

Expresión de p16INK4a en biopsias de cérvix uterino. Utilidad en el diagnóstico diferencial entre cervicitis crónica reactiva, neoplasia intraepitelial cervical de bajo y alto grado y carcinoma invasor

Ana Marcela Canedo Patzi,* Avisaí Alcántara Vázquez,** Carlos Ortiz Hidalgo*

RESUMEN

La morbitmortalidad por carcinoma de cérvix uterino ha disminuido gracias a la citología cervicovaginal que detecta lesiones cervicales tempranas. Sin embargo, el índice de falsos positivos y negativos, así como la falta de reproducibilidad intra e interobservador en el diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical han llevado a investigar marcadores objetivos para la identificación de células displásicas. p16INK4a es un producto del gen p16, que ha demostrado ser útil en distinguir células neoplásicas de células reactivas. Estudiamos 65 biopsias de cérvix con diagnósticos de cervicitis crónica en seis, lesión intraepitelial de bajo grado en 15, lesión intraepitelial de alto grado en 28 (15 NIC II y 13 NIC III), carcinoma epidermoide *in situ* en dos y carcinoma invasor en 14. Nuestros resultados demostraron relación directa entre la sobreexpresión de p16INK4a mediante inmunohistoquímica, y el grado de lesión neoplásica. Novena y dos por ciento de carcinomas invasores, 100% de carcinomas *in situ* y 100% de lesiones intraepiteliales de alto grado expresaron p16. Todos los cérvix reactivos fueron negativos al p16. Del grupo de lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado, sólo 33.33% fueron positivas a p16. Estos hallazgos confirman la utilidad de p16INK4a para distinguir cérvix reactivo de lesiones intraepiteliales de alto grado.

Palabras clave: p16, neoplasia cervical intraepitelial, carcinoma *in situ*.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma cervicouterino es una de las neoplasias más comunes en todo el mundo, con una frecuencia aproximada de 15% de todos los cánceres en países en desarrollo y de 4.4% en na-

ABSTRACT

Morbimortality of carcinoma of the uterine cervix has been reduced by cytological screening, which detects early lesions. However false negative and positive rates for cervical premalignant lesions and problems with intra and interobserver reproducibility in histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia have forced to investigation objective markers for identifying dysplastic cells. p16INK4a is a product of gen p16, useful for distinguishing cervical neoplastic lesions from reactive cells. We studied 65 biopsies of uterine cervix with diagnosis of reactive cervix in six cases, low grade intraepithelial lesion in fifteen, high grade intraepithelial lesion in twenty eight (15 NIC II and 13 NIC III), in situ carcinoma in two and invasive carcinoma in fourteen. Our results showed a direct relationship between the immunohistochemical over expression of p16INK4a and the grade of the neoplastic lesion. Ninety two percent (92%) of invasive carcinomas, 100% of in situ carcinomas and 100% of high-grade intraepithelial lesion (NIC III) showed positivity for p16. All the reactive cervix were negative for p16. Of the group of the low-grade intraepithelial lesions, only 33.33% were positives for p16. Our results confirm the utility of the p16INK4a for distinguishing reactive from intraepithelial lesions of the uterine cervix.

Key words: p16, cervical intraepithelial neoplasia, carcinoma *in situ*.

ciones desarrolladas.¹ La diferencia que existe con relación al pronóstico entre mujeres con lesiones preinvasoras y aquéllas con carcinoma cervicouterino invasor es significativa, por lo cual es importante detectar en forma temprana estas lesiones.^{1,2}

* Departamento de Patología, Centro Médico ABC.

** Unidad de Patología, Hospital General de México, Secretaría de Salud.

Recibido para publicación: 19/04/06. Aceptado: 05/05/06.

Correspondencia: Dr. Carlos Ortiz Hidalgo

Centro Médico ABC, Departamento de Patología
Sur 136 núm. 116, Col Las Américas, 01120 México, D.F.
Tel: 5230-8171. E-mail: cortiz@abchospital.com

La citología cervicovaginal es uno de los métodos de detección precoz de lesiones cervicales más eficientes que ha disminuido considerablemente las cifras de morbitmortalidad a causa de esta neoplasia. Sin embargo, esta técnica tiene un índice de falsos negativos de hasta 50% y de falsos positivos de 30%, atribuido a la subjetividad de los criterios citológicos diagnósticos de este método.¹ Igualmente, la interpretación histopatológica de procesos reactivos y lesiones intraepiteliales cervicales involucra una variabilidad de interpretación, lo que ha llevado a buscar estudios adicionales que permitan, por un lado, realizar un diagnóstico más confiable con menores índices de falsos positivos y negativos y, por otro lado, que incrementen el acuerdo diagnóstico entre patólogos, tanto en biopsias como en citologías cervicovaginales.

