie, aunque sean pocas capas, existe aumento del tamaño de citoplasma y si hay evidencia de maduración del núcleo.

2. ¿Identificó áreas de epitelio normal? Esto es siempre útil ya que nos da un patrón de comparación con lo anormal. Si todo se ve igual y sólo hay mínimos cambios en epitelio con halos claros perinucleares deben aplicarse de manera minuciosa los criterios de colicosis ya descritos. La densidad celular (nuclear) es importante (ver punto 4).

3. Las áreas con epitelio distinto y con posible lesión ¿son más densamente celulares? (ver punto 4).

4. ¿En estas áreas más celulares, qué porcentaje ocupan los núcleos? La densidad nuclear valorada en por ciento debe ser realizada tomando en cuenta el espacio que ocupan los núcleos de estas áreas en relación con el citoplasma, en términos prácticos: el % de azul (hematoxilina) vs el % de rosa (eosina). La posibilidad de que exista una lesión cuando existe una densidad nuclear menor a 50 % es casi nula. 50 a 60% la posibilidad es de LBG; más de 60 % LAG, dividida entre 60 y 70% NIC 2 pero más de 70 % NIC 3.

5. ¿Qué distancia hay entre los núcleos; se enciman o sobreponen? Cuando el VPH altera el ciclo de reproducción celular hay mitosis por arriba de la capa basal y se desarregla la arquitectura; esto da una distancia entre núcleos muy irregular, se aprecian más juntos y en lesiones de alto grado hay sobreposición, sobre todo en los sitios basales. Cualquier lesión tiene una mezcla del aumento de la densidad nuclear y la distancia entre los núcleos se hace irregular, pierden su orden. Si se compara con en el epitelio vecino normal, si es que existe, es más fácil lograr distinguir esto.

6. ¿Hay atipia nuclear y en qué consiste?: hipercretinismo, densidad de cromatina, grumos de cromatina, pleomorfismo. Los cambios regenerativos son simuladores de LBG y en ocasiones de LAG. Necesariamente, LAG tiene siempre atipia nuclear importante y varía entre las células. Si de manera individual valoramos las atipias, ¿si las viéramos en citología en una sola célula separada serían displasia? si la respuesta es sí se trata de una lesión.

7. ¿La relación núcleo citoplasma está alterada? Esto es siempre un indicador clásicamente aceptado de displasia; sin embargo, depende del sitio: las células basales lo tienen alterado, al igual que la metaplasia inmadura y la atrofia.

Estos son los más importantes simuladores de LAG. La observación minuciosa de nuevo del núcleo y qué le sucede hacia la superficie es de mucha utilidad.

8. ¿Qué le sucede al núcleo de la capa basal a la superficie? Si hay maduración y disminución del tamaño esto casi nunca sucede en una verdadera lesión por VPH debido a que, necesariamente, el daño viral resulta en coilocitosis o en inestabilidad cromosómica por efecto de E6 y E7, con mutaciones de gen P53 y Rb, respectivamente. La resultante es crecimiento de la cantidad de ADN nuclear y crecimiento del núcleo con una imagen de displasia.

9. ¿Qué capas están afectadas? Desde la LBG existe afectación de todas las capas, en LBG en núcleo aunque crece, hay maduración y hay aumento de tamaño del citoplasma. En LAG, la maduración es parcial en NIC 2 y prácticamente nula en NIC 3. La coilocitosis se manifiesta en capas superficiales. NIC 1 tiene dos patrones con primordial atipia basal y maduración parcial a la superficie o mínima alteración basal y atipia superficial. El criterio más aceptado actualmente es que hay atipia en los tres tercios del epitelio; esto complica la interpretación si se aplica indiscriminadamente que habiendo atipia en las 3 capas es una LAG. Esto debe siempre estar de la mano de atipia nuclear importante y un citoplasma escaso.²⁴

10. ¿Cómo valoro las mitosis? En epitelios normales sólo debe haberlas en capas basales; por arriba de esta capa, en teoría, no debemos encontrarlas o sólo de manera ocasional. En cambios regenerativos y en hiperplasias de células basales y parabasales estas mitosis están en la mitad del epitelio y son utilizadas como apoyo de LAG. Los cortes tangenciales muestra sólo la capa basal y tienen mitosis por lo que son confundidas con LAG, como ya se comentó. Las mitosis anormales siempre deben tomarse en cuenta y generalmente están acompañadas de LAG.

11. ¿Qué tan extensa es la lesión? Al observar minuciosamente los cambios de metaplasia p16 negativo y con prueba de PCR o CH2 negativas hay de manera ocasional células aisladas con crecimiento nuclear y leve hipercretinismo. Una verdadera lesión tiene un cambio en un área definida. En la correlación con p16 las lesiones tienen una extensión focal, no tienen atipias separadas por células totalmente normales. Hay ocasiones que los fragmentos de la biopsia se separan y quedan algunos sueltos y entre moco; estos deben ser revisados minuciosamente y con frecuencia son de metaplasia inmadura y con displasia. Son muy claramente apreciados con p16 y en la revisión

de nuevo del HE fueron menospreciados o no vistos. En presencia de datos clínicos de una LAG es conveniente hacer recortes adicionales del tejido, en ellos se llegan a detectar áreas que no estaban en los recortes iniciales.

