

## Tinción dual inmunocitoquímica de $p16^{INK4a}$ /Ki-67 para la detección de lesiones del cuello uterino asociadas a infección por el virus del papiloma humano.

Morelva Toro de Méndez<sup>1</sup>, Antonio Ferrández Izquierdo<sup>2</sup> y Antonio Llombart-Bosch<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Cátedra de Citología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

<sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia y de la Sección de Citopatología. Valencia, España.

<sup>3</sup>Departamento de Patología, Universidad de Valencia, España.

**Palabras clave:** pesquisa de cáncer de cuello uterino, citología en base líquida, VPH oncogénico, lesiones intraepiteliales de cuello uterino, inmunotinción dual  $p16^{INK4a}$ /Ki-67.

**Resumen.** Este estudio se llevó a cabo para examinar el patrón de inmunoexpresión simultánea de  $p16^{INK4a}$ /Ki-67 y establecer su posible utilidad clínica para la detección precoz del cáncer de cuello uterino. Las muestras celulares de cuello uterino fueron seleccionadas de la pesquisa de rutina de cáncer cervical. La detección inmunocitoquímica de  $p16^{INK4a}$ /Ki-67 se realizó con el kit de trabajo CINTec® Plus. Todos los casos tenían una prueba de virus papiloma humano (VPH). Ciento quince muestras citológicas fueron incluidas: 11 (9,6%) fueron negativas para lesión intraepitelial o malignidad (NILM), 32 (27,8%) presentaron células escamosas con atipias de significado indeterminado (ASC-US), 62 (53,9%) mostraron lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y 10 (8,7%) lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). La prevalencia general de infección por VPH fue de 81,7% (94/115). En 42 casos (45,0%) se identificaron los siguientes genotipos específicos de VPH: VPH16 (26,2%), VPH51 (21,4%), VPH52 (14,3%) y el genotipo VPH66 (7,1%). De 115 muestras celulares, 42 (36,5%) fueron positivas para la tinción dual de  $p16^{INK4a}$ /Ki-67, siendo ésta muy frecuente en las muestras citológicas con HSIL (70,0%), disminuyendo en las LSIL (44,0%) y existiendo inmunopositividad en una minoría de ASC-US (25,0%). Ningún caso NILM mostró inmunopositividad para  $p16^{INK4a}$ /Ki-67 ( $p < 0,001$ ). En 40/115 casos (34,8%) hubo positividad tanto para infección por VPH oncogénico como para la tinción dual  $p16^{INK4a}$ /Ki-67, incluyendo 6/32 (18,8%) con ASC-US, 26/62

(42,0%) con *LSIL* and 8/10 (80,0%) con *HSIL*. Esta metodología podría ser utilizada para detectar lesiones en cuello uterino que aún no han sido diagnosticadas o han pasado inadvertidas.

**p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 immunocytochemical dual staining for detection of cervical lesions associated to papillomavirus infection.**

*Invest Clin* 2014; 55(3): 238 - 248

**Keywords:** cervical cancer screening, liquid-based cytology, oncogenic HPV, intraepithelial cervical lesions, p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 dual-immunostaining.

**Abstract.** We aimed to explore the expression pattern of p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 immunocytochemical dual-staining and to establish the potential clinical utility for early detection of cervical lesions. Liquid-based cytologies of cervical specimens of cervical cancer screening were processed for p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 immunocytochemical dual-staining using the CINtec® Plus Kit. HPV testing was performed with the INNO-LiPA HPV genotyping Extra Reverse Hybridization Line Probe Assay kit. One hundred and fifteen cervical cytologies were analyzed with the following results: 11(9.6%) were negative for intraepithelial lesions or malignancy (NILM); 32(27.8%) presented atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US); 62(53.9%) exhibited low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and 10(8.7%) showed high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). No cases of cervical cancer were detected. The overall prevalence of DNA HPV detection was 81.7% (94/115). The following specific HPV genotypes were identified in 42 (45.0%) cases: HPV16 (26.2%), HPV51 (21.4%), HPV52 (14.3%) and HPV66 (7.1%). Viral sequences of an unknown single HPV were detected in 23.8% of the cases. A total of 42/115 (36.5%) were p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 dual-staining-positive, being more frequent in HSIL (70.0%), decreasing in LSIL (44.0%), detected in a minority of ASC-US (25.0%) and negative in NILM cases (p<0.001). 40/115 cases (34.8%) were positive for both oncogenic HPV and p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 dual-staining, including 6/32 (18.8%) ASC-US, 26/62 (42.0%) LSIL and 8/10 (80.0%) HSIL, which represent a strong association between positivity for HPV, p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 staining and severe cytological abnormalities (p<0.001). This methodology could be used to detect unnoticed cervical lesions.

