



## Biopsia del cuello uterino ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico? Utilidad de p16INK4A para lograrlo

José de J. Curiel Valdés\*

Nivel de evidencia: III

### RESUMEN

**Antecedentes:** la biopsia de cuello uterino, mediante la tinción de hematoxilina y eosina, se considera el patrón de referencia (estándar) para establecer el diagnóstico de neoplasia intraepitelial del cuello uterino; sin embargo, se ha demostrado una baja concordancia diagnóstica. Klaes demostró que la tinción con p16 aumenta la concordancia diagnóstica para la neoplasia intraepitelial del cuello uterino de 40 a 97%; por lo tanto, su confiabilidad, sensibilidad y especificidad para detectar la neoplasia en cualquiera de sus variedades es de 100%.

**Objetivo:** conocer la concordancia diagnóstica entre los histopatólogos mexicanos al estudiar dos muestras con neoplasia intraepitelial del cuello uterino teñidas con hematoxilina y eosina, y con p16.

**Material y métodos:** se mostraron dos biopsias del cuello uterino, teñidas con hematoxilina y Eosina, y con p16, para que los patólogos expresaran su diagnóstico entre las cuatro variedades de la neoplasia.

**Resultados:** la concordancia en el fragmento 1 (hematoxilina y eosina) resultó con diagnóstico de NIC 1 en 52.5%, y en el fragmento 2 con NIC 2 en 17.8%. La concordancia con las biopsias procesadas con p16 fue de casi 100% en ambos fragmentos.

**Conclusión:** es evidente que la aplicación de los criterios diagnósticos, aunque en teoría son conocidos por los patólogos, no se aplican correctamente de manera rutinaria. El p16 resultó una herramienta útil para establecer el diagnóstico correcto, ya que es una técnica confiable y reproducible.

**Palabras clave:** biopsia del cuello uterino, p16, neoplasia intraepitelial del cuello uterino, concordancia diagnóstica.

### ABSTRACT

**Background:** Cervical biopsy is the gold standard method used for diagnosing cervical intraepithelial neoplasia, however, it has been stated a very low diagnostic agreement. Klaes demonstrates that p16 immunohistochemical marker increases from 40 to 97% the diagnostic agreement in cervical intraepithelial neoplasia; due to it, its reliability, sensitivity and specificity to detect any neoplasia variant is 100%.

**Objective:** To know the diagnostic agreement between Mexican pathologists during the study of two cervical intraepithelial neoplasia specimens stained with hematoxylin and eosin, and with p16, respectively.

**Material and Methods:** Two cervical biopsies, one stained with hematoxylin and eosin, and the other with p16, were shown to Mexican pathologists in order to express their diagnosis within the four neoplasia variants.

**Results:** When using hematoxylin and eosin, 52.5% of fragment 1 cases had a CIN 1 diagnosis agreement, and 17.8% of fragment 2 had a CIN 2 diagnosis agreement. In both fragments, almost 100% of biopsies processed with p16 had an agreement.

**Conclusion:** It is clear that in daily practice the diagnostic criteria are in theory known but not correctly applied among pathologists; p16 is a useful, reliable and reproducible technique to establish the right diagnosis.

**Key words:** Cervical biopsy, p16, cervical intraepithelial neoplasia, diagnostic agreement.

### RÉSUMÉ

**Antécédents:** la biopsie cervicale réalisée avec la teinture d'hématoxyline et éosine est considérée le patron de référence (standard) pour établir le diagnostic de néoplasie intra épithéliale du col utérin ; toutefois, on a démontré une faible concordance diagnostique. Le pathologiste Klaes a démontré que la teinture avec p16 augmente la concordance diagnostique pour la néoplasie intra épithéliale du col utérin de 40 à 97%; donc, sa fiabilité, sensibilité et spécificité pour détecter la néoplasie dans n'importe quelle de ses variétés est de 100%.

