

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Médicas
Escuela de Estudios de Postgrado**



VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA P16 INK4A- KI67 EN CITOLOGÍAS ANORMALES DE PACIENTES QUE CONSULTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA

CARLOS ENRIQUE DE JESÙS LÓPEZ SÁNCHEZ

Tesis

**Presentada ante las autoridades de la
Escuela de Estudios de Postgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas
Maestría en Ciencias Médicas con Especialidad en Ginecología Oncológica
Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Médicas con Especialidad en Ginecología Oncológica
Abril 2018**



ESCUELA DE
ESTUDIOS DE
POSTGRADO

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad de San Carlos de Guatemala

PME.OI.075-2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HACE CONSTAR QUE:

El (la) Doctor(a): Carlos Enrique de Jesús López Sánchez

Registro Académico No.: 100021863

Ha presentado, para su EXAMEN PÚBLICO DE TESIS, previo a otorgar el grado de Maestro(a) en Ciencias Médicas con Especialidad en **Ginecología Oncológica**, el trabajo de TESIS VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA P16 INK4A-KI67 EN CITOLOGÍAS ANORMALES DE PACIENTES QUE CONSULTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA

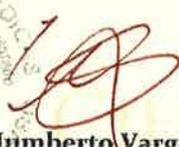
Que fue asesorado: Dr. Eduardo Naufal Gharzouzi Bassila MSc.

Y revisado por: Dr. Alberto García González

Quienes lo avalan y han firmado conformes, por lo que se emite, la ORDEN DE IMPRESIÓN para **abril 2018**

Guatemala, 09 de abril de 2018




Dr. Carlos Humberto Vargas Reyes MSc.

Director

Escuela de Estudios de Postgrado



Dr. Luis Alfredo Ruiz Cruz MSc.

Coordinador General

Programa de Maestrías y Especialidades



/mdvs

2ª. Avenida 12-40, Zona 1, Guatemala, Guatemala

Tels. 2251-5400 / 2251-5409

Correo Electrónico: especialidadesfacmed@gmail.com



LIGA NACIONAL CONTRA EL CÁNCER

INSTITUTO DE CANCEROLOGIA Y HOSPITAL DR. BERNARDO DEL VALLE S.

6a. Avenida 6-58, Zona 11, Guatemala, C. A.

PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 www.ligacancerguate.com



Ciudad de Guatemala 22 de enero de 2018

Doctor
Luis Alfredo Ruiz Cruz
Coordinador General
Programas de Maestrías y Especialidades
Presente

Estimado Dr. Ruiz:

Por este medio informo que he revisado a fondo el informe final de graduación que presenta el Dr. Carlos Enrique Lope Sánchez carne No. 100021863, de la carrera de la maestría en ciencias medicas con especialidad en Ginecología Oncológica, el cual se titula **“VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUIMICA P16 INK4A-KI67 EN CITOLOGIAS ANORMALES DE PACIENTES QUE CONSULTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA DEL INCAN”**

Luego de lo asesorado, hago constar que el Dr. Lope Sánchez, ha incluido las sugerencias dadas para el enriquecimiento del trabajo. Por lo anterior emito el dictamen positivo sobre dicho trabajo y confirmo está listo para pasar a revisión de la unidad de tesis de la escuela de estudios de postgrado de la facultad de Ciencias Medicas.

Atentamente,

Dr. Eduardo Gharzouzi MSc.

Asesor de tesis



LIGA NACIONAL CONTRA EL CÁNCER

INSTITUTO DE CANCEROLOGIA Y HOSPITAL DR. BERNARDO DEL VALLE S.

6a. Avenida 6-58, Zona 11, Guatemala, C. A.

PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 www.ligacancerguate.com



Ciudad de Guatemala 22 de enero de 2018

Doctor
Luis Alfredo Ruiz Cruz
Coordinador General
Programas de Maestrías y Especialidades
Presente

Estimado Dr. Ruiz:

Por este medio informo que he revisado a fondo el informe final de graduación que presenta el Dr. Carlos Enrique Lope Sánchez carne No. 100021863, de la carrera de la maestría en ciencias medicas con especialidad en Ginecología Oncológica, el cual se titula **“VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUIMICA P16 INK4A-KI67 EN CITOLOGIAS ANORMALES DE PACIENTES QUE CONSULTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA DEL INCAN”**

Luego de lo revisado, hago constar que el Dr. Lope Sánchez, ha incluido las sugerencias dadas para el enriquecimiento del trabajo. Por lo anterior emito el dictamen positivo sobre dicho trabajo y confirmo está listo para pasar a revisión de la unidad de tesis de la escuela de estudios de postgrado de la facultad de Ciencias Medicas.