*Recibido: 16-12-2013 Aceptado: 08-05-2014*

## INTRODUCCIÓN

La infección persistente por ciertos tipos específicos de Virus Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo oncogénico (VPHAR) se considera actualmente el principal factor de riesgo necesario para el desarrollo de

cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras: Lesión Intraepitelial Escamosa, *SIL* siglas en inglés (1-3).

Durante el proceso de carcinogénesis del cuello uterino, el ADN del VPHAR se integra al genoma celular e induce la alteración de los mecanismos reguladores del cre-

cimiento celular, mediante la interacción física de las oncoproteínas virales E6/E7 con las principales proteínas celulares supresoras de tumor p53 y Retinoblastoma (pRb), respectivamente, permitiendo de esta manera que la célula se mantenga constantemente en estado proliferativo, conduciendo a la inestabilidad genética y formación de un clon celular maligno. Las alteraciones moleculares inducidas por el VPHAR podrían estudiarse mediante biomarcadores específicos de enfermedad, representando una herramienta complementaria de pesquisa de considerable valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con infección viral (4-7).

La sobreexpresión, individual o combinada, de biomarcadores moleculares inducida por la acción de E7-VPHAR sobre la vía reguladora de la proteína pRb, como la proteína *p16<sup>INK4a</sup>*, un inhibidor de kinasa dependiente de ciclina y un marcador de proliferación celular como *Ki-67*, reflejarían eficazmente el proceso de transformación neoplásica y surgimiento de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (*CIN2+*), siendo de considerable utilidad clínica, especialmente en el triaje de pacientes con citología anormales (8-13).

Actualmente se encuentra disponible una tinción dual inmunocitoquímica (*CINtec PLUS®*) que permite el reconocimiento de células neoplásicas, con ciclo celular alterado y proliferación descontrolada, en muestras citológicas del cuello uterino tanto de origen escamoso como glandular, mediante la inmunoeexpresión simultánea de *p16<sup>INK4a</sup>* y *Ki-67*, mejorando así la detección de pacientes de riesgo a desarrollar o padecer una lesión clínicamente significativa, con elevada sensibilidad y especificidad (11, 14-17). La detección combinada de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* parece ser un indicador altamente específico de la existencia de células transformadas, que descaman de las lesiones premalignas y malignas de cuello uteri-

no asociadas a VPHAR, sobre todo en pacientes con citologías atípicas, que incluyen a las atipias celulares de significado indeterminado (*ASC-US*) así como a las atipias que no excluyen una lesión intraepitelial de alto grado (*ASC-H*) y a la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado o *LSIL* (11, 16, 18, 19).

La aplicación de esta inmunotinción dual *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*, como una prueba complementaria específica en el triaje de pacientes jóvenes, población con infección frecuente por VPH y citologías *ASC-US/LSIL*, es más específica que la detección molecular del ADN de los diferentes tipos de VPH (20), contribuyendo con la disminución del uso de procedimientos clínicos innecesarios, ya que posee elevada sensibilidad y especificidad, así como valor predictivo positivo y negativo suficiente para detectar *CIN2* ó *3* (21). Esta nueva metodología inmunocitoquímica se está comparando con pruebas moleculares de mayor especificidad como la detección de RNAm de VPHAR demostrándose un incremento en la especificidad de la inmunotinción dual para *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* para detectar células neoplásicas transformadas (16,20). La interpretación de los resultados de la inmunotinción para *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* no depende de las características morfológicas de las células teñidas, lo que le confiere mayor objetividad y reproducibilidad, con la consecuente disminución de la variabilidad interobservador, que pudiera presentarse principalmente en los casos citológicos de atipias celulares (16). Así mismo, se ha estudiado la expresión de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* en muestras de tejido de cuello uterino benigno y neoplásico, señalando que la sobreexpresión simultánea de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* es estrictamente confinada a las lesiones cervicales escamosas y glandulares neoplásicas, para distinguir entre las células transformadas y no transformadas por VPHAR (9,22). Esta técnica es capaz de de-