**Objectif:** connaître la concordance diagnostique entre les histopathologistes mexicains lors de l'étude de deux échantillons avec néoplasie intra épithéliale du col utérin teintés avec hématoxyline et éosine, et avec p16.

**Matériel et méthodes:** on a montré deux biopsies du col utérin, teintées avec hématoxyline et éosine, et avec p16, pour que les pathologistes pourraient exprimer leur diagnostic parmi les quatre variétés de la néoplasie.

**Résultats:** la concordance dans le fragment 1 (hématoxyciline et éosine) a résulté avec diagnostic de NIC 1 en 52.5%, et dans le fragment 2 avec NIC 2 en 17.8%. La concordance avec les biopsies traitées avec p16 a été presque de 100% dans les deux fragments.

**Conclusion:** il est évident que les critères diagnostiques, quoique théoriquement connus des pathologistes, ne sont pas appliqués correctement de façon routinière. Le p16 a résulté un outil profitable afin d'établir le diagnostic correct, car il est une technique sûre et reproductible.

**Mots-clés:** biopsie du col utérin, p16, néoplasie intra épithéliale du col utérin, concordance diagnostique.

## RESUMO

**Antecedentes:** a biopsia cervical efetuada com a tinação de hematoxilina e eosina considera-se o padrão de referência (standard) para estabelecer o diagnóstico de neoplasia intraepitelial do colo uterino; contudo, se tem demonstrado uma baixa concordância, o patólogo Klaes evidenciou que a tinação com p16 acresce a concordância diagnóstica para a neoplasia intraepitelial do colo uterino do 40 ao 97%; pelo tanto, sua confiabilidade, sensibilidade e especificidade para detectar a neoplasia em qualquer uma das suas variedades é de 100%.

**Objetivo:** conhecer a concordância diagnóstica entre os histopatólogos mexicanos ao estudarmos duas amostras com neoplasia intraepitelial do colo uterino entintadas com hematoxilina e eosina e com p 16.

**Material e métodos:** mostraram-se duas biopsias do colo uterino, entintadas com hematoxilina e Eosina, e com p16, para que os patólogos expresassem seu diagnóstico entre as quatro variedades da neoplasia.

**Resultados:** a concordância no fragmento 1 (hematoxilina e eosina) resultou com diagnóstico de NIC 1 em 52,5% e no fragmento 2 com NIC 2 em 17,8%. A concordância com as biopsias processadas com p16 foi de quase 100% em ambos fragmentos.

**Conclusão:** é evidente que a aplicação dos critérios diagnósticos, mesmo teoria são conhecidos pelos patólogos, não se aplicam corretamente de maneira rotinária. O p16 resultou uma ferramenta útil para estabelecer diagnóstico correto pois é uma técnica confiável e reproduzível.

**Palavras chave:** biopsia do colo uterino, p16, neoplasia intraepitelial do colo uterino, concordância diagnóstica.

La biopsia cervical efectuada con la tinción de hematoxilina y eosina se considera el patrón de referencia (estándar) para establecer el diagnóstico de neoplasia intraepitelial del cuello uterino (NIC);<sup>1</sup> sin embargo, existe una baja concordancia diagnóstica.<sup>2,3</sup> Klaes<sup>2</sup> realizó un trabajo entre expertos ginecopatólogos y encontró que la concordancia con cualquier diagnóstico era del 65%, entre los cuales la neoplasia intraepitelial del cuello uterino era muy baja (40%). Debido a esto se desarrollaron métodos inmunohistoquímicos para distinguir las lesiones verdaderas de las reactivas y graduar correctamente la neoplasia intraepitelial del cuello uterino en sus tres categorías. Los marcadores de proliferación celular<sup>4-6</sup> estudiados con mayor frecuencia son: el Ki67, la sobreexpresión del p53, telomerasas, detección del virus

