

Expresión simultánea de los marcadores p16INK4a y Ki-67 en extendidos de citología cérvico-vaginal anormales de archivo

Simultaneous expression of markers in smears of abnormal cervical cytology previously stored

Lía Barrios-García MD¹, Liliana María Agresott-Beltrán Bact²

Introducción: Los biomarcadores Ki-67 y p16INK4a se utilizan en citología cérvico-vaginal para facilitar la detección de células anormales, debido al incremento en su expresión durante la transformación neoplásica de células epiteliales escamosas de cuello uterino. El hallazgo de estos marcadores es mutuamente excluyente en una célula normal, por tanto, la expresión dual p16INK4a/Ki-67 se considera un marcador sensible y específico de lesiones premalignas o malignas. **Objetivo:** Determinar la expresión simultánea de los marcadores p16INK4a y Ki-67 en extendidos de citología cérvico-vaginal convencional anormales almacenadas en archivo. **Resultados:** En el 18 % de las láminas con lesión intraepitelial escamosa de alto grado, las células morfológicamente anormales fueron positivas para la tinción dual p16INK4a/Ki-67; el 5,6 % de las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado resultaron positivas para la tinción dual y el 100 % de los casos de atipias en células escamosas de significado indeterminado, de atipias en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado, de células glandulares atípicas, de adenocarcinoma y de los carcinomas de células escamosas resultaron negativas para la tinción dual, observando en estos últimos positividad para p16INK4a y Ki-67 de manera independiente. **Conclusiones:** Los resultados encontrados no son congruentes a lo esperado, probablemente por factores relacionados a las condiciones previas del manejo y almacenamiento de las muestras que ocasionaron la pérdida de antigenicidad, o por errores asociados al muestreo que no permiten generalizar los hallazgos a la población general. Es necesaria la realización de estudios utilizando muestreos aleatorizados, y una estandarización de la doble tinción en muestras frescas o adecuadamente procesadas y almacenadas, que permitan confirmar el rol de la tinción dual de p16INK4a/Ki-67 como una técnica útil en la interpretación citológica con mayor exactitud y precisión diagnóstica.

Palabras claves: Citolología, prueba de Papanicolaou, proteínas de ciclo celular, inmunohistoquímica.

Introduction: The p16INK4a and Ki-67 biomarkers are used in cytology to help the detection of abnormal cells, due to their overexpression during the neoplastic transformation of cervix squamous epithelial cells. The expression of both markers in normal cells, is mutually exclusive, therefore, p16INK4a/Ki-67 dual-stained has shown high sensitivity and specificity in pre-malignant and malignant lesions.

Objective: The aim of this study was to determine the simultaneous expression of p16INK4a and Ki-67 markers in conventional cervical abnormal cytology previously stored. **Results:** In 18 % of cases with high-grade squamous intraepithelial lesion, morphologically abnormal cells were positive for dual staining p16INK4a/Ki-67, as well as 5,6 % of cases of low-grade squamous intraepithelial lesions. All cases of atypical squamous cells of undetermined significance, atypical squamous cells suspicious of high-grade lesion, atypical glandular cells, adenocarcinoma, and squamous cell carcinoma were negative for the dual staining, but this last group was positive for p16INK4a and Ki-67 independently. **Conclusions:** These results are not consistent with expected, probably by environmental factors like

¹Médica, Patóloga. Grupo de investigación Histopatología. Docente Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

²Bacterióloga, Microbióloga Clínica. Joven Investigadora de Colciencias. Colombia. Correspondencia: liliana.agresott@hotmail.com

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tiene conflicto de intereses.

Medicina & Laboratorio 2014; 20: 73-86

Módulo 19 (Investigación), número 21. Editora Médica Colombiana S.A. 2014®

Recibido el 26 de enero de 2014; aceptado el 28 de febrero de 2014.

pre-analytical conditions of process and storage of smears resulting in loss of antigenicity, or due to failure on random sampling that not allow generalize the findings to the population. It is necessary to make studies with randomized sampling, and standardize this technique in fresh smears or properly processed and stored, to consider the dual p16INK4a/Ki-67 staining as a useful technique to cytological interpretation with precision and accuracy.

Key words: Cytology, Papanicolaou test, cell cycle proteins, immunohistochemistry.

Barrios-García L, Agresott-Beltrán LM. Expresión simultánea de los marcadores p16INK4a y Ki-67 en extendidos de citología cérvico-vaginal anormales de archivo. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 73-86.

El cáncer de cuello uterino es la séptima causa de cáncer en el mundo y la cuarta causa entre las mujeres. Colombia presenta tasas de incidencia y mortalidad ajustadas por edad por 100.000 habitantes de 18,7 y 8,0, respectivamente [1], representando uno de los países con más alto riesgo de incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino en el mundo [1-4]. En Latinoamérica, según la Organización Panamericana de la Salud, el 75 % de las muertes a causa del cáncer de cuello uterino se presentan en mujeres menores de 55 años [5]. Los programas de detección temprana de cáncer de cérvix, durante más de 40 años, han utilizado la citología repetida como prueba primaria de tamizaje [2] para detectar lesiones pre-malignas del cuello uterino, cuya fase inicial está determinada por lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado; sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de casos positivos para estas lesiones progresan a cáncer [6], por tal razón, mejorar la precisión del diagnóstico ha sido de interés para lograr reducir el número de pacientes en seguimiento, guiar la conducta a seguir y el tipo de tratamiento a implementar.