tectar el 100% de los casos con carcinoma *in situ* y cáncer invasor, el 73,9% de CIN2 y el 57,1% de CIN1, siendo negativa en metaplasia escamosa, epitelio atrófico y con cambios reactivos (23). La inmunotinción p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 es útil en la evaluación de pacientes que presentan una prueba de VPHAR positiva pero con citología normal ó negativa para lesión intraepitelial o malignidad (NLIM). Un resultado positivo para la prueba de VPH con inmunotinción dual p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 negativa, indicaría existencia de la infección viral, sin riesgo de neoplasia de cuello uterino (8).

Este estudio se llevó a cabo para examinar el patrón de expresión inmunocitoquímica simultánea de los biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 en muestras citológicas de cuello uterino en base líquida y establecer su posible utilidad clínica en la detección precoz del cáncer de cuello uterino.

## MATERIAL Y METODOLOGÍA

De la base de datos computarizada, fueron seleccionadas las muestras celulares de cuello uterino en base líquida (LBC) con una solicitud de prueba para VPH provenientes de la consulta de pesquisa de rutina de cáncer de cuello uterino del Hospital Clínico de Valencia, España, entre junio y septiembre del año 2011. Estas muestras se procesaron en el *ThinPrep*® 5000 processor y fueron analizadas según los criterios establecidos por el sistema Bethesda 2001 para la interpretación de los hallazgos citológicos del cuello uterino (24).

A partir del material celular residual usado previamente para pesquisa se preparó una segunda lámina con el *ThinPrep*® 5000 processor y se realizó la detección inmunocitoquímica simultánea de los biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 utilizando el kit de trabajo CINtec® Plus (MTM Laboratories Spain SL. Madrid, España), siguiendo estricta-

mente las indicaciones de la casa comercial. La inmunorreactividad fue evaluada en células individuales bien preservadas, independientemente de su morfología. Una muestra se consideró inmuno-positiva para la tinción dual p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 cuando una o más células epiteliales mostraron citoplasma marrón (p16<sup>INK4a</sup>, clon E6H4) y núcleo rojo (Ki-67, clon 274-11 AC3), según lo establecido por la casa comercial. Las células sin la doble tinción simultánea representaron un resultado inmuno-negativo así como las células que expresaron a un solo biomarcador (Fig. 1). Los grupos celulares con superposición celular significativa no fueron considerados durante la evaluación. Se incluyeron controles positivos (muestras citológicas interpretadas previamente como HSIL) y negativos (misma muestra HSIL, omitiendo los anticuerpos anti- p16<sup>INK4a</sup> y anti- Ki-67). Todos los casos fueron reevaluados independientemente por dos patólogos expertos.

La detección y tipificación de VPH se llevó a cabo en las muestras celulares residuales en base líquida usadas previamente para la pesquisa de cáncer cervical e inmunocitoquímica, mediante el ensayo *INNO-Lipa HPV genotyping Extra Reverse Hybridization Line Probe* (INNOGENETICS S.L. Barcelona, España), el cual identifica 28 tipos específicos de papilomavirus: VPH-6, -11, -16, -18, -26, -31, -33, -35, -39, -40, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -56, -58, -59, -66, -68, -69, -70, -71, -73, -74, y -82. Los controles positivos y negativos incluidos correspondieron a muestras de cuello uterino que ya habían sido previamente examinadas para VPH.

## Análisis estadístico

Se realizó con el paquete estadístico SPSS v17.0 usando el test de *Chi-cuadrado* ( $\chi^2$ ). Un valor de *p* igual o menor a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

