



Servicio de Obstetricia y Ginecología
Hospital Universitario
Virgen de las Nieves
Granada

ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS LESIONES INTRAEPITELIALES DEL TRACTO GENITAL INFERIOR

José María Puerta Sanabria

22 de Octubre de 2014

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cérvix es la tercera causa más frecuente de neoplasia en la mujer a nivel mundial, con predominio en países de nivel socioeconómico medio-bajo, dándose en ellos más de un 85% de los casos.

La Organización Mundial de la Salud además lo ha catalogado como el primer cáncer que se conoce que sea íntegramente provocado por una infección.

Su progresión neoplásica se basa en múltiples pasos que se espacian en el tiempo, pasando de lesiones epiteliales de bajo grado a aquellas de moderado y alto grado.

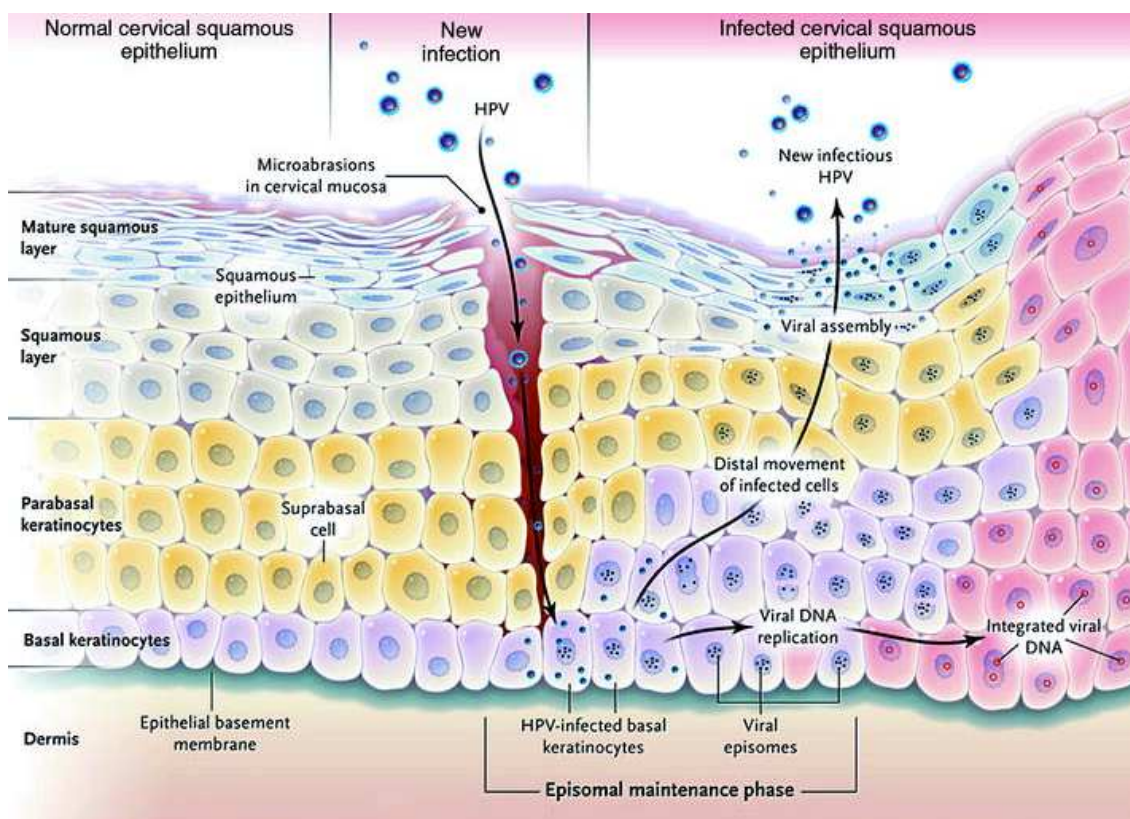
La detección y el tratamiento de la displasia cervical en mujeres jóvenes es importante para reducir la morbimortalidad por esta patología. La introducción de programas de screening en muchos países en las últimas décadas, ha conseguido disminuir de forma importante la incidencia y mortalidad de este cáncer, aunque en la mayoría de casos se ha visto limitado por el nivel de recursos de los mismos.