Uno de estos estudios ha sido el empleo de marcadores mediante inmunohistoquímica como el Ki-67 (MIB-1), la p53, el bcl-2 y la ciclina E, entre otros.^{2,3} Sin embargo, la mayoría de estos marcadores no distinguen células neoplásicas de células reactivas, pues sólo reflejan el nivel de proliferación de una población celular en general.

Recientemente se ha utilizado el p16INK4a, cuya sobreexpresión está relacionada con infección por virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, factor que es esencial para la oncogénesis cervical. Diversos estudios aseguran que es un marcador potencial de lesiones neoplásicas intraepiteliales, sobre todo de alto grado.^{1,4}

Informamos en este estudio sobre el empleo de la p16INK4a por inmunohistoquímica en 65 biopsias de cérvix, que incluyen procesos reactivos inflamatorios y neoplasias escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado, y carcinoma escamoso, para determinar las diferencias de expresión en estos grupos y evaluar la utilidad para mejorar la concordancia diagnóstica de biopsias de cérvix en este tipo de procesos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron 65 bloques de parafina correspondientes a biopsias de cérvix uterino, de los archivos de los Departamentos de Patología Quirúrgica

del Hospital General de México y del Centro Médico ABC; 59 y seis, respectivamente. Todas las muestras fueron diagnosticadas previamente por patólogos de ambos centros y los diagnósticos emitidos incluyeron: cervicitis crónica, lesión intraepitelial cervical de bajo grado (LIECBG) y lesión intraepitelial cervical de alto grado (LIECAG) (criterios diagnósticos de Bethesda),⁵ o neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I, II y III (criterios diagnósticos de la Organización Mundial de la Salud).

Se realizaron dos cortes de cada bloque de parafina, uno de los cuales fue teñido con hematoxilina y eosina y el otro destinado para análisis mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal específico p16INK4a (DAKO, dilución 1:25, tiempo de incubación de dos horas, recuperación con Declere). La interpretación de la marcación de p16 fue considerando tres categorías: 1) *Positiva focal*: marcación nuclear y/o citoplasmática (calificada en intensidad de 1 a 3 + y valorada en positividad de afección a 1/3, 2/3 o 3/3 del epitelio cervical) en menos del 25%, pero en más del 5% de células neoplásicas. 2) *Positiva difusa*: marcación nuclear y/o citoplasmática (calificada en intensidad de 1 a 3 + y valorada en 1/3, 2/3 o 3/3 del epitelio cervical) en más del 25% de células neoplásicas, y 3) *Negativa*: marcación en menos del 5% de células neoplásicas o en ninguna de las células neoplásicas.

Finalmente, se determinó la relación existente entre la expresión de p16INK4a y el grado de lesión intraepitelial cervical.

RESULTADOS

Las edades de las pacientes a quienes se tomaron las 65 biopsias de cérvix uterino variaron entre 18 y 87 años. No se obtuvieron más datos clínicos.

Los diagnósticos emitidos inicialmente en las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) en las 65 biopsias fueron: cervicitis crónica en seis casos, lesión intraepitelial cervical de bajo grado (LIECBG) asociada a virus del papiloma humano (VPH) en 15, lesión intraepitelial cervical de alto grado (LIECAG) en 28 (15 NIC II y 13 NIC III), carcinoma epidermoide *in situ* en dos y carcinoma

Cuadro I. Relación expresión de p16 con diagnósticos en biopsias de cérvix uterino.

Diagnóstico	Casos N	Negativo		Positivo focal		Positivo difuso	
		n	%	n	%	n	%
Cervicitis crónica	6	6	100.00	0	0.00	0	0.00
LIECBG	15	10	66.67	3	20.00	2	13.33
LIECAG (NIC II)	15	6	40.00	3	20.00	6	40.00
LIEAG (NIC III)	13	0	0.00	1	7.69	12	92.31
Carcinoma <i>in situ</i>	2	0	0.00	0	0.00	2	100.00
Carcinoma invasor	14	1	7.14	0	0.00	13	92.86

Abreviaturas: LIECBG = Lesión intraepitelial cervical de bajo grado. LIECAG = Lesión intraepitelial cervical de alto grado.

epidermoide invasor en 14 (*Cuadro I*). En el grupo de LIECAG, siete de las 15 NIC II y seis de las 13 NIC III, así como todas las LIECBG mostraron cambios citológicos sugerentes de lesión por virus del papiloma humano (VPH).

En relación con la inmunomarcación, en ninguno de los casos de cervicitis crónica hubo expresión de p16 (*Figura 1*). Del grupo de las LIECBG, del total de 15 casos, 10 (66.67%) fueron negativos a la p16. De los restantes cinco casos, tres (20%) expresaron el marcador en forma focal y dos (13.33%) en forma difusa, de los cuales la intensidad de la inmunomarcación fue de 2+ en una y de 3+ en otra, ambas ocupando el tercio inferior del epitelio exocervical (*Figura 2*).