Entre las estrategias encaminadas a optimizar la interpretación de las alteraciones morfológicas, observadas en las citologías, se ha propuesto la búsqueda de marcadores biológicos que se correlacionen con los cambios asociados a la transformación neoplásica, en lugar a los asociados a la infección con el virus del papiloma humano, entre estos, se han utilizado la proteína p16INK4a, reguladora del ciclo celular [7, 8], y Ki-67, un marcador de proliferación celular activa, para facilitar la detección de células anormales en muestras de citologías [9]. Los informes publicados sobre la expresión simultánea de p16INK4a/Ki-67, tanto en muestras de Papanicolaou convencionales como en citologías en base líquida, han demostrado que es altamente sensible y específico para detectar casos de lesión intraepitelial de alto grado instaurada [10-15], además, de ser de valor en la clasificación de las citologías anormales en atipias en células escamosas de significado indeterminado, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y atipias en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado [11, 14, 15]. Su identificación ha sido utilizada como apoyo al diagnóstico histológico convencional en casos dudosos, estableciéndose una relación directa entre la presencia o no de lesión intraepitelial, y el grado y la extensión de células positivas, como es el caso de positividad limitada al estrato basal en epitelios normales, células positivas en el tercio inferior o en la mitad del epitelio en lesiones de bajo grado y positividad difusa en lesiones de alto grado [11].

Las proteínas p16INK4a y Ki-67 son marcadores biológicos naturales cuya expresión es alterada durante la transformación neoplásica de células epiteliales escamosas de cuello uterino. La p16INK4a es una proteína reguladora del ciclo celular, altamente controlada, que en condiciones fisiológicas normales induce un bloqueo del ciclo celular, por lo que

se considera una proteína supresora de tumores [9]. La sobreexpresión ocurre como resultado de la inactivación funcional de la proteína del retinoblastoma producto de la unión de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano, lo que conduce a la ausencia de la regulación de la transcripción de p16INK4a [9, 16]. En la evaluación histológica, es comúnmente utilizado por los patólogos como una herramienta de diagnóstico diferencial de displasia escamosa y patologías similares como la metaplasia inmadura escamosa o atrofia, para la identificación de lesiones pequeñas con artefactos o escasamente representadas en la muestra, evaluación de legrados endocervicales, y para reducir la variabilidad inter-observador entre el diagnóstico de una neoplasia y un proceso reactivo [17, 18], con base en los estudios que han demostrado la sobreexpresión de este marcador en casi todas las lesiones de alto grado y los cánceres invasivos de cuello uterino [19]. La Ki-67 es una proteína nuclear y un marcador de proliferación celular cuya expresión permite calcular el índice de la fracción de crecimiento celular; el aumento en sus niveles se da durante la desregulación del ciclo celular causada por los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano; su índice de tinción está directamente relacionado con el grado de la displasia y reconoce los tejidos infectados por el virus, por lo que ha sido utilizada de apoyo en el diagnóstico histológico [9, 17].

En condiciones fisiológicas normales, la expresión de p16INK4a (marcador supresor de tumor) y la expresión de Ki-67 (marcador de proliferación) no ocurre en la misma célula, por tanto, la coexpresión de p16INK4a y Ki-67 en células individuales de muestras citológicas es un marcador sensible y específico de ciclos celulares desregulados, es decir, eventos oncogénicos a nivel celular [11], indicativos de lesiones premalignas o malignas [14]. El objetivo de este estudio fue determinar por la expresión simultánea de los marcadores p16INK4a y Ki-67 en extendidos de citologías cérvico-vaginales convencionales anormales de archivo, almacenadas en el laboratorio de diagnóstico citopatológico de la Clínica Maternidad Rafael Calvo E.S.E. en el año 2012.

Materiales y métodos

Muestras citológicas

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo a partir de extendidos de citología cérvico-vaginal convencional archivadas en el laboratorio de diagnóstico citopatológico de la E.S.E Clínica de Maternidad Rafael Calvo de la ciudad de Cartagena durante 2012. Las citologías fueron diagnosticadas de acuerdo con las recomendaciones del Sistema Bethesda 2001 [20]. Según la declaración de Helsinki, esta es una investigación sin riesgo, no requirió la aplicación del consentimiento informado para la obtención de la información de los registros médicos, pero se aseguró la privacidad y el anonimato al momento de ser revisada [21].

Partiendo de la base de datos de los casos registrados para el año 2012, se encontraron un total de 1.220 citologías anormales, de las cuales 241 contaban con estudio histopatológico confirmatorio. La distribución de los casos con estudio histopatológico confirmado según tipo de diagnóstico citológico anormal fue: 23/216 atípicas en células escamosas de significado indeterminado, 6/41 atípicas en células escamosas sospechosas de lesión de alto

grado, 6/54 células glandulares atípicas, 146/720 lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, 49/155 lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, 10/27 carcinomas de células escamosas y 1/7 adenocarcinomas. A partir de estas, se seleccionaron por conveniencia las 42 láminas que presentaban mayor cantidad de muestra, mejor visualización en la relación núcleo- citoplasma y menos zonas hemorrágicas para cada diagnóstico citológico, de la siguiente manera: atípicas en células escamosas de significado indeterminado (n=5), atípicas en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado (n=1), células glandulares atípicas (n=1), lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (n=18), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (n=11), carcinoma de células escamosas (n=5) y adenocarcinoma (n=1).