Las biopsias cervicales en conjunción con la citología, la colposcopia y los test de ADN viral juegan un papel importante en la evaluación y manejo de las

mujeres con lesiones cervicales displásicas, lo cual es crucial para la prevención y detección temprana del cáncer cervical.

Ciclo biológico del papilomavirus

El ciclo biológico del VPH comienza con su penetración en la célula a través de microabrasiones del epitelio que le permiten llegar a las capas más basales, siendo estas células las únicas del epitelio capaces de dividirse, aprovechándose de ello el virus para replicar su ADN.



La primera fase es conocida como **fase productiva**, y en ella el genoma viral se replica muy lentamente como un cromosoma más, al ritmo de la división celular, manteniendo así un bajo número de copias, produciendo una serie de proteínas no estructurales conocidas como *proteínas tempranas*. Posteriormente, dentro de esta misma fase, la replicación viral aumenta, comenzando ya a formarse proteínas estructurales (*proteínas tardías*) que podrán dar lugar a viriones ó partículas víricas, considerándose en estos casos que el ciclo biológico del virus se ha completado.

La segunda fase ó **fase de transformación**, es aquella en la cual el ADN del VPH es integrado en el ADN del huésped, lo que provoca alteraciones tanto a nivel celular como tisular. Alcanzar este punto de la infección se considera uno de los factores de riesgo más importantes para que una lesión de bajo grado evolucione a una de alto grado.

En la mayoría de mujeres, tras un periodo de meses ó años se desarrolla una respuesta inmune de tipo celular a nivel local frente al virus que consigue acabar con la infección. Sin embargo, esto no sucede en todos los casos. El principal problema, por tanto, radica en cómo identificar aquellos individuos en los que existe un mayor riesgo de persistencia y progresión de la enfermedad, de entre el gran número de pacientes infectadas por VPH.

Existen algunos eventos que se consideran cruciales en la carcinogénesis por VPH, como son la expresión de determinadas proteínas de las denominadas tempranas, ó la integración del ADN del VPH en el genoma hospedador. Varios marcadores sintetizados en los diferentes estadios de la historia natural de la infección y su posterior progresión cancerígena han sido identificados y catalogados como marcadores de riesgo de desarrollar cáncer de cérvix.

El objetivo de la siguiente revisión se basa en analizar las novedades en el diagnóstico de la patología cervical, deteniéndose en aquellas fundamentadas en la base molecular de la infección, y así poder establecer qué papel podrán desempeñar en futuros programas de cribado de la infección por VPH.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Estudio de Papanicolaou

El estudio de Papanicolaou se basa en la identificación citológica de alteraciones celulares a partir de muestras obtenidas de la zona de transformación cervical, la unión entre el ecto y el endocérvix, en donde la displasia cervical y el cáncer de cérvix se desarrollan con mayor frecuencia.

Desde su descubrimiento hace más de 60 años se ha utilizado en programas de screening para detectar el cáncer de cuello uterino y sus precursores.

- Citología convencional:

La citología convencional obtiene muestras cervicales y vaginales mediante un cepillo y una espátula, para luego depositarlas en un portaobjetos y preservarlas posteriormente con un fijador.

Hay varios sesgos específicos de esta prueba que deben ser considerados:

- El más importante es la alta tasa de falsos negativos que presenta, debido, en la mayoría de casos, a la obtención de una muestra inadecuada, aunque también pueden deberse a errores en la interpretación por parte del patólogo.
- Solo el 20% de las células son transferidas en forma efectiva al portaobjetos, el resto son eliminadas.
- Es frecuente que al tomar la muestra, ésta se contamine de material hemorrágico ó inflamatorio en caso de estar éste presente en la vagina ó el cérvix, transfiriéndose posteriormente dicha contaminación al portaobjetos.

- Citología en base líquida:

En este caso se transfiere la muestra, obtenida de un cepillo para endo y ectocérvix, directamente a un líquido con una solución fijadora. El laboratorio posteriormente obtiene las células mediante un filtro.