Ciento quince citologías en base líquida de cuello uterino fueron incluidas: 11(9,6%) negativa para lesión intraepitelial o malignidad (NILM), 32(27,8%) células escamosas con atipias de significado no determinado (ASC-US), 62(53,9%) lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y 10(8,7%) con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). No se encontró ningún caso de cáncer invasor de cuello uterino. La edad promedio fue de 33,8 años (rango de edad de 17 a 62 años). La mayor proporción de casos se encontró en el grupo <40 años (70,2%). La prevalencia general de infección por VPH fue de 81,7% (94/115). En 42 casos de estos (45,0%) se detectaron secuencias de ADN de VPH de un solo tipo específico de VPH, siendo identificados los siguientes: VPH16 (26,2%), VPH51 (21,4%), VPH52 (14,3%) y el genotipo VPH66 de probable riesgo oncogénico (7,1%), así mismo se detectaron los genotipos VPH35 y VPH39 en igual porcentaje (2,4%). El VPH11 fue detectado también en un caso (2,4%). En el 23,8% se detectaron secuencias virales de VPHX. La infección por múltiples tipos de VPH se presentó en el 55,0% de los casos estudiados, combinán-

dose frecuentemente genotipos virales oncogénicos. Un total de 42/115 (36,5%) muestras celulares fueron positivas para la tinción dual de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*, siendo ésta muy frecuente en las muestras citológicas con HSIL (70,0%), disminuyendo en las LSIL (44,0%) y siendo inmuno-positiva en una minoría de ASC-US (25,0%). Ningún caso NILM mostró inmunopositividad para los biomarcadores estudiados, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Tabla I). En la Fig. 1 se exponen imágenes de muestras citológicas con inmunotinción para *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* de este estudio, que incluyen un ejemplo de positividad de la prueba (A y B: célula epitelial con doble inmunorreactividad: en el citoplasma (marrón) que indica sobreexpresión de la proteína *p16<sup>INK4a</sup>* y en el núcleo (rojo) con expresión del antígeno de proliferación celular *Ki-67*, independientemente de la interpretación morfológica), así como imágenes de resultados positivos (C-I) tanto en células atípicas como en células representativas de lesión intraepitelial. También se pueden apreciar resultados inmunonegativos, a pesar de tratarse, por ejemplo, de coilocitos compatibles con infección por VPH (K). En cuarenta de los 115 casos (34,8%) se detectó positividad tanto para secuencias

**TABLA I**  
DISTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE VPH E INMUNOREACTIVIDAD PARA *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* DE ACUERDO CON LOS HALLAZGOS CITOLÓGICOS

Citología	VPH		Tinción dual <i>p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67</i>	
	Negativo	Positivo	Negativa	Positiva
NILM (n=11)	2 (18,0%)	9 (81,8%)	11 (100,0%)	0
ASC-US (n=32)	14 (44,0%)	18 (56,0%)	24 (75,0%)	8 (25,0%)
LSIL (n=62)	4 (6,5%)	58 (93,5%)	35 (56,5%)	27 (44,0%)
HSIL (n=10)	1 (10,0%)	9 (90,0%)	3 (30,0%)	7 (70,0%)
Total (n=115)	21 (18,3%)	94 (81,7%)	73 (63,5%)	42 (36,5%)

NILM: negativa para lesión intraepitelial o malignidad. ASC-US: células escamosas con atipias indeterminadas. LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado. VPH: virus papiloma humano.  
 $p < 0,001$ .