Preparación para la inmunocitoquímica de p16INK4a y Ki-67

Las láminas de citologías convencionales archivadas que fueron seleccionadas, se buscaron por el número del caso respectivo, y se verificó que cumplieran las características previamente descritas, obteniendo un total de 241 láminas. Para todos los extendidos citológicos se realizó una segunda lectura, para confirmar los diagnósticos iniciales, y se procedió a tomar foto del área más representativa del diagnóstico citológico, anotando las coordenadas de localización y delimitando el área de interés mediante un círculo realizado bajo observación microscópica con un marcador permanente. Todo el procedimiento fue supervisado por una citopatóloga experta.

La doble inmunotinción p16INK4a/Ki-67 fue realizada directamente sobre los extendidos que habían sido previamente teñidos con la coloración de Papanicolaou. Como pre-tratamiento, se sumergieron las láminas de citologías en xilol, por aproximadamente 10 días para despojarlas de los cubreobjetos. Para eliminar los restos del medio de montaje, las láminas se sometieron a cuatro baños de xilol, por dos minutos, seguido de una fase de rehidratación en cuatro baños con etanol a concentraciones decrecientes (100 %, 96 %, 70 % y 50 %), durante cinco minutos cada uno, finalizando con agua destilada por 10 minutos.

El área de interés, previamente seleccionada para la inmunocitoquímica, fue delimitada por medio del lápiz aislante de líquidos para procesos de tinción «Liquid Blocker Super PAP Pen» (Cancer Diagnostics Inc., Durham, Carolina del Norte, Estados Unidos), que evita la pérdida de reactivos fuera del espacio definido. Los extendidos se sometieron al procedimiento inmunocitoquímico de doble tinción con p16INK4a/Ki-67 utilizando el kit comercial CINtec® PLUS Cytology (Ventana Medical Systems, Inc., Roche; Tucson, Arizona, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con algunas modificaciones para mejorar las condiciones de inmunorreactividad de las células del frotis provenientes de archivo. La recuperación antigenica se realizó previa adición del reactivo de bloqueo de la peroxidasa endógena durante cinco minutos, utilizando una solución 10X de EDTA 100 mM a pH 8.0, diluida 1:10 en agua destilada, que cubriera el área a tratar, y llevando las láminas a temperatura de ebullición durante 45 minutos en una vaporera (Black & Decker, Towson, Maryland, Estados Unidos). Los portaobjetos se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos) y fueron lavados con el tampón de lavado; después de esto, se adicionó nuevamente el reactivo de bloqueo de la peroxidasa endógena por cinco minutos.

Los extendidos fueron marcados por inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-p16INK4a humana (clona E6H4), y el anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki-67 humano (clona 274-11 AC3), durante una hora a temperatura ambiente; seguido de una incubación durante 30 minutos con anticuerpos de cabra anti-ratón conjugado de peroxidasa de rábano picante. Después de lavar los extendidos se adicionaron anticuerpos de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina por 30 minutos. El color de la p16INK4a se reflejó después de la incubación con el cromógeno de diaminobencidina, por 12 minutos, y el color del Ki-67 se evidenció tras la incubación con el cromógeno Fast Red, por 20 minutos; esta última fase se realizó dos veces. Para contrastar, se expusieron los extendidos a la solución de hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) por un minuto, seguidos de lavados con agua destilada para retirar excedentes del colorante. La conservación permanente de los preparados para prevenir el desvanecimiento de la señal del Fast Red, se realizó colocando un medio de montaje con una base acuosa suministrada por el kit por 40 minutos a 37 °C. Por último, se realizó el montaje permanente con resina y se puso el cubreobjetos. Como control positivo de la tinción se utilizaron preparados de citología en base líquida con diagnóstico previo de lesión intraepitelial escamosa de alto grado y de carcinoma; el control negativo fue provisto por células morfológicamente normales que suelen encontrarse en los mismos extendidos que fueron utilizados en el estudio.

Interpretación de la inmunocitoquímica de p16INK4a y Ki-67

Todos los casos fueron revisados con la supervisión de una citopatóloga experta para confirmar la presencia de una o más células cervicales con tinción dual para p16INK4a/Ki-67. Se consideraron como positivas para p16INK4a las células con coloración marrón en el núcleo, en el citoplasma o en ambos; para Ki-67 aquellas con coloración roja en el núcleo, y doble positivas en las que se observa de forma simultánea una tinción citoplasmática marrón (p16INK4a) y tinción nuclear roja (Ki-67) (ver figura 1), o doble tinción a nivel nuclear de color rojo-marrón (producto de la colocalización de Ki-67 y p16INK4a en el núcleo) [11]; ambos casos, interpretados como células con eventos oncogénicos independiente de los hallazgos morfológicos. Se determinó como negativo las células en las que no se observó ningún tipo de coloración (sin eventos oncogénicos), y en las que se observó la coloración de p16INK4a en ausencia de coloración de Ki-67, o viceversa; estos casos fueron interpretados morfológicamente para su clasificación como una lesión de alto grado [14, 22]. Para los resultados obtenidos, se utilizó una estadística descriptiva y se aplicó un análisis estadístico bivariado entre el resultado positivo/negativo de la doble tinción p16INK4a/Ki-67 y el resultado del diagnóstico citológico.