Las principales ventajas que presenta con respecto a la técnica convencional:

- Eliminación del posible infiltrado inflamatorio y/ó hemorrágico, así como reducción del área evaluada lo que permite una mayor rapidez en la valoración de la muestra así como una visualización mucho más satisfactoria, disminuyendo así al mínimo los errores de interpretación.

- El líquido preserva las estructuras citológicas, el ADN, el ARN y las proteínas citoplasmáticas, lo cual permite reevaluar la muestra con posterioridad en caso de existir dudas en la actitud a seguir con la paciente, ó si se desea llevar a cabo en su ulterior seguimiento, otras técnicas como el tipaje del ADN viral.
- Se ha demostrado que mejora la tasa de detección de anomalías glandulares, ASCUS y LSIL.

A pesar de que las muestras obtenidas con la citología en base líquida son mucho más adecuadas, este beneficio no ha resultado clínicamente significativo al estudiarse en distintas revisiones sistemáticas, debido a que no detecta más casos de precursores cancerígenos (HSIL) que el test convencional. Sin embargo, las ventajas descritas, y en especial la oportunidad de poder repetir la prueba ó llevar a cabo pruebas adicionales sobre la misma muestra, le otorga unas diferencias que colocan a la citología en medio líquido en una posición aventajada con respecto a la prueba convencional.

ADN, ARN y proteínas del papilomavirus

- ADN VPH:

Existen múltiples ensayos para detectar ácidos nucleicos del VPH en muestras cervicales, tanto de cepas oncogénicas como no oncogénicas.

A continuación se destacan sus principales características:

- La principal ventaja que presenta este test es su **alta sensibilidad** y un consecuente **valor predictivo negativo elevado**.
Esto nos indica que ante un resultado negativo del test existe un riesgo extremadamente bajo de que haya una neoplasia intraepitelial cervical de alto grado ó cáncer; lo cual lo convierte en una buena herramienta de cribado, y permite además espaciar los controles, puesto que el riesgo de desarrollar una lesión de alto grado en los cinco años posteriores a un test de ADN negativo también es muy bajo.

- Su baja especificidad, sin embargo, impide que pueda emplearse como test aislado en screening primarios, razón por la cual debe realizarse de forma conjunta a la citología.
- La especificidad de estos test aumenta con la edad de la paciente, presentando mejores tasas en mujeres por encima de los 30 años que en mujeres jóvenes. Además, la infección por VPH en pacientes mayores tiende a ser persistente con mayor frecuencia, razón por la cual este aumento de la especificidad es bastante relevante desde el punto de vista clínico.
- Otra ventaja de estos test es la capacidad de detección del ADN viral en los casos de adenocarcinoma, el cual en muchas ocasiones puede pasar desapercibido mediante técnicas citológicas.

Existen diferentes test disponibles, que se basan en diversas técnicas para la obtención del ADN. La técnica más empleada es la amplificación de dianas genéticas mediante PCR.

Podemos distinguir dos tipos de ensayos:

- Los que identifican un pool de virus de alto riesgo, con ó sin genotipaje. Estos son empleados en programas de screening, en donde no existe beneficio clínico en el conocimiento de los tipos específicos de VPH. Destaca en este grupo el *Hybrid Capture 2*, que detecta hasta 13 tipos de VPH de alto riesgo.
- El otro grupo lo forman los ensayos que detectan un amplio espectro de VPH, tanto oncogénicos como no oncogénicos, en todos los casos con su correspondiente genotipo. Se emplean principalmente para estudiar la supervivencia viral.
- Aparte, existen test más específicos útiles en el triaje de mujeres con ASCUS ó LSIL, que solo detectan los tipos virales carcinogénicos más frecuentes, el VPH 16 y 18. Estos ensayos también se pueden emplear en el seguimiento de pacientes mayores de 30 años con un test previo positivo a múltiples virus.