del papiloma humano (VPH) por hibridación *in situ* y, recientemente, el p16INK4A (p16).<sup>7</sup> Este último es una proteína que se acumula por el daño del oncogén E7, del VPH, en el gen del retinoblastoma de la célula huésped. El retinoblastoma regula el ciclo de reproducción celular y controla varios sustratos y proteínas necesarias para éste. Una de las principales proteínas para su producción es la ciclinasa p16INK4A que se acumula cuando el retinoblastoma está dañado. Su mecanismo de producción en el cuello uterino está influenciado únicamente por el daño ocasionado en el retinoblastoma por el encogén E7 del VPH; de tal manera que la proteína p16 no se encuentra en los tejidos sanos con inflamación, metaplasia o atrofia del cuello uterino; por lo tanto, es un marcador indirecto y confiable. Cuando Klaes mostró la tinción con p16, aumentó la concordancia diagnóstica de 65 a 97%, específicamente para la neoplasia intraepitelial del cuello uterino de 40 al 97%, lo cual indicó que la confiabilidad, sensibilidad y especificidad para detectar la neoplasia en cualquiera de sus variedades es de 100%. En México no existen antecedentes de la concordancia para el diagnóstico de la neoplasia intraepitelial del cuello uterino, ya sea con hematoxilina y eosina, o con p16.

El objetivo de esta investigación fue conocer la concordancia diagnóstica entre los histopatólogos mexicanos al estudiar dos muestras con neoplasia intraepitelial del cuello uterino teñidas con hematoxilina y eosina, y con p16.

\* Laboratorio de Patología Grupo Diagnóstico, Hospital Notre Dame México, DF.  
Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia, Academia Mexicana de Cirugía.

Correspondencia: Hamburgo núm. 304, colonia Juárez, CP 06600, México, DF. Tel.: 5211-4339, fax: 5286-0275.

E-mail: josecurielvaldes@hotmail.com

Recibido: mayo, 2007. Aceptado: julio, 2007.

Este artículo debe citarse como: Curiel VJ. Biopsia del cuello uterino, ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico? Utilidad de p16INK4A para lograrlo. Ginecol Obstet Mex 2007;75(9):615-20.

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

## MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el congreso de la Asociación Mexicana de Patólogos A.C. en Cancún (2004), se mostró a 61 patólogos participantes una laminilla con dos biopsias del cuello uterino de una misma paciente, de dos zonas diferentes. Un fragmento contenía glándulas y el otro no; esto los hacía claramente distinguibles para evitar confusión en relación con el fragmento diagnosticado. Una laminilla estaba teñida con hematoxilina y eosina (figuras 1a y 2a), y la otra estaba procesada por inmunohistoquímica para p16 (figuras 1b y 2b). Todos los observadores refirieron tener experiencia en su práctica diaria, en hospitales o consultas privadas, con las biopsias cervicales. Cada uno se tomó el tiempo necesario para emitir su diagnóstico, el cual se expresó entre las siguientes variables en cada fragmento de la laminilla teñida con hematoxilina y eosina:

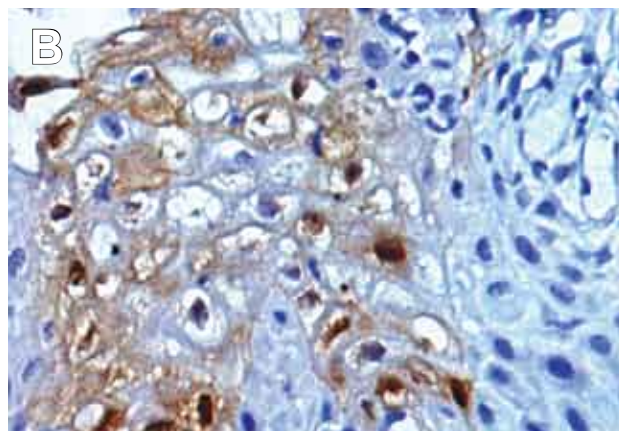
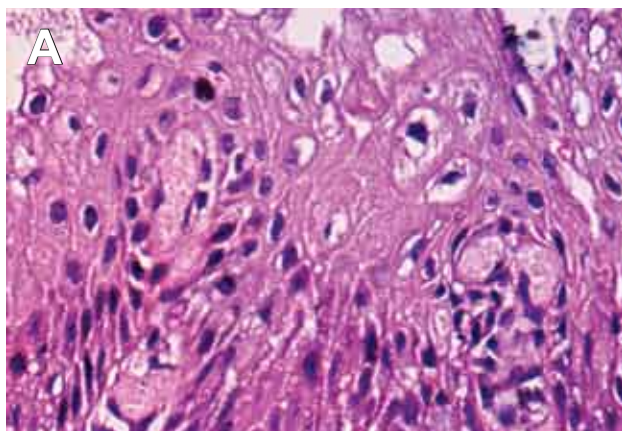
- 1) Cambios reactivos inflamatorios con o sin metaplasia epidermoide.
- 2) Cambios sugestivos pero no concluyentes de la neoplasia intraepitelial del cuello uterino (NIC) o del virus del papiloma humano VPH.
- 3) NIC 1.
- 4) NIC 2.
- 5) NIC 3.
- 6) Carcinoma.

Una vez obtenido y registrado el primer diagnóstico, se procedió a mostrar la laminilla con los dos fragmentos teñidos con p16 (Cell Marke Carpinteria Ca. USA clona 16P04 [JC2]). Como esta técnica no era conocida por la mayoría de los patólogos, se preguntó la extensión de las células (esporádica < 5%; focal entre 6 y 25%; y difusa > 25%), la intensidad (+ a ++++) y el espesor abarcado de la positividad (en capas basal, intermedia y superficial). El resultado se expresó en porcentajes. No se aplicó el valor estadístico Kappa ( $\kappa$ ) debido al tipo de resultado con p16 $\kappa$ .

## RESULTADOS

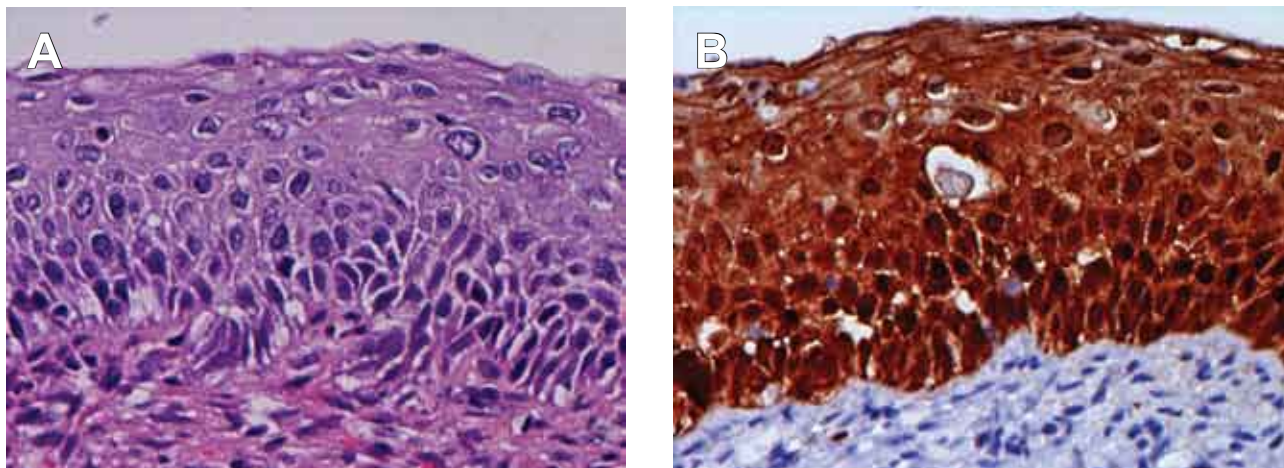
La dispersión de los diagnósticos en el fragmento 1 (laminilla teñida con hematoxilina y eosina [figura 1a]) abarcó desde cambios inflamatorios o metaplasia, o ambos, sin neoplasia intraepitelial del cuello uterino (23%), hasta displasia leve en la variedad NIC 1 (52.5%). Ningún participante diagnosticó carcinoma.