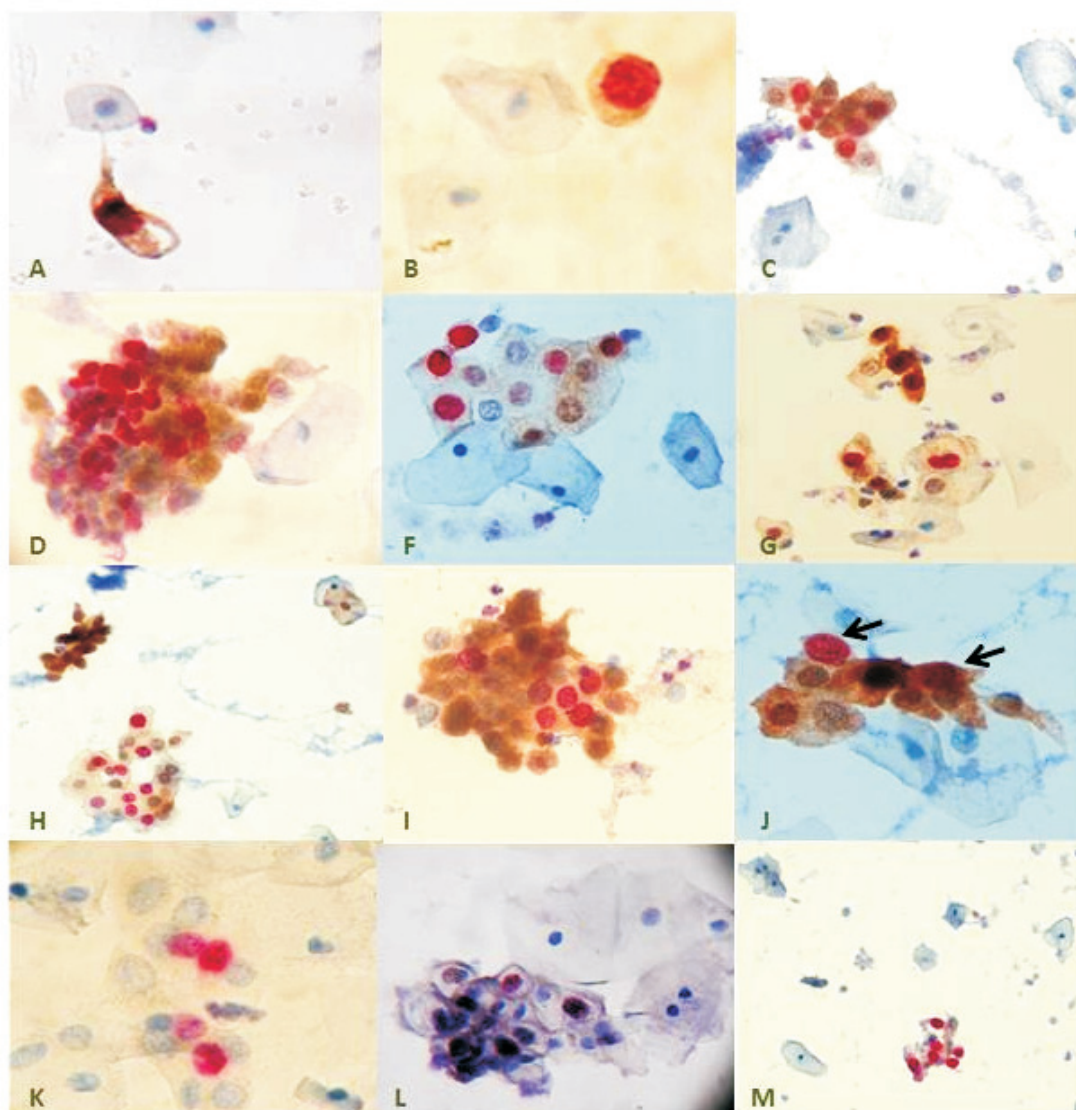


Fig. 1. Ejemplos de muestras citológicas en base líquido del cuello uterino teñidas con la tinción dual inmunocitoquímica para p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67. Contratinción con Hematoxilina de Harris. Un resultado positivo está representado por al menos una célula epitelial con doble inmunoreactividad: en el citoplasma (marrón) que indica sobreexpresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> y en el núcleo (rojo) con expresión del antígeno de proliferación celular Ki-67, independientemente de la interpretación morfológica (A: célula metaplásica inmadura atípica y B: célula basal maligna), 40X. C: Células metaplásicas inmaduras atípicas (ASC-H), 20X. D: Células metaplásicas inmaduras atípicas (ASC-H), 40X. E: Células intermedias discarióticas (LSIL), 40X. F: Coilocitos inmunopositivos para p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67. Tres células inmaduras atípicas con intensa sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup>, a nivel nuclear y citoplasmático (LSIL), 20X. G: Células intermedias atípicas (ASC-US), 10X. H: Células metaplásicas inmaduras atípicas (ASC-H), 40X. I: Células metaplásicas inmaduras atípicas (ASC-H), 40X. En la parte superior (flechas), dos células con inmunoreactividad positiva para p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67. El resto de las células epiteliales son sólo reactivas ante el anticuerpo contra p16<sup>INK4a</sup>, 40X. Resultados inmuno-negativos para tinción dual p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 en células epiteliales del cuello uterino (J-L): J: ASC-US, 40X; K: LSIL (coilocito), 40X; L: ASC-H, 10X.

genómicas de VPH como para la inmunotinción dual *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*, incluyendo 6/32 (18,8%) con *ASC-US*, 26/62 (42,0%) con *LSIL* and 8/10 (80,0%) con *HSIL*, lo cual demuestra una elevada asociación entre la presencia de ADN viral, la inmunoeexpresión simultánea de los biomarcadores *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* e incremento de las anormalidades morfológicas en células epiteliales del cuello uterino ( $p < 0,001$ ), como se aprecia en la Tabla II. Todos los VPH detectados en estos casos eran de alto riesgo oncogénico, incluyendo los casos que presentaban infección múltiple por VPH. En la Tabla III se observa que el 95,2% de los casos con infección por VPH también mostraron coexpresión de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*, indicando una asociación significativa entre la presencia de infección por VPH y la inmunorreactividad positiva para la tinción dual de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* ( $p = 0,003$ ).