Debido a su alto VPN, la mayoría de guías y sociedades científicas recomiendan el test de ADN de VPH como un método de screening primario en la detección del cáncer cervical. Sin embargo, como se ha explicado previamente, su baja especificidad hace que se recomiende realizar el cribado conjunto con citología. Sus principales indicaciones son:

- Cribado de lesiones citológicas de carácter leve en pacientes mayores de 25-30 años: LSIL, ASCUS y AGC.
- Seguimiento de pacientes tratadas de CIN.
- En pacientes por debajo de 25 años no debe ser empleado como cribado rutinario, con el fin de evitar el sobretratamiento de estas mujeres, debido a la alta posibilidad de que un resultado sea positivo tratándose en la mayoría de los casos de una infección transitoria.

- ARN VPH:

La diferenciación de las células que han sido infectadas por el VPH se acompaña de mayor replicación viral así como de la activación de la fase productiva del ciclo biológico del virus. En particular, la expresión de las proteínas tempranas E6 y E7 en las capas epiteliales intermedias, es la responsable de la **disregulación del control sobre el ciclo celular**, induciendo a las células a entrar en la fase S del mismo, permitiendo así la amplificación del genoma viral. Es por ello que la sobreexpresión de estas proteínas se considera uno de los factores críticos en el desarrollo del cáncer cervical.

Los test de ARN viral son capaces de detectar el ARN del VPH que está codificando la síntesis de las proteínas E6 y E7, basándose en técnicas de PCR.

Un reciente metaanálisis ha demostrado que en el cribado de pacientes con ASCUS y LSIL, los test de ARN viral son igual de sensibles que los test de ADN en la detección de CIN 2 ó superior, pero sin embargo presentan mayor

especificidad. Son necesarios más estudios para conocer la capacidad de estos test de garantizar protección a largo plazo frente al virus.

- Proteínas del VPH:

Estos test se basan en la detección de los niveles de determinadas proteínas en células obtenidas de una muestra cervical.

El más estudiado de estos ensayos es el que determina la presencia de la proteína E6, que en recientes estudios parece presentar mayor especificidad que los test de ADN, aunque a costa de una pérdida en la sensibilidad. Es por ello que se plantea su uso en el futuro como complemento diagnóstico en los casos de pacientes con ADN de VPH positivo.

Biomarcadores celulares

Proteína p16:

La progresión de la infección por VPH de productiva a transformadora viene determinada por la alteración en la expresión génica del virus. Este cambio le confiere un mayor riesgo de desarrollar lesiones preneoplásicas y cáncer.

La principal acción de los oncogenes del VPH es degradar la proteína p53 (supresora de tumores) mediante la proteína temprana E6, ya citada previamente. De esta manera consigue inhibir la apoptosis, así como liberar el factor de transcripción E2F de la proteína Rb (también supresora de tumores), lo cual permite mantener activo el ciclo celular.

Fisiológicamente la activación del factor E2F es mediada por la fosforilación de la proteína Rb. Esta vía, está estrictamente regulada por un bloque de enzimas inhibitoras, entre ellas la p16, que bloquean las enzimas fosforiladoras de la pRb. En las células con infección en fase transformadora del VPH, la regulación de la vía Rb-E2F se altera debido a la acción de la proteína temprana viral E7, lo que provoca que la acción de la p16 no tenga el efecto inhibitor previamente descrito, manteniéndose activo el ciclo celular.

Como resultado de ello habrá una sobreproducción de p16 y se acumulará en la célula, lo cual puede detectarse mediante técnicas de inmunotinción, y

considerarse como un marcador de infección por un papilomavirus inductor de disregulaciones del ciclo celular.

La inmensa mayoría de lesiones preneoplásicas y cánceres cervicales han demostrado presentar una sobreexpresión de la proteína p16, mientras que en tejidos normales se encuentra en muy contadas ocasiones, debido a que la acción de la proteína E7 en los virus de alto riesgo es hasta 10 veces más efectiva que en los de bajo riesgo.

Sin embargo, el hecho de que en un pequeño porcentaje de casos sin alteraciones displásicas esta proteína pueda hallarse sobreexpresada, hace que se requiera de una evaluación histológica adicional para llevar a cabo una correcta evaluación.