Las LIECAG se dividieron en dos grupos de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno que correspondió a NIC II y otro a NIC III. En el grupo de NIC II, del total de 15 casos, 40% (seis casos) no expresaron el marcador y 60% (nueve casos) sí lo hicieron. De estos últimos nueve casos positivos, seis lo expresaron en forma difusa y los otros tres en forma focal. De los seis casos con marcación difusa a p16, cuatro lo expresaron con 3+ de intensidad, uno con 1+ y el otro con 2+. En estos seis casos, el tercio del epitelio ocupado por células neoplásicas positivas varió desde 1/3 en cuatro casos, 2/3 en otro y 3/3 en el último. En cambio, los tres casos que expresaron el marcador en forma focal lo hicieron con 1+ de intensidad. Del grupo de NIC III, los 13 casos (100%) fueron posi-

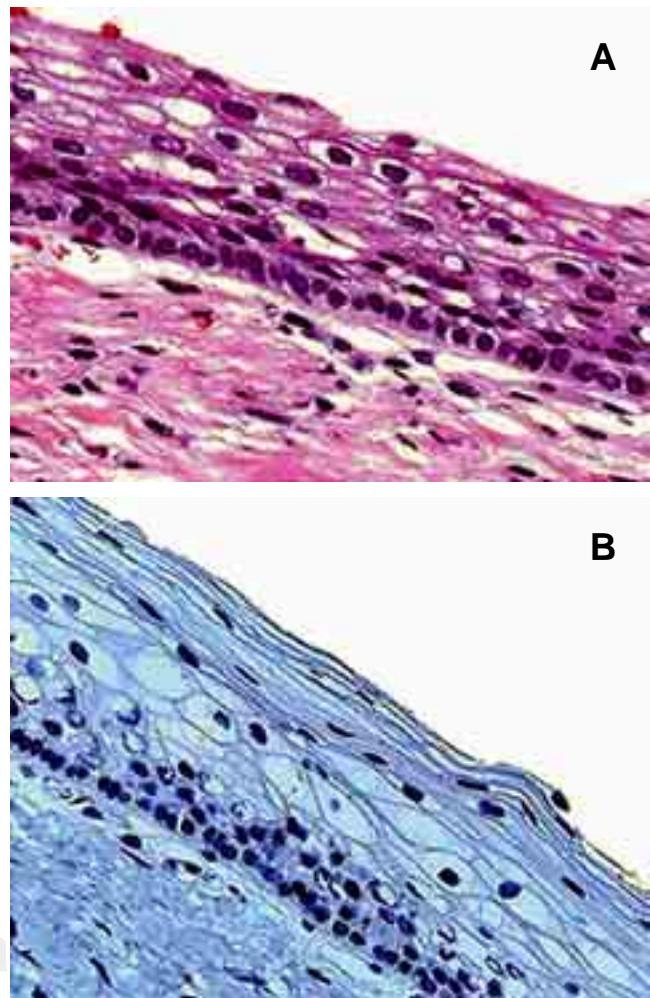


Figura 1. A: Epitelio exocervical normal (H&E). B: Epitelio cervical normal (p16). La inmunoreactividad para la p16 está confirmada en los núcleos del epitelio del tercio inferior del epitelio.

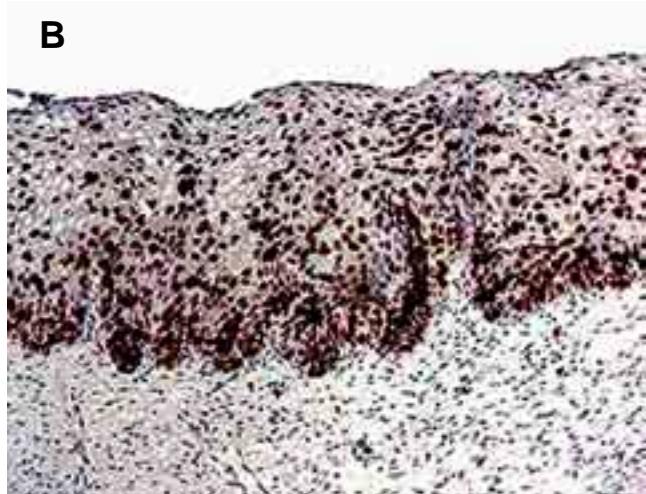
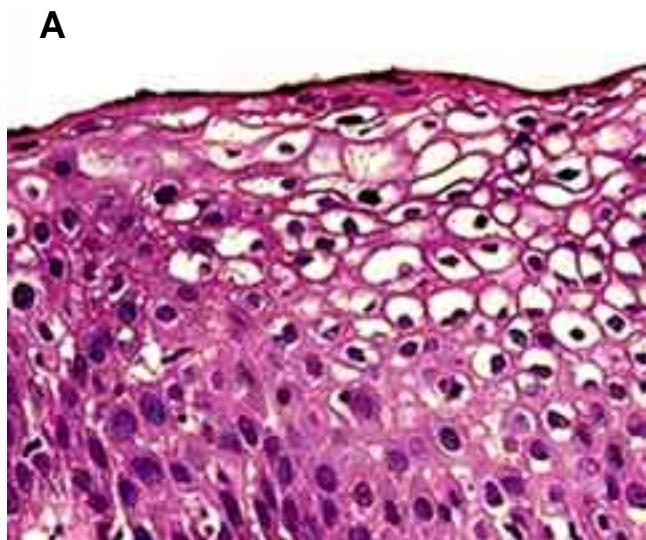