Los diagnósticos expresados en el fragmento 2 (marcados con p16) resultaron principalmente con cambios inflamatorios reactivos o metaplasma, o ambos, (19.7%) y displasia leve para la variedad NIC 1 (52.5%). Sólo dos patólogos diagnosticaron carcinoma. Con p16 se encontró que la interpretación en el fragmento 1 (figura 1b) fue positivo focal débil, en capas superficiales, nuclear y citoplásmico de + a +++,



**Figura 1.** Imagen del fragmento 1a teñida con hematoxilina y eosina. Se aprecian células con coilocitosis en fase poco productiva, con criterios claros de NIC 1, desarreglo de la capa basal, hiperchromatismo y crecimiento nuclear hacia la superficie con halo claro perinuclear. Sólo 52.5% de los patólogos hizo el diagnóstico correcto.

Fragmento 1b con p16. Se aprecia la positividad de p16 nuclear y citoplásmica de leve a intensa (+ a +++) en la parte central y en la periferia, a ambos lados, células sin positividad. Las células negativas tienen núcleos más chicos y carecen de halo perinuclear. Esta positividad corresponde a VPH de alto riesgo. Todos los patólogos realizaron con p16 el diagnóstico correcto. (Reproducida con permiso del editor Masson Doyma México).



**Figura 2.** Fragmento 2a teñido con hematoxilina y eosina. Se aprecian células con displasia moderada, NIC 2, hay mayor densidad celular, los núcleos son muy hiper cromáticos, con pleomorfismo y citoplasma muy pequeño; las atipias se conservan hasta la superficie en muchas células y adquieren más citoplasma en la superficie que indica cierto grado de maduración que las hace diferentes al NIC 3. Sólo 16.4% realizó el diagnóstico correcto.

En el fragmento 2b, el p16 es positivo difuso; en todo el espesor es nuclear y citoplásmico. Esta positividad confirma el VPH de alto riesgo y NIC 2. El 100% de los patólogos hizo el diagnóstico correcto con p16. (Reproducida con permiso del editor Masson Doyma México).

equivalente a NIC 1. En el fragmento 2 (figura 2b), la interpretación de todos los participante fue positivo difuso, en todo el espesor, nuclear y citoplásmico +++, equivalente a NIC 2; sin embargo, los dos patólogos que diagnosticaron carcinoma sostuvieron su diagnóstico inicial.

Con la prueba de la  $\chi^2$  se obtuvieron estos resultados, cuya significación estadística fue de  $p = 0.003$ , para el fragmento 1, y de  $p = 0.001$ , para el fragmento 2.

## DISCUSIÓN

El diagnóstico de los 61 patólogos, en histología convencional, fue similar en ambos fragmentos de la NIC 1 (52.5%), pero no pudieron distinguir entre la NIC 1 y NIC 2 (displasia leve y moderada). El diagnóstico correcto del fragmento 1 (hematoxilina y eosina), analizado según los criterios histológicos para graduar NIC 1 o displasia leve, incluyó hallazgos de atipias en la capa superficial, cambios de coilocitosis y leve hiperplasia de la capa basal (figura 1a), donde poco más de la mitad expresó este diagnóstico. En el fragmento 2, los criterios con hematoxilina y eosina fueron de NIC 2 (figura 2a), con mitosis en el estrato intermedio, mayor densidad celular, hiper cromatismo y leve a moderado pleomorfismo celular. Sólo 17.8% de los patólogos expresaron el diagnóstico correcto. Lo anterior refleja que los criterios para interpretar