La expresión de la p16 parece ser independiente del tipo de virus de alto riesgo que provoca la infección oncogénica, por lo que seguirá siendo necesario la tipificación del virus por técnicas de detección de ADN.

Además, a diferencia de otros marcadores tumorales clásicos, p16 no se asocia con la proliferación, no expresándose en otras células normales con alta capacidad proliferativa.

La sensibilidad de la p16 para detectar casos de CIN 2 ó peor con citología previa de ASCUS ó LSIL se sitúa en un 83%, por una especificidad que ronda el 70%.

¿Cuándo considerar un caso positivo?

Consideramos que p16 es positivo en una tinción cuando se tiñe en banda más de un tercio del grosor epitelial, comprendiendo la capa basal, afectando la tinción especialmente a los núcleos celulares.

Las tinciones focales ó parcheadas no son específicas y pueden verse en metaplasias escamosas ó en lesiones de bajo grado.

Recomendaciones de uso:

- En el diagnóstico diferencial entre precáncer (CIN 2-3) y lesiones no cancerígenas que puedan confundir con lesiones de alto grado (metaplasia escamosa, atrofia, cambios epiteliales de reparación...).
- Aquellos casos en los que el patólogo dude en un diagnóstico histológico entre CIN 1 y CIN 2.
Si el patólogo tiene un **diagnóstico seguro de CIN 1** no se recomienda realizar la p16, puesto que no existe suficiente evidencia científica que determine si debe manejarse de forma distinta pacientes con CIN 1 y p16+ con respecto a los que tuvieran la p16-.
Del mismo modo, tampoco estará indicado realizar la p16 si el diagnóstico diferencial de una muestra es entre CIN 1 y normal.
- La p16 también se recomienda en aquellos casos en los que existe discordancia en el diagnóstico de una lesión entre dos patólogos (**variabilidad interobservador**), siempre y cuando el diagnóstico diferencial incluya lesiones precancerosas.
- No se recomienda su uso **de forma rutinaria** junto a las técnicas histológicas, en las que la interpretación de la muestra ha sido negativa, CIN1 ó CIN3.
 - o Los casos de CIN 1 en que se obtuviera una p16+ podría llevar a sobretratar a las pacientes, cuando, como ya hemos visto, no existen evidencias científicas que apoyen esta actitud.
 - o Igualmente, una p16- no debe llevar a reducir el grado de una muestra con diagnóstico de CIN 3.
- Como **caso especial**, la p16 sí estaría recomendada en casos con biopsia interpretada como CIN 1 ó menor, con citología previa de HSIL, ASC-H, AGC ó ASCUS con VPH 16. En caso de que el resultado de la

p16 fuera positivo la muestra debería ser reinterpretada por el patólogo para descartar que algún foco de lesión haya sido pasado por alto.

Es imprescindible para hacer el diagnóstico de lesión de alto grado, que éste sea puramente histológico.

- Siguiendo estas recomendaciones, se estima que se emplearía la p16 en menos del 25% de todas las biopsias cervicales.

Lesiones de alto grado vS lesiones que pueden confundir	2%
Posible CIN 2	12%
Variabilidad interobservador	1%
≤CIN 1 + citología alto riesgo	4%
<i>Total</i>	19%

- Ki-67:

- La proteína Ki-67 es un marcador de proliferación celular, expresado durante casi todas las fases del ciclo celular.

Como ya hemos dicho, la infección por VPH de alto grado induce a una proliferación descontrolada, lo cual se verá reflejado en una mayor cantidad de Ki-67 en el interior de la célula.

La cuantificación de la expresión de este biomarcador mediante inmunotinción es un test útil en la evaluación de las lesiones cervicales, presentando una alta sensibilidad para diferenciar entre CIN 1 y CIN 2-3.

- Ki 67 y p16 son biomarcadores complementarios, lo cual plantea una nueva alternativa en el diagnóstico del cáncer cervical.