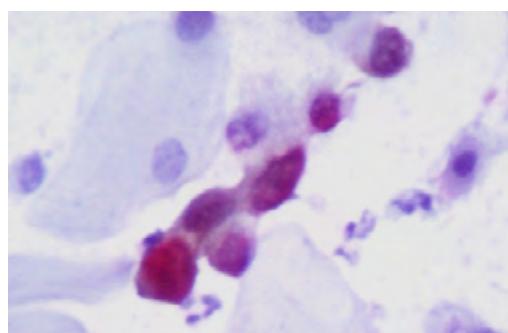


Figura 1. Tinción dual p16INK4a/Ki-67 positiva. Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (40X).

Resultados

A 42 extendidos de citología cérvico-vaginal convencional, tomados de los archivos de la unidad de diagnóstico cito-patológico de la E.S.E. Clínica de Maternidad Rafael Calvo, Cartagena, reportados como anormales en 2012 y con estudio histopatológico confirmatorio, se les realizó la tinción dual de p16INK4a/Ki-67. Se obtuvo un resultado positivo para la doble tinción en tres (7 %, 3/42) de los extendidos, correspondientes a dos de los casos de lesión intraepitelial escamosa de alto grado (18 %, 2/11) (ver figura 2) y uno de los casos de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (5,6 %, 1/18) (ver tabla 1).

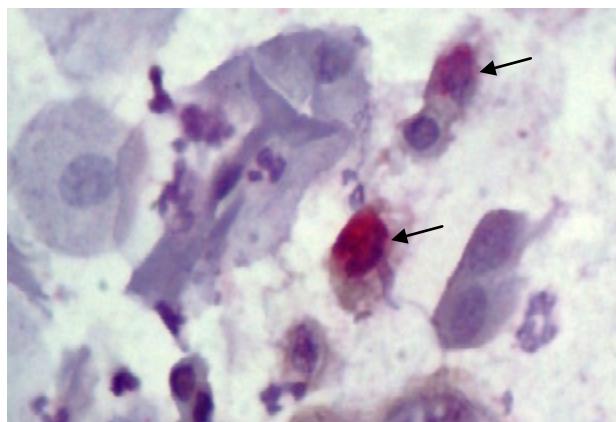


Figura 2. Tinción dual p16INK4a/Ki-67 positiva. Células anormales de una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (100X).

Tabla 1: Evaluación de la expresión del p16/ki-67 distribuido según el resultado citológico

Resultado citológico	Tinción dual p16/Ki-67					
	Negativo		Positivo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Adenocarcinoma	1	100	0	0	1	2,3
Carcinoma de células escamosas	5	100	0	0	5	12
Lesión intraepitelial escamosa de alto grado	9	82	2	18	11	26,1
Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado	17	94,4	1	5,6	18	43
Atípicas en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado	1	100	0	0	1	2,3
Atípicas en células escamosas de significado indeterminado	5	100	0	0	5	12
Células glandulares atípicas	1	100	0	0	1	2,3
Total	39	93	3	7	42	100

El 82 % (9/11) de casos de lesión intraepitelial escamosa de alto grado, aunque contenían células morfológicamente anormales, no cumplieron con los criterios de positividad para la tinción dual; en algunos se encontró inmunorreactividad con la p16INK4a o con la Ki-67 de forma independiente, y en otros no hubo expresión de ninguno de los dos marcadores (ver figura 3). El caso de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado que mostró inmunomarcación positiva para el p16INK4a/Ki-67 tuvo un diagnóstico confirmatorio por biopsia de endocervicitis crónica (ver figura 4), el resto

de ellos (94,4 %, 17/18) fueron negativos para la doble tinción. Los coilocitos (cambios asociados a infección por el virus del papiloma humano) -lesión intraepitelial escamosa de bajo grado- en las muestras analizadas no cumplieron con el criterio para tinción dual positiva (ver figura 5).

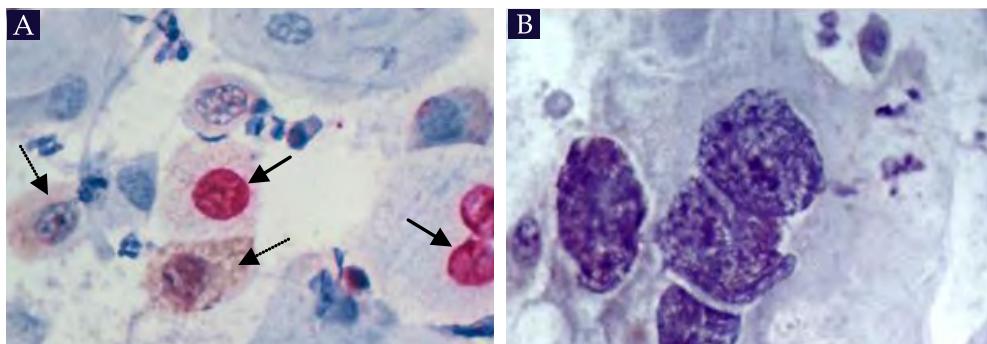


Figura 3. Tinción dual p16INK4a/Ki-67 negativa. Células anormales de una lesión intraepitelial escamosa de alto grado. (A) Tinción positiva para p16INK4a (flechas punteadas) y para Ki-67 (flechas sólidas) de forma independiente. (B) Tinción negativa para p16INK4a y Ki-67 (100X).