NIC 1 y NIC 2, aunque se expresan claramente en los textos de patología, no se aplican correctamente o son difíciles de designar en un caso particular, a pesar de que las biopsias de cuello uterino se revisan con mucha frecuencia en los laboratorios y que los participantes expresaron estar en continuo contacto. Es notable la coincidencia en el diagnóstico con p16 para ambos fragmentos y la clara distinción (100%) entre NIC 1 y 2, además de que ninguno pensó en cambios inflamatorios o metaplasia y distinguieron la coexistencia o no de la neoplasia intraepitelial del cuello uterino. La trascendencia de estos resultados en la práctica diaria es decidir el tratamiento o no de la paciente, pues la lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LBG) o NIC 1 se observa en la mayor parte de los casos y la lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LAG) o NIC 2 es indispensable tratarla. Es evidente que existe un subdiagnóstico muy importante (77%), cuya trascendencia en una paciente significa que puede diagnosticarse como LBG (sólo observada), cuando en realidad tiene altas posibilidades de progresar a NIC 3 y eventualmente a carcinoma invasor, confiados en que NIC 1 es una lesión sin trascendencia clínica. Quizás en los casos de mortalidad con cáncer cérvicouterino, en México, se encuentran algunos de ellos. Los hallazgos de los patólogos mexicanos coincidieron con el trabajo de Klaes<sup>2</sup> y McCluggage,<sup>3</sup> donde encontraron una concordancia muy baja que se corrigió con p16.<sup>2</sup> Si el



diagnóstico real fuera de NIC 1 en ambos fragmentos, habría un error de casi 50%, es decir, totalmente el azar. En el segundo fragmento, el número de diagnósticos fue similar entre NIC 2 y cambios reactivos o metaplasia, lo que indica la posibilidad de no distinguir entre la lesión reactiva y lesión escamosa intraepitelial de alto grado. Es importante establecer el tratamiento para la lesión inflamatoria en una mujer con altas posibilidades de evolucionar a cáncer invasor. En enero del 2007 Nucci y Crum<sup>8</sup> resumieron el problema de clasificar la neoplasia intraepitelial del cuello uterino. Aun cuando separaron a las pacientes con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado y pacientes con lesión escamosa intraepitelial de alto grado, los resultados de la encuesta no mostraron mejoría en la capacidad diagnóstica con hematoxilina y eosina, ya que 60.7% diagnosticó el fragmento 1 con LBG, y en el fragmento 2, sólo 23% hizo el diagnóstico correcto de LAG.

Con el uso de p16 se elevó a 100% la coincidencia diagnóstica en cualquiera de las clasificaciones de NIC (lesión escamosa intraepitelial de bajo o alto grado). Esto indica que dicho método cumple los requisitos para determinar el diagnóstico de la biopsia cervical de manera confiable. Con estos resultados se sugiere lo siguiente: 1) los criterios diagnósticos con histología convencional (hematoxilina y eosina) no son reproducibles o se aplican de manera incorrecta, aun entre los ginecopatólogos de varios países;<sup>2,3</sup> 2) los cambios morfológicos reales de NIC, con hematoxilina y eosina, no reflejan lo que sucede en la enfermedad y muy probablemente han sido rebasados por la detección inmunohistoquímica, pues dicha técnica detecta el daño en los genes del retinoblastoma e indica específicamente el estadio de la enfermedad. El trabajo de Kong<sup>9</sup> demostró que p16 fue superior a la hibridación *in situ* para detectar el VPH de alto riesgo en las lesiones atípicas del cuello uterino, lo cual confirma su valor en el diagnóstico de la biopsia cervical; 3) en este estudio (del 2003 al 2005), desde el momento en que se utilizó el p16 en el laboratorio (biopsias con lesión colposcópica acetoblancas, con diagnóstico de VPH o sugestiva de VPH, estudiadas con p16 y hematoxilina y eosina), solamente se confirmaron 51% de las lesiones acetoblancas, es decir, el error morfológico de la colposcopia fue similar<sup>10</sup> a la clasificación de NIC 1 con p16 (56%) en las biopsias; 4) en relación con la colposcopia e histología, se menciona que la citología tiene un error de hasta 40%;<sup>11</sup> por lo tanto, se requiere una revisión crítica, el apoyo de métodos moleculares