### DISCUSIÓN

En este estudio se examinó el patrón de expresión simultánea de los biomarcadores *p16<sup>INK4a</sup>/Ki67* para establecer su posible utilidad clínica en la detección precoz del cáncer de cuello uterino, asociado a infección por VPH. En estudios previos, se ha determinado el valor clínico de esta inmunotinción para *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*, en pacientes con lesiones en el cuello uterino, tanto de origen escamoso como glandular, demostrando una elevada sensibilidad y especifici-

**TABLA II**  
ASOCIACIÓN DE LOS CASOS POSITIVOS PARA VPH Y PARA *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* CON RESULTADOS CITOLÓGICOS

Citología	VPH-positivo/ <i>p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67</i> -positiva
ASC-US	6/32 (18,8%)
LSIL	26/62 (42,0%)
HSIL	8/10 (80,0%)
Total	40/115 (34,8%)

ASC-US: células escamosas con atipias indeterminadas. LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado. VPH: virus papiloma humano.  
 $p < 0,001$ .

dad para la detección de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (*CIN2+*) ocultas, especialmente en poblaciones con citologías atípicas o de bajo grado (11, 14-16, 18-22).

El presente estudio incluyó casos con diferentes grados de alteraciones morfológicas como *ASC-US*, *LSIL* y *HSIL*, de los cuales, el 36,5% mostró células epiteliales con expresión simultánea de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*, observándose una asociación significativa entre el incremento de la inmunorreactividad y la severidad de las categorías citológicas que engloban a las lesiones de cuello uterino. Además, en el 95,2% de los casos con positividad para la presencia de infección por VPH oncogénico también hubo inmunoeexpresión de *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67*. Hallazgos si-

**TABLA III**  
RESULTADOS DEL ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* EN CORRELACIÓN CON LA DETECCIÓN DE VPH

VPH	Tinción dual <i>p16<sup>*</sup>/Ki-67</i>	
	Positiva	Negativa
Positive	40 (95,2%)	54 (74,0%)
Negative	2 (4,8%)	19 (26,0%)
Total	42	73

$p = 0,003$  (prueba de Fisher).

milares a estos han sido reportados en otras investigaciones (11, 15, 18, 19). Doná y col. (11) encontraron en 140 pacientes, un 94,6% de positividad tanto para VPH (VPH16 y 18) como para la tinción dual y concluyeron que esta positividad está asociada significativamente a la presencia de CIN2+ confirmada por estudio histopatológico. Yoshida y col. (19) concluyeron que a mayor grado de severidad incrementa también el número de células inmunoreactivas para p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67, encontrando el mayor número de casos en el grupo con infección por VPH oncogénico, sobre todo VPH16.

Este hallazgo demuestra la importancia de la expresión simultánea de p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 en células epiteliales del cuello uterino infectadas con VPHAR, lo cual aporta un dato relevante para el manejo clínico de las pacientes con estas características. Las oncoproteínas E5, E6 y E7 codificadas por VPHAR están involucradas en diferentes eventos genéticos y epigenéticos que alteran la proliferación, promoviendo así un estado de mitosis permanente y descontrolado, lo que conlleva a la inmortalización celular e inestabilidad genómica que causa la transformación celular (25-30). Por lo tanto, la expresión simultánea de p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 indicaría de manera confiable la existencia de un proceso de transformación celular y posiblemente asociado a progresión neoplásica. Esto permite deducir que las pacientes con inmunoexpresión simultánea de p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 serían de alto riesgo a padecer una lesión clínicamente significativa que debe ser tratada oportunamente. Esta suposición es clínicamente de gran utilidad en pacientes con citologías compatibles con ASC-US/LSIL, en las cuales es necesario determinar los casos con infecciones transformante, que poseen una mayor posibilidad de progresar a CIN2 o más (18, 21).