Atentamente,



Dr. Alberto García González

Revisor de tesis

Reg. Personal USA 957035



Guatemala 18 de enero del 2017

Alberto García González, MD, PhD.
Profesor Titular de la Universidad de San Carlos de Guatemala
Coordinador del Centro de Investigaciones Biomédicas.

CERTIFICA QUE:

El estudio titulado **“VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA P16 INK4A-KI67 EN CITOLOGÍAS ANORMALES, DE PACIENTES QUE CONSULTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA DEL INCAN”** ha sido realizado íntegramente por Carlos Enrique de Jesús López Sánchez bajo mi supervisión, como asesor.

Dicho trabajo está concluido y reúne los requisitos para ser defendido públicamente como **TESIS DE MAESTRIA** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Guatemala a 18 de enero del 2017.


Alberto García González, MD, PhD.
Colegiado Activo 7,805
Asesor



A: Luis Alfredo Ruiz Cruz
Coordinador General de Programas Maestrías Especialidades.

De: Dr. Mynor Ivan Gudiel Morales
Unidad de Tesis Escuela de Estudios de Post-grado

Fecha de recepción del trabajo para revisión 20 de marzo de 2018

Fecha de dictamen: 2 de Abril de 2018

Asunto: Revisión de Informe final de:

CARLOS ENRIQUE DE JESUS LOPEZ

Título:

VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUIMICA P16 INK4A- INKA-K167 EN CITOLOGIAS ANORMALES DE PACIENTES QUE CONSUTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA DEL INCAN

Sugerencias de la revisión:

- Autorizar impresión de tesis.


Dr. Mynor Ivan Gudiel Morales
Unidad de Tesis Escuela de Estudios de Post-grado



DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES

En memoria de mis padres Victoria Mariana Sánchez Velásquez de López y Lic. Enrique López Hernández.

A MI ESPOSA

Gina Maritza Guerra de López

A MIS HIJOS

Claudia Maritza, Ana Regina y Enrique Alejandro López Guerra.

A LOS DOCTORES

Dr. Hesler Morales y Dr. Walter Guerra patólogos del INCAN.

Erick Soch y Orlando Rodas por su cooperación en el presente trabajo.

Al Dr. Alberto García González con especial deferencia, por su valiosa colaboración.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

AL INSTITUTO DE CANCEROLOGÍA INCAN- GUATEMALA

HOSPITAL CLINIC DE BARCELONA ESPAÑA

En especial al Dr. Jaume Ordi.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II. ANTECEDENTES	3
CAPITULO III. OBJETIVOS	28
CAPITULO IV. HIPOTESIS	29
CAPITULO V. MATERIAL Y MÉTODOS	30
CAPITULO VI. RESULTADOS	34
CAPITULO VII. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
7.1 CONCLUSIONES	46
7.2 RECOMENDACIONES	47
CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48
CAPITULO IX. ANEXOS	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráficas	Pág.
Gráfica 1. Incidencia y mortalidad de los casos de cáncer a nivel mundial año 2012	6
Gráfica 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix en países en desarrollo 2012.	7
Gráfica 3. Incidencia y mortalidad a nivel mundial por cáncer de cérvix por regiones 2012	8
Gráfica 4. Incidencia y mortalidad a nivel mundial por cáncer de cérvix en Latino América 2012	9
Gráfica 5. Localizaciones (CIE-10) más frecuentes en las mujeres con cáncer registradas durante el año 2014, INCAN-Guatemala	10
Gráfica 6. Tendencias del cáncer de cérvix en las mujeres registradas durante el año 2014, INCAN-Guatemala	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pág.
Figura 1. Aspectos biológicos del virus del papiloma humano	13
Figura 2. Prueba de doble tinción P16 y Ki67 en citología de exfoliadas cervicales	21
Figura 3. Test dual P16/Ki67 en citología cervical	22
Figura 4. Muestras histológicas del cérvix con prueba P16INK4	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Pág.
Tabla 1. Estudios comparativos entre métodos de detección de virus del papiloma huma de alto riesgo según grupos de investigación	18
Tabla 2. Datos generales de las pacientes que aceptaron participar en la unidad de colposcopia INCAN periodo 2012 y 2013	35
Tabla 3. Resultados de estudios convencionales de citología de exfoliado, biopsias y cono cervical en pacientes que aceptaron participar Unidad de colposcopia INCAN.	37
Tabla 4. Impresión colposcópica de las pacientes que aceptaron participar en el estudio, unidad de colposcopia INCAN	38
Tabla 5. Resultados de citología con tinción convencional según diagnóstico final de histología H y E.	39
Tabla 6. Interpretación de citologías convencional de cérvix de pacientes que se les realizó Cono	40
Tabla 7. Resultados de citología con doble tinción según diagnostico final de histología con Tinción P16.	41
Tabla 8. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos según interpretación de prueba de citología tinción convencional y con doble tinción.	42
Tabla 9. Índice de concordancia inter observador según tipo de muestra interpretada.	43
Tabla 10. Índice de correlación entre los tipos de citología con respecto a histología e impresión colposcópica según tipo de lesiones cervicales.	44