y el establecimiento correcto de su sensibilidad; 5) el análisis con p16 resulta indispensable para emitir el diagnóstico correcto de NIC, pues justifica su uso rutinario, es económicamente accesible (menor al de un sobretratamiento) y evita las consecuencias de un subdiagnóstico. La inmunohistoquímica para p16 y otros marcadores es cada vez más viable para los laboratorios de patología, proporciona buena interpretación de los resultados y una correcta asesoría en el diagnóstico final; 6) es importante considerar las lesiones de bajo grado producidas por el VPH de bajo riesgo, donde el gen del retinoblastoma no se afecta por el oncogen E7 y la proteína de p16 no se acumula, por lo que la tinción con inmunohistoquímica resulta negativa. En este caso se requieren otros anticuerpos que marquen el VPH de bajo riesgo; sin embargo, el virus de bajo riesgo tiene mínimas posibilidades de evolucionar a NIC 3 o cáncer invasor y generalmente es una infección autolimitada, lo cual no tiene trascendencia clínica; por lo tanto, carece de importancia diagnóstica si no se realiza el diagnóstico histopatológico. Los VPH de alto riesgo son los más comunes en las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (NIC 1) y son positivos para p16. Por último, el marcador p16 se relaciona con el VPH de alto riesgo, ya que indica la positividad moderada a intensa nuclear y citoplásmica, con valor adicional al resultado de lesión de bajo grado, donde indican si el VPH es de alto riesgo. Las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado se originan específicamente por el VPH de alto riesgo; por lo que en la confirmación diagnóstica deben eliminarse los simuladores de NIC 2, como las metaplasias inmaduras y atrofas.

## CONCLUSIÓN

Se describió de manera objetiva el error al diagnosticar histológicamente la neoplasia intraepitelial del cuello uterino. El p16 resultó una herramienta útil para establecer el diagnóstico real, ya que es una técnica confiable y reproducible. Este marcador es accesible para la mayor parte de los laboratorios de histopatología y el ginecólogo; la certeza diagnóstica evita el sobre y subdiagnóstico, y ayuda para establecer el tratamiento en los casos con lesión real.

## Agradecimientos

A Emilio Arch Tirado y al Dr. Jaime Berumen Campos por su apoyo en el análisis estadístico.

## REFERENCIAS

1. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 1973;8:301-328.
2. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, et al. P16INK4A immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389-99.
3. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, et al. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of cervical intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:206-7.
4. Girardi G, Heras A, Maldonado F, Cordova S, Arias SJ. Immunohistochemistry as diagnostic markers for cervical cancer. *Mod Pathol* 2003;16:192-6.
5. Yashima K, Ashfaq R, Nowak J, Von-Grueniguen V, et al. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 1998;82:1319-27.
6. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with the p53. *Science* 1990;248:76-79.
7. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, et al. Ki-67, cyclin E, p16INK4A are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25:884-91.
8. Nucci MR, Crum CP. Redefining early cervical neoplasia: recent progress. *Adv Anat Pathol* 2007;14:1-10.
9. Kong CS, Balzer BL, Troxel ML, Patterson BK, Longacre TA. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007;31:33-43.
10. Curiel-Valdés JJ. Trabajo de ingreso a la Academia Mexicana de Cirugía, presentado el 26 de julio 2005 y resumen en Memorias del Congreso EUROGY abril 2006.
11. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* 2006;24(Suppl 3):S63-70.