En este estudio, todas las muestras citológicas NLIM fueron inmunonegativas para p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67. Este hallazgo es seme-

jante al de otras publicaciones (11, 15, 21, 22). Además, Samarawardana y col. (22) demostraron que estos biomarcadores no se expresan de manera simultánea en tejido cervical normal o benigno. Por el contrario, Petry y col. (14), Ikenberg y col. (31) y Yoshida y col. (19) observaron inmunorreactividad ante p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 en pacientes infectadas con VPHAR con citologías normales en el 25,4%, 22,0% and 14,0% de los casos, respectivamente. Estos estudios incluyeron a pacientes de un estudio piloto prospectivo con citologías normales pero positivas para VPH (14), a pacientes del estudio PALMS de pesquisa (31) y a pacientes con citología positiva previa y mayores de 30 años de edad (19). Las diferencias entre los hallazgos de estas investigaciones y el presente estudio probablemente radican en las diferentes características epidemiológicas de cada población estudiada. La inmunorreactividad positiva para p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 en pacientes con citologías normales e infección por VPHAR debería considerarse de riesgo para lesión precancerosa de alto grado y beneficiarse de atención clínica inmediata.

En este estudio, 4,8% de los casos no infectados por VPH fueron positivos para la tinción dual p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 (Tabla III). Recientemente, Donà y col. (11) reportaron resultados muy similares (4,3%) entre los casos de su estudio. Esto sugiere que podrían existir mecanismos independientes de la infección por VPH, como mutaciones o hipermetilación del gen p16 (32), que eventualmente serían la causa del descontrol del ciclo celular, lo cual constituye un aspecto de interés para futuras investigaciones. Es posible también que en estos casos hayan ocurrido fallas en la detección de secuencias virales, lo cual no podemos descartar y que debe considerarse en nuevas discordancias.

Finalmente, en este estudio observamos una serie de limitaciones, que deben ser consideradas para interpretar los hallaz-



gos y para futuras investigaciones: primero, la población estudiada era muy pequeña en comparación con los estudios referidos. Segundo, no se realizó seguimiento histopatológico a las pacientes con citología anormal. Tercero, se estudió una población específica limitada a un área geográfica, sin el conocimiento de antecedentes así como de factores que pudieran influir sobre los resultados obtenidos. Además, esta población no era representativa de esta región española. Por último, éste no fue un estudio basado en casos y controles que permite determinar la validez del método inmunocitoquímico para *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* en la detección de lesiones premalignas y malignas. Por lo que se considera que esta metodología requiere de evaluaciones mediante estudios en grandes poblaciones con diferentes características epidemiológicas, que permitan establecer su verdadera utilidad en el apropiado seguimiento clínico, incluyendo y en consonancia con otros investigadores (33, 34) que la interpretación de los resultados de los diferentes métodos, en este caso el inmunocitoquímico con posible utilidad clínica en el diagnóstico de lesiones premalignas del cuello uterino, sea estandarizada y mejor aún cuantificada, de manera que sean verdaderamente eficaces en la pesquisa a través del frotis Papanicolaou.

Los hallazgos de este estudio confirman que la expresión simultánea de los biomarcadores *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* es característica de células epiteliales transformadas por VPHAR, pudiendo indicar la existencia de neoplasia con elevada exactitud, sobre todo en los casos citológicos compatibles con lesión intraepitelial escamosa. Esta metodología podría ser utilizada para detectar pacientes con lesiones neoplásicas en cuello uterino, ocultas, que aún no han sido diagnosticadas o han pasado inadvertidas, asociadas a infección por VPHAR. La combinación de estos dos biomarcadores podría facilitar el diseño de algoritmos de manejo

clínico, considerando también la edad de las pacientes, interpretación cito-histológica y el resultado del examen molecular para detección y tipificación de VPH, a fin de reducir los procedimientos de seguimiento clínico innecesarios.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores le damos las gracias a todo el personal del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia y del Hospital Clínico de Valencia por su colaboración en este proyecto, especialmente a Alejo Sempere, Richart Sotos y Amparo Duet. De igual forma, agradecen a David Harrison por las correcciones del abstract.

Este estudio fue financiado por la Junta Provincial de la Agencia Española contra el Cáncer, Valencia, España.