Figura 4. Tinción dual positiva p16INK4a/Ki-67. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (100X).

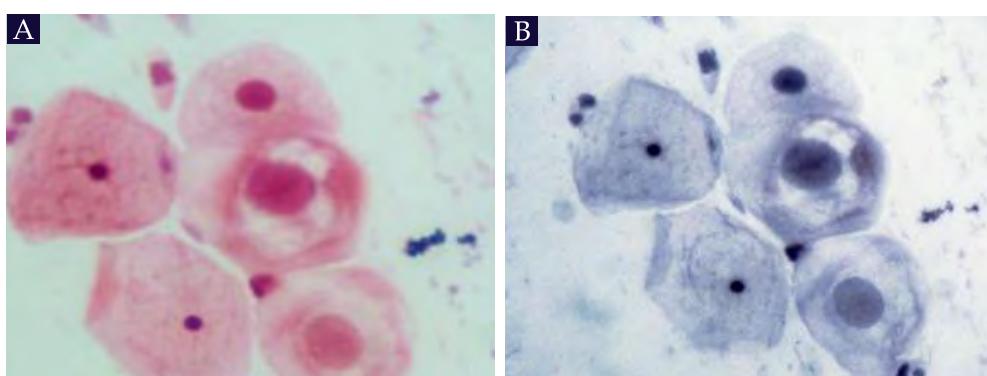


Figura 5. Coilocitos, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. (A) Coilocitos con la coloración de Papaparicalou, (B) Coilocitos negativos para tinción dual p16INK4a/Ki-67 (100X).

El 100 % de los casos de atipias en células escamosas de significado indeterminado y de los carcinomas de células escamosas fueron negativos para la inmunotinción dual p16INK4a/Ki-67, sin embargo, estos últimos resultaron positivos para la p16INK4a y la Ki-67 de manera

independiente (ver figura 6). El 100 % de las atipias en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado y de las células glandulares atípicas tuvo un diagnóstico confirmatorio por biopsia de lesión intraepitelial escamosa de alto grado, pero una tinción dual negativa; el 100 % de los adenocarcinomas también fueron negativos, sin embargo, teniendo en cuenta que se tuvo un único caso en cada uno de los tres diagnósticos, el resultado negativo para la inmunotinción dual puede ser debida a un sesgo introducido por el tipo de muestreo.

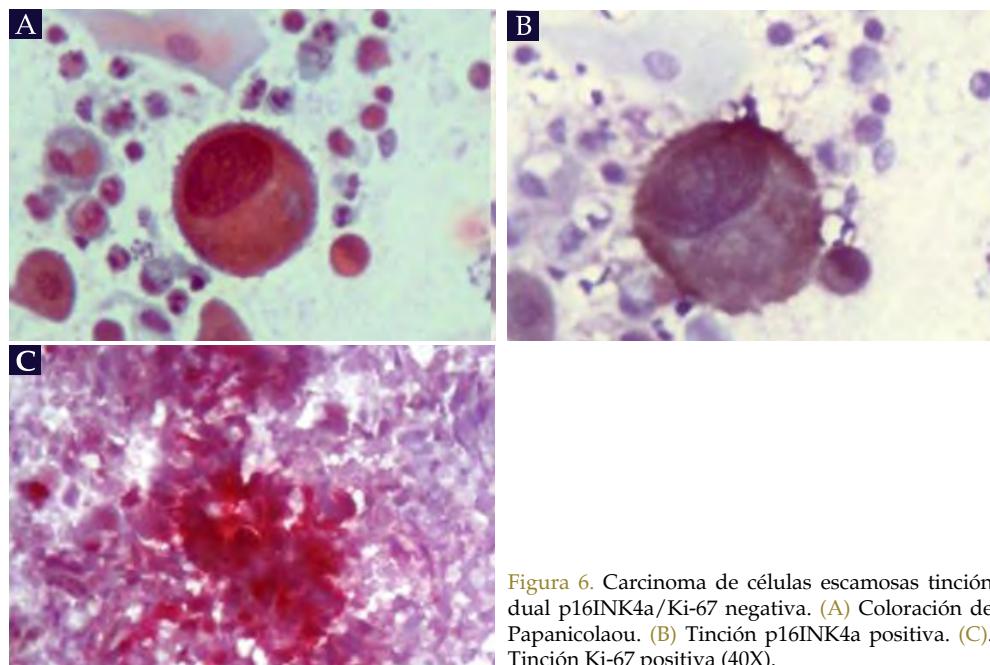


Figura 6. Carcinoma de células escamosas tinción dual p16INK4a/Ki-67 negativa. (A) Coloración de Papanicolaou. (B) Tinción p16INK4a positiva. (C) Tinción Ki-67 positiva (40X).