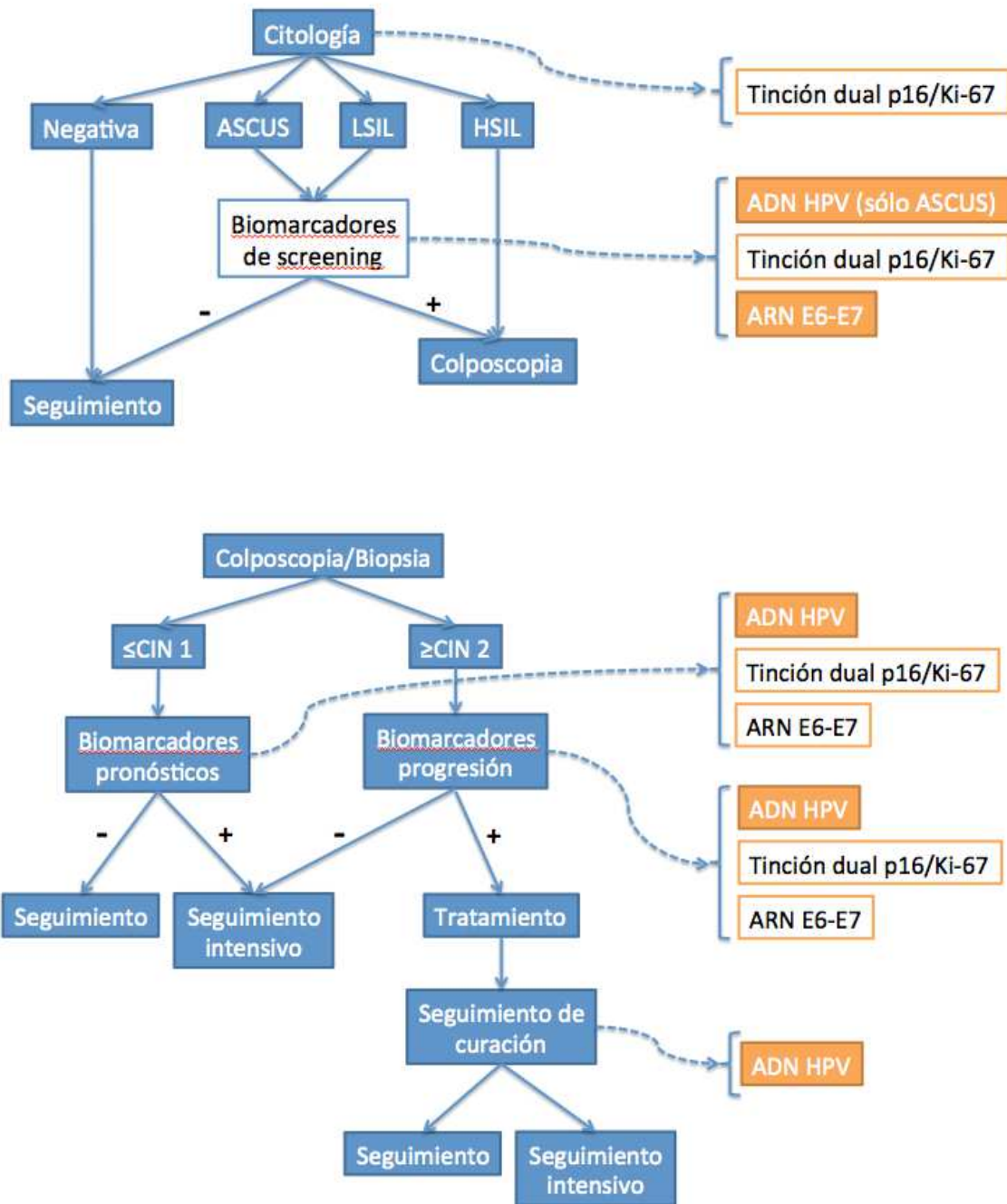
Una doble tinción p16-Ki67 se haya actualmente disponible para el screening del cáncer de cuello. La sensibilidad de este ensayo se sitúa en un 90%, por un 80% de especificidad, lo que supone una diferencia significativa con respecto al uso de la p16 de forma exclusiva.