### REFERENCIAS

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.
2. Alemany L, Pérez C, Tous S, Llobart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, Guarch R, Andújar M, Pelayo A, Alejo M, Ordi J, Klaustermeier J, Velasco J, Guimerà N, Clavero O, Castellsagué X, Quint W, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S; Spanish study group RIS HPV TT. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol* 2011; 124:512-517.
3. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, Muñoz N, Palacios S, San Martín Rodríguez M, Serradell L, Torcel-Pagnon L, Cortes J; CLEOPATRE Spain Study Group. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol* 2012; 84:947-956.

4. **Sahasrabudde VV, Luhn P, Wentzensen N.** Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiol* 2011; 6:1083-1098. doi: 10.2217/fmb.11.87.
5. **Schiffman M, Wentzensen N.** Human papillomavirus infection and the multi-stage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22:553-560.
6. **Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30:F55-F70.
7. **Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J.** Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine* 2012; 30:F24-33.
8. **Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R.** Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with *p16/Ki-67* dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* 2011; 121:505-509.
9. **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.
10. **Atkins K.** p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol* 2011; 119:145-147.
11. **DONÀ MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M.** *p16/Ki-67* dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol* 2012; 126:198-202.
12. **Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R.** Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010; 133:395-406.
13. **Toro de Méndez M, Ferrández Izquierdo A.** Detection of human papilloma virus (HPV) in liquid-based cervical samples. Correlation with protein *p16<sup>INK4a</sup>* expression. *Invest Clin* 2011; 52:3-14.
14. **Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, Butera D, Palmieri EA, Bulletti S, Cariani A, Staiano M, D'Amico MR, D'Angelo V, Di Dato E, Martinelli N, Malaspina M, Spita N, Tintori B, Fulciniti F.** Role of *p16<sup>INK4a</sup>* cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol* 2012; 56: 506-514.
15. **von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C.** Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16INK4a to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics* 2012; 9:149-163.
16. **Loghavi S, Walts AE, Bose S.** CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol* 2013; 41:582-587.
17. **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.
18. **Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R.** *p16/Ki-67* dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology* 2011; 119: 158-166.
19. **Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, Obara M, Fukuda T.** Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol* 2011; 55: 413-420.
20. **Waldstrom M, Christensen RK, Ornskov D.** Evaluation of *p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67* dual stain comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol* 2013; 121: 136-145.

21. **Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M.** Performance of *p16/Ki-67* immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res* 2012; 18:4154-4162.
22. **Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR.** Dual stain immunohistochemical localization of *p16<sup>INK4a</sup>* and *ki-67*: a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011; 19:514-518.
23. **Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Kommos F, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M.** Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of *p16<sup>INK4a</sup>* and *Ki-67* in epithelial cells. *Int J Cancer* 2012; 130:388-394.
24. **Solomon D, Ritu N.** The Bethesda System for reporting cervical cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. Springer. 2004. ISBN 978-0-387-40358-8.
25. **zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-350.
26. **Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ.** HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1:S25-33.
27. **Yugawa T, Kiyono T.** Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009; 19:97-113.
28. **Boulouour S, Weyn C, Van Noppen M, Moussa Ali M, Favre M, Delvenne PO, Bex F, Noël A, Englert Y, Fontaine V.** Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis* 2010; 31:473-480.
29. **Chen JJ.** Genomic instability induced by human papillomavirus oncogenes. *NAJ Med Sci* 2010; 3:43-47.
30. **Ganguly N.** Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value. *Cell Oncol (Dordr)* 2012; 35:67-76.
31. **Ikenberg H, Sideri M, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Griesser H, Bogers J, Neumann H, Schmidt D, Ridder R.** Management of Pap-negative-HPV-positive women with *p16/Ki-67*-dual-stained cytology: PALMS-trial-results. <http://www.hpv2011.org/abstractbooks>. Último acceso 5 de mayo 2013.
32. **Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, Gau CH.** Is *p16(INK4A)* expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; 97:35-40.
33. **van Bogaert LJ.** P16INK4a immunocytochemistry/immunohistochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. *Ann Diagn Pathol* 2012; 16:422-426.
34. **Gertych A, Joseph A, Walts A, Bose S.** Automated detection of dual *p16/Ki67* nuclear immunoreactivity in liquid-based Pap tests for improved cervical cancer risk stratification. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 1192-1204.