RESUMEN

EL cáncer de cérvix es una enfermedad altamente prevenible a través de diversos métodos de detección temprana. La tinción de las proteínas P16 y Ki67 ocurre en células de cérvix transformadas; aumenta la especificidad de la citología cervical en lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer invasivo.

OBJETIVO: Evaluar la correlación entre la interpretación de la citología con doble tinción P16 y Ki67, la impresión colposcópica y la histología final, según tipos de lesiones cervicales de pacientes en el Instituto de Cancerología durante el periodo 2012 y 2013.

METODOLOGÍA: Se recolectaron muestras de exfoliado y biopsias de cérvix de 200 pacientes, las cuales fueron procesadas con inmunotinción según instrucciones del fabricante. Fueron excluidas 24 muestras por mala calidad. Tres patólogos independientes interpretaron las muestras.

RESULTADOS: Se evaluaron resultados de 176 pacientes. La sensibilidad y especificidad de la citología de exfoliado cervical (CEC) con doble tinción fue de 76.64% (IC 95% (68.15 - 85.12)) y 94.20% (IC 95% (87.96 - 100.0)), respectivamente. Valor Predictivo Positivo y Negativo fue de 95.35% y 72.22 % respectivamente. El índice de acuerdos en la interpretación de citología fue 0.56 a 0.72, biopsia 0.82 a 0.87 y cono cervical 0.86 a 0.87. Los índices de Correlación Tau b de Kendall entre CEC con doble tinción y colposcopia fue de 0.489 y entre CEC con doble tinción e histología final de biopsia o cono cervical fue de 0.684 con $p < 0.001$.

CONCLUSIONES: Los índices de especificidad y de correlación Tau b Kendall de CEC con doble tinción fueron mayores que la citología convencional. La aplicación de esta prueba podría evaluarse en series mayores de pacientes que sean sometidas a conización por disociación de citología respecto a histología.

Palabras claves: Tinción doble P16 y Ki67, Citología de exfoliado cervical, Impresión Colposcópica, Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo y Alto Grado y Carcinoma Invasivo.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En Guatemala se ha reportado la tasa de incidencia del cáncer de cérvix es de 39.6 por 100,000 habitantes y la mortalidad de 16.8 por 100,000 muertes reportadas. **(1)**

Las lesiones preinvasivas del cérvix tienen el potencial de producir cáncer invasivo, siendo la tasa de progresión del 1% para Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y de 34% para Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG). **(2)**

Uno de los esfuerzos de salud pública para disminuir los índices tanto de incidencia como mortalidad en países en desarrollo o en vías de desarrollo, han sido las campañas que ofrecen las pruebas de tamizaje por medio de citología exfoliativa del cérvix conocido como Papanicolaou. Siendo esta una prueba de tamizaje con una sensibilidad del 70 % y especificidad del 60%. **(3)**

Para la detección de las lesiones preinvasivas del cérvix se utiliza la citología convencional como primer escalón. Al tener resultados anormales se confirma o descarta el diagnóstico con el estudio de histología de biopsia cervical, obtenida bajo visión colposcópica. **(4)**