Figura 2. A: Lesión intraepitelial cervical de bajo grado (H&E). B: Lesión intraepitelial cervical de bajo grado (p16). La inmunoreactividad para la p16 es predominante en el tercio inferior y medio del epitelio.

vos a la p16 (*Figura 3*), 12 en forma difusa con 3+ de intensidad y uno en forma focal con 1+.

El 100% de los carcinomas *in situ* mostraron positividad a la p16, con 3+, ocupando todo el grosor del epitelio en un caso, y 2/3 del mismo en el otro. Trece (92.86%) de los 14 carcinomas invasores fueron positivos a la p16 (*Figura 4*). La intensidad de la inmunomarcación fue de 3+ en 10 casos y de 2+ en tres. De estos casos positivos, uno ocupó los 2/3 del epitelio, otro 1/3 del mismo y 11 ocuparon todo el espesor (3/3). Sólo un caso (7.14%) no expresó p16.

DISCUSIÓN

El carcinoma cervicouterino es una de las neoplasias más frecuentes en todo el mundo, por lo cual se han buscado métodos de detección precoz. La búsqueda citológica mediante el examen del Papapánicolaou (citología cervicovaginal) ha sido una técnica muy eficiente para detectar en forma temprana esta neoplasia y reducir así su morbimortalidad. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que el diagnóstico puede recaer en algunos parámetros citológicos subjetivos, dando como resultado un alto índice de falsos positivos y falsos negativos.^{1,2} En consecuencia, el estudio de la biopsia cervical ha sido considerado como comple-

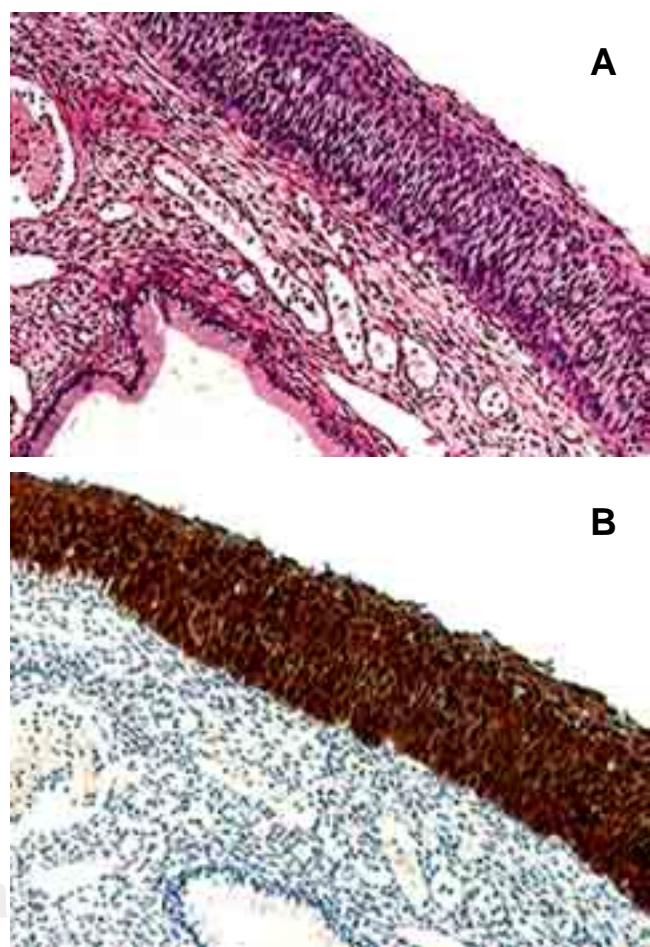


Figura 3. A: Lesión intraepitelial cervical de alto grado (NIC III) (H&E). B: Lesión intraepitelial cervical de alto grado (p16). La inmunoreactividad para la p16 abarca todo el espesor del epitelio.