Discusión

La p16INK4a, proteína reguladora del ciclo celular, es un biomarcador útil para la identificación de lesiones intraepiteliales de cuello uterino, asociada a la expresión de oncogenes del virus del papiloma humano que inactivan la proteína del retinoblastoma y en consecuencia inducen el aumento de su expresión en los epitelios con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y malignas [23, 24]. La utilidad de la tinción inmunocitoquímica para el p16INK4a está limitada por su expresión esporádica en metaplasia de células escamosas, células endocervicales no secretoras de moco, metaplasia endometrial y endometriosis cervical [14, 25]. Por su parte, la proteína Ki-67 es un marcador de proliferación celular expresado en las células del estrato basal del epitelio cervical durante el ciclo de división celular en células benignas, premalignas o malignas; por tanto, la coexpresión de p16INK4a y Ki-67 en las células cervicales es un marcador sensible y específico de eventos oncogénicos indicativos de lesiones premalignas o malignas, que no se espera encontrar en células benignas [14, 17]. En este estudio, las células morfológicamente normales, negativas para lesión intraepitelial, resultaron negativas para la tinción dual con estos biomarcadores, de acuerdo con lo reportado previamente [14].

Estudios han demostrado que la positividad de la doble tinción con p16INK4a/Ki-67, según las categorías diagnósticas de las citologías convencionales, aumenta desde una lesión leve hasta la más severa (ver tabla 2) [11, 14, 15]. En el presente estudio, solo el 18 % de los casos con lesión intraepitelial escamosa de alto grado fueron positivos para la tinción dual con p16INK4a/Ki-67, esto quiere decir, que el 82 % de los casos no presentó inmunorreactividad simultánea con los dos biomarcadores; sin embargo, se considera la existencia de casos donde la lesión es diagnosticada, pero la tinción dual no se expresa como se esperaba. Estos hallazgos difieren de lo encontrado por Ikenberg y colaboradores, los cuales demostraron que la tinción dual del p16INK4a/Ki-67 en citologías cervicales convencionales o en base líquida, aumenta la sensibilidad en la detección de una lesión intraepitelial de alto grado instaurada en un 18 % respecto a la citología de Papanicolaou, en mujeres de todas las edades, con una especificidad comparable (95 % para ambas pruebas). Es importante anotar que dicho estudio fue realizado de forma prospectiva, y las citologías para la doble tinción fueron obtenidas simultáneamente y en placas independientes de las citologías para coloración de Papanicolaou, montaje y almacenamiento [13], contrario a este estudio donde las muestras fueron recolectadas retrospectivamente de láminas de archivo previamente coloreadas con Papanicolaou; lo que podría explicar la diferencia en los resultados.

Tabla 2. Positividad de la doble tinción del p16INK4a/Ki-67 según las categorías de las citologías

Resultado citológico	Tinción dual p16INK4a/Ki-67 positiva (%)		
	Wentzensen y colaboradores [15]	Singh y colaboradores [14]	Killeen y colaboradores [11]
Lesión intraepitelial escamosa de alto grado	95,3	86,4	93,8
Atipias en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado	82,5	47,1	65,5
Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado	68,8	36,4	43,2
Células glandulares atípicas	-	55,6	-
Atipias en células escamosas de significado indeterminado	40,2	35,0	17,9

En el presente estudio, el caso de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado con tinción dual positiva y resultado de biopsia negativa/endocervicitis crónica, evidencia la posibilidad de tener una lesión oculta que no fue detectada por citología a pesar de la alta especificidad de este examen [14]; a la paciente se le realizó una colposcopia, pero no se reportó lesión. En este tipo de casos, la indicación es la realización de un legrado endocervical que permita al colposcopista identificar una lesión maligna o pre-maligna de cérvix presente en el canal endocervical que no es posible visualizar durante el examen colposcópico [26], sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es baja y su uso ha sido controversial [26-28].

El 94,4 % casos de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado de este estudio fueron negativos para la tinción dual de forma similar a lo reportado por Singh y colaboradores [14], donde el 63,6 % de los casos con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado fueron negativos a la inmunotinción para p16INK4a/Ki-67; lo que coincide con el hecho que aproximadamente 60 % a 70 % de las citologías con este diagnóstico remiten tras el aclaramiento de la infección por el virus del papiloma humano [29]. En las mujeres con infección transitoria por el virus

del papiloma humano, el 25 % muestran cambios citopáticos propios de lesiones intraepiteliales de bajo grado como los coilocitos [30], cuyo hallazgo en el estudio histopatológico y una tinción dual negativa, puede ser indicativo de una lesión benigna que puede regresar espontáneamente por aclaramiento de la infección, y no de una infección progresiva [31]. De esta manera, no cumplir con el criterio de positividad para la tinción dual en casos de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado-coilocitos, como lo observado en este estudio, puede ser un indicador de buen pronóstico.

El diagnóstico histopatológico confirmatorio de los cinco casos de atipias en células escamosas de significado indeterminado en este estudio correspondió a fragmentos sueltos de endocérvidx en un caso y a lesión intraepitelial escamosa de bajo grado en tres de ellos, hallazgos que se correlacionan con el resultado negativo en la doble tinción y que confirman que no son lesiones progresivas a malignidad; el otro caso resultó en un carcinoma de células escamosas, que coincide con lo expuesto por Schiffman y Solomon, los cuales afirman que más de dos millones de mujeres por año en los Estados Unidos tienen un diagnóstico de atipias en células escamosas de significado indeterminado en la citología, de las cuales aproximadamente en el 5 % se confirma histológicamente la presencia de lesión intraepitelial de alto grado [32]. Por su parte, Gutiérrez y colaboradores observaron que el 0,14 % de las citologías reportadas como atipias en células escamosas de significado indeterminado en el reporte histológico confirmaban un carcinoma invasor [33]. Con base en lo anterior, se esperaba que el caso en mención tuviera un resultado positivo en la tinción dual de p16INK4a/Ki-67, sin embargo, fue negativo, lo que sugiere una posible pérdida de la inmunoreactividad de las células malignas en la lámina de archivo.