Se han reportado discrepancias entre resultado de citología e histología; de los cuales el 67% es por error en la interpretación. **(5)**

Se han utilizado biomarcadores que identifican células que estén transformándose o sea que estén en proceso de neoplasia. Las células transformadas están afectadas por virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH AR), detectando con mayor sensibilidad y especificidad a LEIBG y LEIAG. El Test dual P16 Ki67 en la citología tiene sensibilidad del 95,1% y especificidad de 82%. **(6)**

La interpretación de la citología de los exfoliados cervicales, puede estar afectada por la observación de imágenes celulares dudosas. La especificidad de la citología tradicional en algunos casos no permite identificar o discriminar los casos verdaderos sanos. La discrepancia o falta de correlación entre la citología convencional con respecto a la colposcopia y/o histología, obliga al clínico a realizar conizaciones cervicales que a veces son innecesarias, debido a que los resultados finales en pieza final no evidencian lesiones malignas.

El presente estudio evaluó la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia Kappa ponderado de la interpretación de las citologías cervicales e histologías por los tres patólogos

independientes con programa de Epidat 3. Se tomó como prueba de Gold estándar a la Histología de biopsia del cérvix o en algunos casos pieza de cono cervical. Así mismo se midió el índice de Correlación entre los resultados de Citología con el test dual de tinción P16 y Ki67 con la impresión Colposcópica y resultados de Histología aplicando la prueba de Tau b de Kendall, se utilizó el paquete estadístico de SPSS 20.

El estudio es descriptivo, analítico de correlación, en donde participaron 3 instituciones: Facultad de ciencias Médicas (laboratorio de Investigaciones Biomédicas), Instituto de Cancerología INCAN (Unidades de Colposcopia y Patología) y Departamento de Patología del Hospital Clinic de Barcelona, España.

Las muestras se obtuvieron de 200 pacientes durante 22 meses. Las pacientes estuvieron de acuerdo en participar comprendiendo y firmando o colocando la huella digital en el consentimiento informado. A cada paciente se le tomó un frote cervical, y posteriormente una colposcopia y biopsia cervical. Las pruebas fueron procesadas en Guatemala y en España. Salieron del estudio 24 muestras por ser de mala calidad.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

El cáncer de cérvix es un problema de salud pública en países en vía de desarrollo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 casos nuevos en el mundo. Es responsable de 190,000 muertes anuales, de los cuales el 78% ocurre en países en vías de desarrollo. **(1)**

Los estudios sobre la epidemiología del cáncer de cérvix han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual. Diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo tales como tabaquismo, edad temprana en el inicio de relaciones sexuales, número de parejas, infecciones bacterianas, etc. Sin embargo, en múltiples estudios han concluido que el factor definitivo en la etiología del cáncer de cérvix, es debido a la infección del cérvix por diversos tipos de virus del papiloma humano, denominados de alto riesgo u oncogénicos (HPV Hr- por sus siglas en inglés). **(7)**

El virus de papiloma humano (VPH) puede infectar epitelios y mucosas del ser humano y se clasifican de acuerdo con homologías en su material genético. En la actualidad se reconocen más de 100 tipos diferentes. Estudios reportan que la presencia del material genético del virus (ADN) se encuentra entre el 95% al 99.7% de los casos de cáncer de cérvix. **(8)**

La historia natural del cáncer de cérvix establece que algunas lesiones previas a cáncer de cérvix, conocidas como preinvasivas, evolucionan hasta cáncer invasivo. Las cuales las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 1 y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) o NIC 2-3, tienen una tasa de progresión a cáncer invasor de 1% y 34% respectivamente. **(2)**

Para la detección de las lesiones preinvasivas del cérvix se utiliza la citología convencional como primer escalón. Al tener resultados anormales se confirma o descarta el diagnóstico con el estudio de histología de biopsia, obtenida bajo visión colposcópica. **(4)**

La citología es una prueba de tamizaje para la detección de lesiones cervicales, cuya sensibilidad y especificidad para LEIAG es del 70 y 60% respectivamente. **(3)**