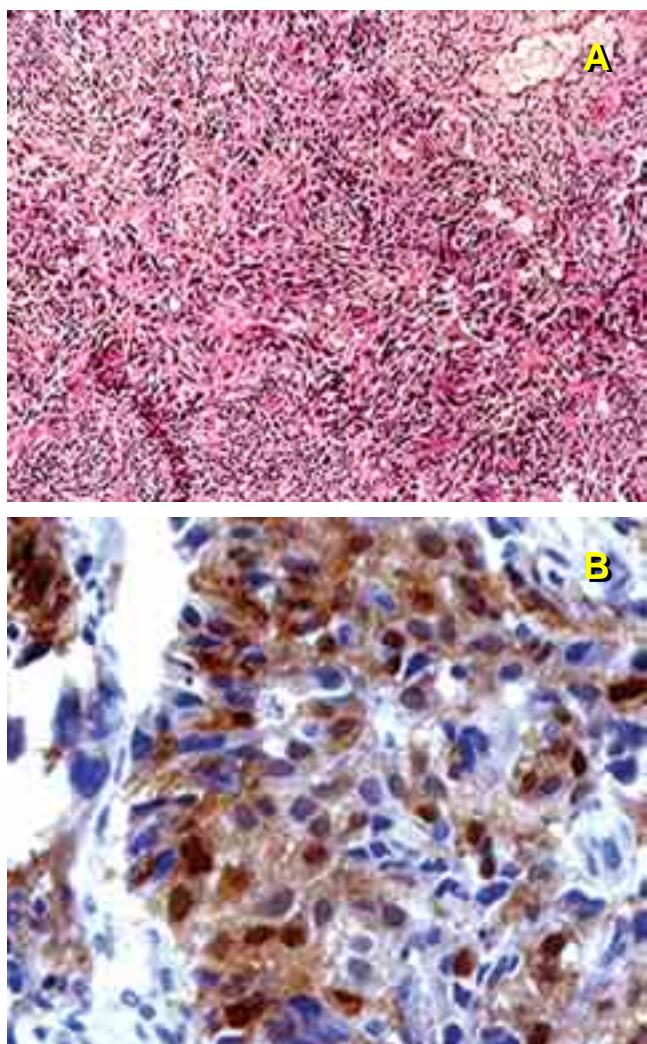


Figura 4. A: Carcinoma invasor (H&E). B: Carcinoma invasor (p16). Hay inmunomarcación difusa de la p16.

mento para el diagnóstico de neoplasia cervical. El análisis histopatológico, sin embargo, ha presentado una gran variabilidad diagnóstica intra e interobservador.²

Existe una relación muy estrecha del carcinoma cervicouterino y sus lesiones precursoras con la infección por virus del papiloma humano (VPH), el cual es considerado como el factor de riesgo principal para desarrollar este carcinoma. El VPH pertenece a una familia de virus ADN, de los cuales existen más de 70 tipos. Éstos han sido divididos en tres categorías, de acuerdo a su asociación con lesiones intraepiteliales cervicales y con carcinoma

escamoso invasor. Uno de los grupos considerado de alto riesgo carcinogénico comprende a los tipos 16 y 18. El segundo grupo, considerado de probable alto riesgo, comprende los tipos 26, 53 y 66; y el tercer grupo, considerado de bajo riesgo asociado sobre todo al condiloma, comprende los tipos 6 y 11, entre otros.⁶ La determinación del tipo de VPH permite seleccionar mujeres que tienen riesgo elevado de desarrollar carcinoma cervicouterino o lesiones precursoras intraepiteliales escamosas. Principalmente los tipos 16 y 18 se han detectado en más del 99% de LIECAG y en carcinomas cervicouterinos.⁷ Sin embargo, aunque no hay una explicación adecuada al respecto, también existe entre un 5 a 25% de mujeres con cérvix histológicamente normal que presentan infección por VPH de alto riesgo, de las cuales muy pocas desarrollan lesiones precancerosas y carcinoma invasor.⁴

La influencia oncogénica del VPH de alto riesgo depende de la interacción del producto viral con proteínas específicas del huésped. Se han descrito dos proteínas virales: E6 y E7 que actúan en diversos sitios intracelulares y son necesarias para inducir y mantener el crecimiento neoplásico del epitelio cervical. La proteína E6 inicia la degradación prematura de la proteína supresora de tumor p53, y la proteína E7 se une a la proteína supresora de tumor de retinoblastoma (Rb). Esta proteína Rb normalmente participa en la retroalimentación negativa al inhibir la transcripción de la proteína p16INK4a (inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina). De esta manera, la unión de la proteína viral E7 con la Rb provoca la inactividad de la Rb, lo que conduce a la ausencia de su efecto regulador sobre la proteína p16, quedando ésta así sobreexpresada.⁸

La proteína p16INK4a es un producto del gen p16, también conocido como INK4 o INK4a debido a que pertenece a la familia de reguladores del ciclo celular, llamados inhibidores de cinasa dependiente de ciclina. Esta proteína p16INK4a se une a complejos "cyclina-inhibidores de cinasa" 4 y 6, y produce, por consiguiente, detención del ciclo celular en la fase G1, ejerciendo así un efecto antiproliferativo. Por ello, el gen p16 o INK4a actualmente es considerado como un gen supresor de tumor. Este gen está localizado en el cromoso-

ma 9p21, región en la que pueden producirse alteraciones genéticas diversas. Se han detectado estas alteraciones en muchos cánceres humanos, como por ejemplo delecciones hemi y homocigotos, así como mutaciones germinales en niños con melanoma familiar y adenocarcinoma pancreático; y mutaciones somáticas o delecciones alélicas en muchos melanomas esporádicos, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas relacionados a esófago de Barrett, carcinoma de células transicionales de la vejiga y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, entre muchos otros.^{8,9}