Los casos con diagnóstico de células glandulares atípicas y atipias en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado, confirmados por biopsia como lesión intraepitelial escamosa de alto grado en este estudio, resultaron negativos para la tinción dual, al igual que el caso de adenocarcinoma. Estos resultados son contrarios a lo esperado, basándose en estudios previos en los reportaron positividad de la doble tinción en el 47,1 % - 82,5 % de los casos de atipias en células escamosas sospechosas de lesión de alto grado [14, 15, 34], y en el 55,6 % de casos de células glandulares atípicas [14], con alta sensibilidad y especificidad en la identificación de lesiones cervicales de alto grado instauradas en muestras de citología recién colectadas, independiente del espécimen para Papanicolaú, y en preparados de citología en base líquida [11, 14, 15]. Ravarino y colaboradores, en muestras de citología en base líquida con diagnóstico de adenocarcinoma *in situ* y confirmación histológica, mostraron un 92,5 % de positividad a la doble tinción [35], sin embargo, hay que tener en cuenta que en el presente estudio se incluyó un único caso para cada uno de estos diagnósticos, lo que pudo introducir un sesgo en el comportamiento de los datos producto del tipo de muestreo aplicado, que explicaría la diferencia en los resultados obtenidos con los esperados. Samarawardana y colaboradores demostraron que el 100 % de casos de carcinoma de células escamosas, obtenidos de biopsias cervicales fijadas con formalina eran positivos para la colocalización de p16INK4a/Ki-67 [36], a diferencia de lo encontrado en este estudio, en el que utilizando placas de citología convencional de archivo, todos los casos fueron negativos, posiblemente debido a la pérdida de la inmunoreactividad.

Los resultados falsos negativos en las tinciones inmunocitoquímicas, se han explicado por diversos factores ambientales o de procedimiento, que conllevan a la pérdida de la antigenicidad de las células con el tiempo de almacenamiento, como la oxidación (foto o termo-oxidación) [37], los tiempos cortos de procesamiento (que resultan en una impregnación reducida), la hidrólisis del tejido (con agua endógena o exógena) durante el procesamiento y almacenamiento, la alta temperatura y humedad de almacenamiento [38] y los tiempos prolongados de fijación y de exposición al xilol durante la remoción de los cubreobjetos [39, 40]. En este estudio varias de las láminas presentaban burbujas de aire antes de retirarles el cubreobjeto para el posterior procedimiento inmunocitoquímico, y se encontraban almacenadas en archivo a temperatura ambiente (alrededor de los 36 °C en la ciudad de Cartagena), además, no se tuvo control del proceso de realización de la citología convencional, no se tiene claro cómo fue el proceso de fijación de las láminas, y no se aplicaron los protocolos recomendados para retirar el cubreobjetos de las láminas utilizando xilol sin alterar la muestra [39]; todo lo anterior pudo causar una pérdida de antigenicidad en las células que explicaría los resultados negativos obtenidos en los extendidos de citologías convencionales anormales de archivo.

Conclusiones

La tinción dual del p16INK4a/Ki-67 ha sido propuesta en la literatura como una técnica muy útil en la interpretación citológica que mejora la exactitud y precisión diagnóstica de lesiones de alto grado instauradas, sin embargo, los resultados de este estudio revelan que la tinción dual no es confiable cuando se aplica a citologías convencionales de archivo con condiciones de recolección, fijación, procesamiento y almacenamiento no garantizadas ni controladas, que pueden llevar a una pérdida en la antigenicidad y en consecuencia de la positividad del marcaje. Para los países como el nuestro, donde la práctica diaria consiste en realizar citologías convencionales, es recomendable realizar estudios con un muestreo aleatorizado representativo de cada diagnóstico citológico en la población general, en los que se estandaricen protocolos de recuperación antigenica de los kits comerciales para la doble tinción de p16INK4a/Ki-67 a las condiciones particulares de cada laboratorio, utilizando extendidos frescos o muestras adecuadamente procesadas y almacenadas; para corroborar el rol de la doble tinción en la reducción de la variabilidad intra/inter-observador en la interpretación citológica y en la identificación de las lesiones cervicales clínicamente significativas, que permita instaurar esta prueba de forma rutinaria en el diagnóstico de los casos dudosos, para evitar el sobretratamiento en mujeres con lesiones de bajo grado sin relevancia clínica, y brindar un tratamiento oportuno a aquellas que realmente presentan lesiones de alto grado.

Agradecimientos

Los autores agradecen al laboratorio de patología de la E.S.E. Clínica de Maternidad Rafael Calvo de Cartagena por su colaboración con las láminas de archivo, a Colciencias por la financiación del joven investigador, al Laboratorio Inmunotech (Colombia) por su asesoría técnica y a la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena por facilitar sus instalaciones para la realización de esta investigación.