12. ¿Qué hago si no hay congruencia entre los caracteres antes descritos? ¿cuáles tienen más valor diagnóstico? Quizá lo que le sucede al núcleo de la capa basal, a la superficial y la relación núcleo citoplasma con hiperchromatismo nuclear. Si los elementos antes descritos fueran reproducibles, fácilmente aplicables y confiables la variante interobservador e intraobservador no existiría y los marcadores de IHQ no hubieran sido necesarios. La respuesta a esta pregunta es desde luego usar de manera adecuada tres marcadores primordiales: P16, Ki67 y L1 de cápsula viral.

Integración final

El siguiente paso es cómo integramos el diagnóstico con p16. En la literatura^{14,21,22} se le da valor a la tinción a partir de más de 5% de células en el área afectada. Se ha dividido la positividad en esporádica cuando es < 5% de células afectadas, focal de 6 a 25% y difusa > 25%. Esto debe valorarse en el área afectada. El grado de tinción debe ser de + a +++. Debe existir tinción preferentemente en el núcleo. La tinción exclusiva del citoplasma es generalmente interpretada como: sin lesión. De acuerdo con lo anterior las LAG son siempre positivas de manera difusa y de ++ a +++ en positividad nuclear y citoplasmática. La explicación de ello es que siempre son producidas por VPH de AR y que ya se encuentra integrado al genoma con daño en especial al RB y p53. Esto en NIC 2 lo hace muy claramente definible; NIC 3, de acuerdo con los datos de la literatura, es el grado que más reproducibilidad de diagnóstico con HE natural tiene. Los casos que histológicamente se han confundido con NIC 2 por metaplasia inmadura, atrofia y cambios regenerativos, son p16 negativos o con positividad esporádica en células de manera discontinua y que no muestran atipia evidente. Un área gris sería la positividad focal, ello requiere precisar si todo el espesor está positivo y coincide con datos de LAG histológicamente. Hay que tomar en cuenta que es un error reconocido que no siempre se logra tomar el sitio de lesión completo o bien el área es muy pequeña y los cambios por lo mismo son en una sola área que puede ser pequeña y ésta es la que hay que valorar. La tinción de p16 los resalta de manera muy clara. Si solo está positiva la capa basal y parabasal y en

la superficie es negativo esto es una LBG. En estos casos siempre se observa, al revisar el HE, que efectivamente hay maduración en las capas superficiales.

Otro aspecto que requiere atención es que en LBG hay virus tanto de AR como de BR; existe producción de colicitos exclusivamente (conocida como atipia coilocítica y que debe integrarse como LBG), colicitosis con displasia o sólo displasia. Esta combinación, junto con el tipo de epitelio afectado, da una morfología muy variada y de difícil interpretación. Los virus de BR tienen pocas posibilidades de daño permanente al genoma y son en su mayor parte p16 negativos o mínimamente reactivos de manera citoplasmática. Estadísticamente la mayor parte de las LBG son provocadas por VPH de AR,¹⁹ en esta circunstancia sólo si hay integración y daño al gen Rb existirá positividad a p16. Sin embargo, este va a ser desde esporádico (+) hasta difuso (+++) en un tercio del grosor del epitelio. En los casos de colicitosis típica es generalmente un diagnóstico que no representa problema; sin embargo, los halos claros por glucógeno son de manera sistemática sobreinterpretados^{14,17,20-23} y son p16 negativos. ¿Cómo distinguirlos? En estos casos el anticuerpo de L1 de la cápsula de VPH nos es de importante ayuda; su limitante es que sólo marca la fase final de la producción de virus, cuando ya el VPH adquiere su cápsula y está listo para infectar. Siempre se aprecian en verdaderas lesiones en la superficie algunos colicitos positivos.

Valor pronóstico

De acuerdo con la integración global de diagnóstico, tratamiento y de valor pronóstico, las LBG tienden a regresar en más de 70% de manera espontánea, sobre todo las que tienen predominio de colicitosis. Esto se ha demostrado con IHQ con p16 y L1 de la cápsula.^{21,22} p16 negativo y esporádico y L1 de cápsula positivo involucionan en un 70% de manera espontánea en menos de 1 año. El escenario inverso, p16 + y L1 de cápsula de VPH negativo progresan a LAG en un 70%. Esto tiene importancia clínica y de tratamiento ya que nos ayuda a distinguir cuáles son las LBG que evolucionarán a LAG.

Estos dos trabajos muestran que p16 es un marcador de progresión y cuándo se utiliza con L1 de la cápsula; es decir, presencia de colicitosis que significa sólo el ciclo no integrado o episomal. La utilidad clínica de estos resultados es que podemos predecir con una buen grado de certeza qué mujeres con LBG tienen riesgo de progresión

a LAG independientemente de la edad y que por ello requieren tratamiento; las que son p16 negativas podrán ser observadas con la certeza de que no progresarán a LAG. Esto es semejante a una prueba de CH2 negativa en la que, en 3 a 5 años, estas mujeres no tendrán una LAG.