Existe un anticuerpo que hace patente la expresión de la proteína p16INK4a mediante inmunohistoquímica aplicable a tejido incluido en parafina. Este anticuerpo permite detectar el estado de p16INK4a, independientemente del mecanismo de inactivación del gen. Nielsen analizó la p16INK4a en tejido normal humano adulto e infantil, encontrando la expresión del mismo en endometrio proliferativo, epitelio mamario ductal, epitelio con metaplasia escamosa y tubárica de cérvix uterino, epitelio escamoso esofágico, glándulas salivales, glándulas gástricas antrales y glándulas endocrinas, en adultos. En niños, se encontró expresión de p16 en corpúsculos de Hassall, linfocitos tímicos y escasas células epiteliales pancreáticas.⁹ Igualmente, la p16INK4a se ha analizado en diversos tejidos neoplásicos y se ha relacionado como factor pronóstico, ya que se ha encontrado que la pérdida de la expresión de esta proteína, se asocia con mal pronóstico hasta en 20% de carcinomas gástricos, con invasión o metástasis en melanomas malignos y con mayor riesgo de progresión a carcinoma en lesiones premalignas de cabeza y cuello.⁹⁻¹¹ Esta relación entre la pérdida de expresión de p16 y mal pronóstico se ha comprobado tanto en carcinomas como sarcomas, destacando el valor de p16 por inmunohistoquímica como factor pronóstico.^{10,11}

Con relación específica a lesiones neoplásicas endo y endocervicales se han realizado dos estudios.^{12,13} Finegan y colaboradores estudiaron 54 casos de carcinoma escamoso del aparato genital femenino (30 cervicales, nueve vaginales y 13 vulvares), y encontraron que 74% mostraron sobreexpresión de p16. No hubo expresión del

marcador en los casos de displasia de bajo grado. Esto sugiere que la p16 se expresa en la gran mayoría de los carcinomas del aparato genital femenino, lo cual refleja que la génesis tumoral del carcinoma escamoso en estas localizaciones está relacionada con la vía dependiente de p16. En este estudio sólo los carcinomas escamosos primarios de endometrio no expresaron esta proteína, lo que posiblemente indique que en este órgano el carcinoma escamoso puede desarrollarse por una vía alterna a proteína.¹²

Klaes y asociados estudiaron la sobreexpresión de la p16, comparando lesiones cervicales reactivas y neoplásicas (42 normales, 48 inflamatorias, 21 hiperplasias de células de reserva, 47 NIC I, 32 NIC II, 60 NIC III y 60 carcinomas invasores), encontrando la sobreexpresión del marcador en el 100% de los casos diagnosticados como NIC II y NIC III; y en el 97% de los carcinomas invasores.¹³ De los NIC I, el 100% de los casos estuvieron asociados a VPH de alto riesgo y expresaron la p16. En cambio los cérvix normales, inflamatorios y con NIC I asociado a VPH de bajo riesgo, fueron negativos o lo expresaron en forma focal o esporádica. En todos los grupos la sobreexpresión de p16 estuvo muy relacionada a las lesiones asociadas a VPH de alto riesgo.¹³

Otro estudio realizado por Sano y su grupo mostró la sobreexpresión de p16 con marcación intensa y difusa en todos los carcinomas cervicouterinos y las lesiones preneoplásicas asociadas con VPH de riesgo intermedio y alto (tipos 16,18,31,33,52,58). En cambio, las LIECBG y los condilomas acuminados infectados por VPH de bajo riesgo (tipos 6/11) mostraron marcación sólo focal y débil para la p16. Sin embargo, 15 LIECBG negativas para VPH también expresaron el marcador, 12 con marcación difusa y tres focal. A pesar de este último resultado, el porcentaje alto de lesiones asociadas a VPH de alto riesgo que sobreexpresan p16 sugieren que este marcador es de utilidad para diferenciar lesiones neoplásicas cervicales relacionadas a VPH de riesgo intermedio y alto, de las relacionadas a VPH de bajo riesgo.¹⁴ Un grupo de investigadores estudió la expresión de p16 en biopsias cervicales y demostraron que este marcador no se expresó en ninguna de las

biopsias de cérvix normal, pero sí en 100% de las biopsias de cérvix con diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical glandular, NIC I, NIC II y carcinoma invasor.¹ En el grupo de NIC III, 98% de los cérvix expresaron el marcador, quedando sólo un caso negativo (2%). Estos autores concluyeron que la p16 marca células glandulares y escamosas displásicas de cérvix con una sensibilidad del 99% y con una especificidad del 100%.¹