- Es así como se ha demostrado que el uso de forma conjunta de la citología, el ADN del VPH y la tinción dual p16-Ki67, aumenta la sensibilidad del screening, manteniendo una alta especificidad.
- Otros:
 - MCM 2 y TOP2A: son dos proteínas que se expresan en células con mitosis aberrante. Se ha desarrollado un test basado en un cocktail de anticuerpos que reconocen estas proteínas y que según recientes estudios presenta mayor sensibilidad para detectar lesiones de bajo grado que la p16.
 - MicroARN: son pequeños fragmentos de ARN no codificante que regulan la expresión génica de las células. Se ha visto que su disregulación a la baja puede estar implicada en la progresión del cáncer cervical.

CONCLUSIONES

Muchos marcadores han sido propuestos para el cribado del cáncer de cérvix, habiendo sido analizados muchos de ellos solo en una pequeña fracción de estudios lo que limita su implantación en los programas de screening actuales. Otros, sin embargo, han demostrado su eficacia en múltiples ensayos, como es el caso de la p16 ó el ARN VPH.

Diversas sociedades han tratado de buscarles su lugar en los programas clásicos de screening, pero son necesarios más datos clínicos para saber exactamente de qué forma puede sacarse el mayor partido de los mismos para así mejorar al máximo el diagnóstico de la neoplasia cervical: cuándo deben realizarse; si deben realizarse de forma aislada ó en conjunción con otros marcadores; si son más útiles en el cribado ó en el posterior seguimiento de lesiones ya conocidas, etc.



Diferentes opciones planteadas de empleo de diferentes biomarcadores en el screening del cáncer cervical

Desde la perspectiva de la salud pública, la utilidad potencial de la mayoría de ellos, y en especial de la doble tinción p16-Ki67, consiste en la reducción de procedimientos diagnósticos innecesarios así como de posibles casos de sobre-tratamiento.

No se debe esperar, sin embargo, una reducción significativa de la mortalidad por cáncer de cérvix. Esto se explica con el hecho de que el factor de riesgo

más importante en la actualidad para desarrollar un cáncer cervical es la no participación en un programa regular de cribado, atribuyéndose sólo un 10% de los casos de cáncer a los falsos negativos. Además, la mayor parte de estos falsos negativos se deben a una muestra inadecuada y tan solo un tercio a problemas de detección.

Es por ello que la prioridad debe ser la de asegurar una participación regular y adecuada a los programas de screening, así como esforzarse en realizar correctamente las técnicas citohistológicas; y partiendo de esta sólida base, tratar de mejorar en la medida de lo posible con los nuevos avances el diagnóstico de las lesiones cervicales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray J, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-2917.
2. Whitlock EP, Vesco KK, Eder M. Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*. 2011;155:687-691.
3. Davey E, Barratt A, Irwig L. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet*. 2006;367:122-130.
4. Leinonen MK, Nieminen P, Lönnberg S. Detection rates of precancerous and cancerous cervical lesions within one screening round of primary human papillomavirus DNA testing: prospective randomised trial in Finland. *BMJ*. 2012;345:77-89.
5. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri J. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *International Journal of Cancer*. 2013;132(1):101–108.

6. Tornesello M, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and celular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cáncer. *BioMed Research International*. 2013;20:1-10.
7. Alshenawy HA. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: Potential utility in diagnosis and prognosis. *Pathology Research and Practice*. 2014;207:1-6.
8. Kisser A, Zechmeister-Koss I. A systematic review of p16/Ki-67 immunotesting for triage of low grade cervical cytology. *BJOG*. 2014;10:1-6.
9. Cuschieri K, Wentzensen N. HPV mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiological Biomarkers*. 2008;17(10):2536-2545.
10. Shah AA, Jeffus SK, Zhao Z, Stoler MH, Stelow EB. Adjunct p16INK4a immunohistochemistry aids the detection of high-grade squamous intraepithelial lesions in endocervical curettage specimens. *American Journal for Clinical Pathology*. 2014;141:342-347.
11. Darragh T, Colgan TJ, Cox T, Heller DS, Henry MR, Luff RD et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2012;32:76-115.
12. Tatti SA. *Colposcopia y Patologías del tracto genital inferior en la era de la vacunación*. Buenos Aires: Panamericana; 2008.