En resumen: p16 es un marcador que debería de utilizarse con mucho más frecuencia en nuestra práctica diaria para el diagnóstico de la biopsia de cérvix. Las lesiones que simulan o se confunden con LBG y LAG son muy variadas y la sobreconfianza, no reconocida, por parte del patólogo en su diagnóstico es muy importante. A esto se le añade que la colposcopia también es sobrediagnosticada y se presiona al patólogo a realizar un diagnóstico que no es real, creando una complacencia cómoda para ambos. La observación sólo con HE requiere comprobación de integración del E6 y E7 del VPH que se traduce en sobreexpresión de p16 que está presente en LBG que progresará en todas las LAG, incluyendo adenocarcinomas.

REFERENCIAS

1. Wong YF, Yheng TKH, Cheung TH, Nobori T, Yim SF, Lai KWH, Phil M, et al. P16INK4 and p15INK4B Alterations in Primary Gynecologic Malignancy. *Gynecol Oncol* 1997;65:319-24.
2. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Facuda T, Nakajima T. Expression Status of the p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. *Am J Pathol* 1998;153:1741-8.
3. Hirama T, Miller CW, Wilczynski SP, Koeffler P. p16 (CDKN2/Cyclin-dependent Kinase-4 Inhibitor/Multiple Tumor Suppressor-1) Gene Is Not Altered in Uterine Cervical Carcinomas or Cell Lines. *Mod Pathol* 1996;9(1):26-31.
4. Van de Putte G, Holm R, Lie AK, Tropé CG, Kristensen GB. Expression of the p27, p21, and p16 Protein in Early Squamous Cervical Cancer and its Relation to Prognosis. *Gynecol Oncol* 2003;89:140-7.
5. Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, Cviko A, Löning T, Crum C P. Human Papillomaviruses, Expression of p16INK4A, and Early Endocervical Glandular Neoplasia. *Hum Pathol* 2002;33(9):899-904.
6. Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Susumu N, et al. p16INK4a Overexpression and Human Papillomavirus Infection in Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Hum Pathol* 2003;34:778-83.
7. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16INK4a Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A Comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Mod Pathol* 2003;16(7):665-73.
8. Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression p16 and p14ARF is Associated with Human Papillomavirus Infection in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Dysplasia. *Pathol Int* 2002;52:375-83.
9. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. P16INK4a Is Useful Marker for the Diagnosis of Adenocarcinoma of the Cervix Uteri and Its Precursors. *Am J Surg Pathol* 2003;27(2):187-93.
10. Sherman ME. Future directions in cervical pathology. *J Nat Cancer Inst* 2003;31:72-9.
11. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, et al. p16INK4as a Marker for Cervical Dyskaryosis: NIC and cGIN in Cervical Biopsies and ThinPrepTM Smears. *J Clin Pathol* 2003;56:56-63.
12. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, et al. P16INK4A immunohistochemistry Improves Interobserver Agreement in the diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389-99.
13. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun E, Duensing E, et al. Ki-67, Cyclin E, p16INK4A Are Complementary Surrogate Biomarkers for Human Papilloma Virus-Related Cervical Neoplasia. *Am J. Surg Pathol* 2001;25:884-91.
14. Nucci MR, Crum CP. Redefining early cervical neoplasia: recent progress. *Adv Anat Pathol* 2007;14:1-10.
15. Curiel-Valdés JJ. Biopsia del cuello uterino ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico? Utilidad de p16INK4A para lograrlo. *Ginecol Obstet Mex* 2007;75:615-20.
16. Curiel Valdes JJ, Merchan Esdalante GR, Sanchez Mitre A, Chávez Ramos N, Santamaría Santos JA. Imágenes acetó-reactivas en colposcopía ¿en qué proporción significan una real enfermedad? Correlación con Biopsia y p16INK4A Rev de Enfermedades del Tracto Genital Inferior 2008;2:45-51.
17. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol annu* 1973;8:301-328.
18. Sherman ME, Schiffman MH, Erozan YS, et al. The Bethesda system. A proposal
19. ALTS study group. Results of a randomized trial on the management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;107:822-829.
20. Elit LE. Pitfalls in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia 1. *J Low Gen Tract Dis* 2004;8:181-187.
21. Hilfrich R, Hariri J. Prognostic relevance of Human Papillomavirus L1 capsid protein detection with mild and moderate dysplastic lesion of the cérvix uteri in combination with p16 biomarker Analytical and Quantitative Cytology and Histology 2008;30:78-82.
22. Kalof AN, Cooper K. p16INK4a Immunoexpression: Surrogate Marker of High-risk HPV and High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2006;4:190-194
23. Melo Cerda I. Presentación de un caso de Captura de Híbridos negativa y lesión de alto grado Poster presentado en congreso de colposcopia Veracruz México Agosto 2012
24. Roboy SJ, Anderson MC, Russell P. Pathology of the female reproductive tract Churchill Livingstone 2002; pp. 165-193.