Los adenocarcinomas endocervicales también se asocian con VPH de alto riesgo y con sobreexpresión de p16. Un análisis de 45 lesiones glandulares de cérvix uterino demostró la expresión de la proteína p16 en forma difusa en 94.4% de adenocarcinomas y en 100% de adenocarcinomas *in situ*. En cambio, marcación focal se observó en un adenocarcinoma y en cuatro glandulares endocervicales con atipia, y resultaron negativos todos los casos reactivos.⁸ En otro estudio, 94% de los adenocarcinomas cervicales relacionados a VPH de alto riesgo (16 y 18) expresaron este marcador, lo que sugiere que estos tipos de VPH también están relacionados con la carcinogénesis del adenocarcinoma cervical, lo cual puede ser evidenciado por la sobreexpresión de p16.¹⁵ Estos dos estudios previamente mencionados también investigaron la expresión de la proteína p16 en citologías cervicovaginales. El primero, en 10 citologías diagnosticadas como AGUS (células atípicas glandulares de significado incierto) positivas para VPH de alto riesgo, el 100% resultaron positivas⁸ y el segundo, demostró que 12 de 14 citologías de adenocarcinomas endocervicales mostraron la sobreexpresión de esta proteína.¹⁵

Riehdorf y colaboradores informaron que, en lesiones endocervicales benignas y adenocarcinomas *in situ*, la sobreexpresión fue intensa y difusa de p16 en 41 de 42 adenocarcinomas *in situ*. Sin embargo, esta sobreexpresión también se observó en 43 de 50 procesos benignos (metaplasia tubaria atípica, metaplasia endometrial, metaplasia tubaria, atipia reactiva/reparativa e hiperplasia glandular/microglandular), pero la positividad en estos casos fue en forma heterogénea y no difusa, como en los adenocarcinomas *in situ*. Es importante mencionar que de los 42 adenocarcinomas *in situ*, 32 estuvieron asociados a VPH de alto

riesgo. Por lo anterior, los autores de este estudio sugieren que el patrón de tinción difuso de p16 apoya la asociación de lesiones glandulares endocervicales con el VPH de alto riesgo, ya que ninguna de las lesiones benignas que mostró tinción heterogénea o focal de p16 estuvo asociada a infección por este virus.¹⁶

Todo lo anterior demuestra que la sobreexpresión de p16 por inmunohistoquímica es una herramienta útil para identificar lesiones neoplásicas del epitelio endo y exocervical, y distinguirlas de condiciones reactivas. Este marcador es valioso tanto en cortes histológicos como en citologías, que actualmente representan el método estándar de detección de lesiones cervicales.

Algunos otros marcadores por inmunohistoquímica como el Ki-67, el bcl-2 pueden ser de utilidad en el diagnóstico de neoplasias endocervicales y exocervicales.¹⁷ Se han empleado estos marcadores para distinguir neoplasias glandulares intraepiteliales cervicales, de procesos benignos, incluyendo metaplasia tuboendometrial, endometriosis e hiperplasia microglandular.¹⁷ En todos los casos de neoplasias glandulares intraepiteliales cervicales, se encontró marcación intensa a p16 y Ki-67 y difusa en 100% de las células neoplásicas, mientras que todos los casos de hiperplasia microglandular fueron negativos. En el caso de metaplasia tuboendometrial, 62% mostraron positividad focal y en tres casos de endometriosis hubo marcación de más del 50% de células con p16 y Ki-67. Estos resultados se correlacionaron con los de Ki-67 (MIB1), marcador que resultó positivo en las neoplasias y negativo en los procesos reactivos, y con el bcl-2 que resultó positivo en la mayoría de los procesos benignos y negativo en las neoplasias. Todo esto sugiere que esta combinación (positividad difusa para p16, alto índice de proliferación con Ki-67 y negatividad para bcl2) puede resultar útil para distinguir neoplasia intraepitelial glandular cervical de procesos benignos.¹⁷

La sobreexpresión de la p16 en el carcinoma de células pequeñas de cérvix uterino, considerado más agresivo que el escamoso, ha sido encontrada en el 100% de los casos. Es interesante mencionar que todos estos carcinomas estuvieron asociados a infección por VPH de alto riesgo (16 y 18).¹⁸

En relación con nuestro estudio, los resultados de las lesiones reactivas de cérvix concuerdan con estudios previamente realizados,¹³ ya que el 100% de procesos reactivos no expresaron el marcador p16. Sin embargo, hay que tener en consideración que existen trabajos que han encontrado expresión de p16 hasta en un 12% de biopsias de cérvix normal.^{2,4,13}

En el grupo de LIECAG, nuestro estudio presentó 60% de NIC II y de 100% de NIC III positivos a p16. Estos porcentajes son similares a los encontrados en la mayoría de las publicaciones y, tomando en cuenta que estos dos grupos de lesiones generalmente están asociados a VPH de alto riesgo, podemos inferir que la expresión de p16 es útil para sospechar la infección por este tipo de VPH en pacientes con estas lesiones. También en el grupo de carcinoma *in situ* y carcinoma invasor (100 y 92.86%, respectivamente) expresaron la p16, lo cual concuerda con los dos estudios realizados por Klaes, Sano y Agoff y colaboradores, quienes encontraron cifras entre 89% y 100% de casos positivos.^{2,4,13,14} Sin embargo, otros estudios como el de Finegan encontraron sólo 74% de los carcinomas escamosos positivos a p16; porcentaje menor que en nuestro estudio.