Bibliografía

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. <http://globocan.iarc.fr>, accessed 15 de febrero de 2014
2. Instituto Nacional de Cancerología. Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en Colombia. Bogotá: INC; 2007.
3. World Health Organization. 2014. Cancer mortality database. <http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>, accessed 15 de febrero de 2014.
4. Ferlay J, Bray F, Steliarova-Foucher E, Forman D. Cancer Incidence in Five Continents, CI5plus: IARC CancerBase No. 9. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.
5. Instituto Nacional de Cancerología. Recomendaciones para el tratamiento de las pacientes con citología reportada con células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) en Colombia. Bogotá: INC; 2007.
6. Alvarado D, Mantilla D, González M. Lesión intraepitelial de bajo grado en endocervix. Rev Obstet Ginecol Venez 2009; 69: 41-47.
7. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17: 2536-2545.
8. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. Cancer Treat Rev 2009; 35: 210-220.
9. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. J Oncol 2012; 2012: 289315.
10. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lutge A, Bergeron C, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecol Oncol 2011; 121: 505-509.
11. Killeen JL, Dye T, Grace C, Hiraoka M. Improved abnormal pap smear triage using cervical cancer biomarkers. J Low Genit Tract Dis 2014; 18: 1-7.
12. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. Cancer Cytopathol 2011; 119: 158-166.
13. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. J Natl Cancer Inst 2013; 105: 1550-1557.
14. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer A, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of P16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. Cancer Cytopathol 2012; 120: 26-34.
15. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res 2012; 18: 4154-4162.
16. Canedo A, Alcántara A, Ortiz C. 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. An Med (Mex) 2006; 51: 49-57.
17. Torres F, Alameda F, Ordic J, Costad I. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico y en el manejo de las lesiones del cuello uterino. Rev Esp Patol 2012; 45: 86-95.
18. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, et al. Immunostaining for p16INK4a used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 2008; 32: 502-512.
19. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. Am J Clin Pathol 2010; 134: 12-21.
20. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarity K, Pichler R, Stoler M, et al. The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Lesions. JAMA 2001; 286: 212-217.

ty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-2119.

21. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). 2002. Pautas éticas internacionales. http://www.urjc.es/z_files/ab_invest/Comite_Etica_Investigacion/Documentos/Pautas_Eticas_Internac.pdf, accessed 16 de marzo de 2014.

22. Cintec Plus Cytology. 2009. Atlas Staining. <http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcsm1/histologie/courtade/CINtec.pdf>, accessed 16 de febrero de 2014.

23. Álvarez A, Barrios L, Borré O, Arzuza O. Búsqueda del marcador de progresión p16INK4a en las lesiones intraepiteliales escamosas cervicales en mujeres de Cartagena de Indias. *Rev Cienc Biomed* 2010; 2: 208-216.

24. Toro de Méndez M, Ferrández Izquierdo A. Detección de virus papiloma humano (HPV) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida: Correlación con la inmunoreactividad de la proteína p16INK4a. *Investigación Clínica* 2011; 52: 3-14.

25. Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35: 689-696.

26. Gage JC, Duggan MA, Nation JG, Gao S, Castle PE. Detection of cervical cancer and its precursors by endocervical curettage in 13,115 colposcopically guided biopsy examinations. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 481-489.

27. Driggers RW, Zahn CM. To ECC or not to ECC: the question remains. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2008; 35: 583-597; viii.

28. Borré -Arrieta O, Barrios-García L, Pérez-Olivio JL, Rivero-Rasgos AE. Legrado y cepillado endocervical durante la evaluación colposcopica en pacientes con citología anormal y colposcopía satisfactoria negativa. *Rev cienc biomed* 2010; 1(2): 155-161.

29. Arteaga-Gómez AC, Castellón-Pasos RM. Lesión Intraepitelial de Bajo Grado: ¿Manejo Conservador o Intervencionista? . *Archivos Médicos de Actualización en Tracto Genital Inferior* 2013; 4 (8): 1-4.

30. Ortega M. Contribución a la patología molecular en el conocimiento de la progresión de la lesión intaeptelial cervical: correlación entre la variabilidad genética del Papilomavirus y la expresión de p16/Ki-67 en la citología cervical convencional. Tesis doctoral. Universidad de Málaga; 2011.

31. Izzeddin R, Ladera M, Hurtado M, Reigosa A, Zavala M, Mora C, et al. 2008. Utilidad de la detección inmunocitoquímica de p16, en el diagnóstico diferencial de lesiones reactivas y neoplásicas en muestras de citología cervical. http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/p16_citología_cervical.pdf.

32. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 946-949.

33. Gutierrez-Tellez C, Prada-Vanegas JH, Bonilla CF, Duran VE. Concordancia entre citología cervico vaginal anormal, colposcopia y biopsia de cervix de usuarias de la Clínica Colombia. Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia: Universidad del Rosario; 2011: 57.

34. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1389-1399.

35. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, Fraschini M, Senes G, Faa G, et al. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. *Am J Clin Pathol* 2012; 138: 652-656.

36. Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR. Dual stain immunohistochemical localization of p16INK4A and ki-67: a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011; 19: 514-518.

37. Blind C, Koepenik A, Pacyna-Gengelbach M, Fernald G, Deutschmann N, Dietel M, et al. Antigenicity testing by immunohistochemistry after tissue oxidation. *J Clin Pathol* 2008; 61: 79-83.

38. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 356-365.

39. Parvin G, Mehrdad N. *Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology*: Springer; 2007.

40. Sanderson T, Zardin G. Immunohistochemistry quality control. In: Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD, eds. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (ed 7th). China: Churchill Livingstone; 2012: 435-454.