En el grupo de LIECBG la expresión de p16 se presentó en 33.33% de los casos comparado con el 66.67% de los que fueron negativos al marcador. Estos resultados difieren con los encontrados por Klaes, en los cuales un 86% de los NIC I expresaron la p16.¹³ Esta diferencia de expresión en LIECBG puede ser explicada por el hecho de que en este grupo existen dos categorías: las que solamente muestran datos de infección por VPH (no relacionados a VPH de alto grado y negativos a p16) y las que sí expresan oncogenes de VPH de alto riesgo (positivos a p16).

En todos los grupos hubo una relación directa entre el grado de lesión neoplásica y la intensidad de la marcación con p16; de modo que la mayoría de las LIEAG (13 de 15 NIC III y 12 de 16 carcinomas) expresaron p16 con 3+ de intensidad; mientras que en los casos de las LIECBG sólo la mitad resultaron positivos 3+ de intensidad y la otra mitad 1+. Esta relación también se encontró entre el grado de lesión neoplásica y el tercio del

epitelio exocervical ocupado por células neoplásicas positivas a la p16, ya que en las lesiones de alto grado (12 de 13 NIC III y 13 de 16 carcinomas) las células positivas ocuparon todo el espesor del epitelio cervical. Debido a lo anterior, al examinar la positividad de la p16, hay que tomar en cuenta primero, la extensión, si es focal o difusa, la intensidad de tinción y el tercio del epitelio ocupado por células positivas.

CONCLUSIONES

La sobreexpresión de la p16 ha demostrado ser de gran utilidad en la distinción entre procesos reactivos, displásicos y carcinomas *in situ*. Existe relación directamente proporcional entre la sobreexpresión de p16 (tanto en intensidad de tinción como en el tercio ocupado del epitelio por células positivas) y el grado de lesión intraepitelial cervical; es decir LIECAG y carcinomas muestran mayor sobreexpresión con una intensidad de marcación de 3+ y ocupando todo el espesor del epitelio cervical.

El diagnóstico de las lesiones neoplásicas del cérvix debe basarse en el estudio minucioso de la biopsia teñida con hematoxilina y eosina, para lo cual es indispensable la correcta orientación del tejido para evaluar el epitelio, el tamaño adecuado de la biopsia y la correcta fijación y procesamiento del tejido. A lo anterior se puede añadir, con fundamento en nuestros resultados y los de la literatura, el empleo del marcador de inmunohistoquímica p16.

BIBLIOGRAFÍA

- Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. p16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 77-83.
- Agoff SN, Lin P, Moribara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsy 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: 665-673.
- O'Neill CJ, McCluggage WG. P16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 8-15.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, Doeberitz MVK. p16INK4a Immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1389-1399.

5. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer* 2006; 106: 1054-1064.
6. Fortune D, Scurry J. The use of p16INK4a as an adjunct to interpretation of cervical biopsies. *Pathology* 2006; 37: 112-124.
7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
8. Negri Giovanni, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian Christine. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. An immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 187-193.
9. Saad RS, Kanbour-Shakir A, Lu E, Modery J, Kanbour A. Cytomorphologic analysis and histological correlation of high-grade squamous intraepithelial lesions in postmenopausal women. *Diagn Cytopathol* 2006; 34: 467-471.
10. Lehnerdt G, Fischer M. P16(INK4alpha)/exon 2 mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Acta Otorrinolaringol* 2006; 126: 414-417.
11. Finegan MM, Han AC, Edelson MI, Rosenblum NG. Pp16 expression in squamous lesions of the female genital tract. *J Mol Histol* 2004; 35: 111-114.
12. Klaes R, Friedrich T, Spitzkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt, Koeberitz MVK. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92: 276-284.
13. 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: 1741-1748.
14. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N, Saito M, Mukai M, Nindl I, Ridder R, Fukuchi T, Kubusiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. Correlation of p16INK4a overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22: 378-385.
15. Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, Cviko A, Löning T, Crum CP. Human papillomaviruses, expression of p16INK4a and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2002; 33: 899-904.
16. Cameron RI, Maxwell P, Jenkins D, McCluggage WG. Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assist in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. *Histopathology* 2002; 41: 313-321.
17. Wang HL, Lu DW. Detection of human papillomavirus DNA and expression of p16, Rb, and p53 proteins in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 901-908.