El procedimiento de prueba de citología con la técnica de Papanicolaou tiene algunas limitaciones, con tasas de falsos negativos para lesiones premalignas y para cáncer invasor de 15 y 50% respectivamente, y 30% de falsos positivos para ambos grupos de lesiones. **(9)**

Los criterios secundarios en la interpretación de las pruebas de citología con tinción Papanicolaou son subjetivos y están sujetos a una marcada variabilidad inter e intraobservador. Por esta razón, tiene una relativa baja sensibilidad para la neoplasia de cuello uterino en una sola muestra; tan bajo como 66% de sensibilidad para las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. **(10)**

La colposcopia es un método complementario de apreciación, en el cual se utiliza un colposcopio que amplifica la imagen del cérvix. Se toma una o más biopsias en las áreas que sean sospechosas las cuales son procesadas para estudio histológico. Al tener el resultado de Histología, éste se compara con el resultado de la citología y se determina si hay o no correlación en el diagnóstico de lesión cervical.**(11)**

La colposcopia, en estudios de concordancia inter observador, tiene una sensibilidad y especificidad del 61.1% y 94.4% respectivamente, para diferenciar entre LEIBG y LEIAG. Tiene un índice de Kappa de 0.843 en LEIAG. **(12)**

La interpretación de la citología de los exfoliados cervicales, puede estar afectado por la observación de imágenes celulares dudosas. En algunos casos no permite identificar o discriminar los casos verdaderos sanos. La discrepancia o falta de correlación entre la citología convencional con respecto a la colposcopia y/o histología, obliga al clínico a realizar conizaciones cervicales que a veces resultan ser innecesarias, debido a que los resultados finales de cono cervical son negativos o sea que no se evidenció lesiones malignas.

En un estudio realizado en 84,244 pacientes de Columbia Británica, se evaluó la correlación diagnóstica de la citología convencional, colposcopia y la histología de biopsia cervical. La correlación de la impresión o apreciación colposcópica con citología fue mayor del 90% y se sobreestimó en el 8.3%. La correlación del resultado de citología con el de histología fue del 82%. Concluye el estudio que tanto la citología como colposcopia tienen alta sensibilidad pero baja a moderada especificidad.**(13)**

En otro estudio realizado en los años 2004 al 2006, en el Hospital Universitario de North Staffordshire, se evidenció que hubo discrepancia de citología con colposcopia en 10% , y discrepancia de la citología con histología en 35%.**(14)**

En la unidad de colposcopia del Instituto de Cancerología, INCAN de Guatemala, durante el año 2016 se atendieron 683 pacientes, efectuándoles colposcopia. De este grupo, se realizó conización tipo Lletz a 38 casos por indicación de disociación, discrepancia o no relación entre los resultado de citología con respecto a la histología. De esta disociación o discrepancia en los informes de citología convencional, 27 casos indican que LEIAG y en los resultados de histología de la biopsia, 15 casos fueron negativas; es decir que no se encontraron lesiones preinvasivas. (Fuente: Libro de registros de colposcopia INCAN).

Recientemente en el año 2010, se creó una prueba de inmunohistoquímica, que se aplica a las muestras de exfoliados cervicales o citologías, utilizando dos diferentes marcadores (P16 y Ki67) al mismo tiempo, conocido como Test de doble tinción con marcadores, el cual identifica a las células transformadas y afectadas por el VPH de alto riesgo . **(15)** La identificación de la proteína p16, que es un biomarcador para lesiones neoplásicas cervicales inducidas por el VPH de alto riesgo, que es un producto del gen supresor de tumores CDKN2A que se encarga de actuar como un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6, que a su vez inhiben la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb)r, la cual inhibe el ciclo celular al mantener unidos e inactivos los factores de control de la división celular, impidiendo de esta forma que el ciclo celular progrese desde la fase G1 a la fase S.

El otro marcador es el Ki67 que identifica los núcleos de células transformadas cuya proliferación fue alterada por HPV de alto riesgo. La ventaja con respecto a la captura híbrida y otras pruebas de detección del ADN del HPV, es que estas últimas identifican la presencia del HPV de Alto o Bajo riesgo, sin poder evidenciar a las células que están transformadas, como sí lo puede detectar la doble tinción P16 y Ki67. Además, tiene mayor especificidad para lesiones preinvasivas del cérvix que las pruebas de detección del ADN del HPV. **(16)**

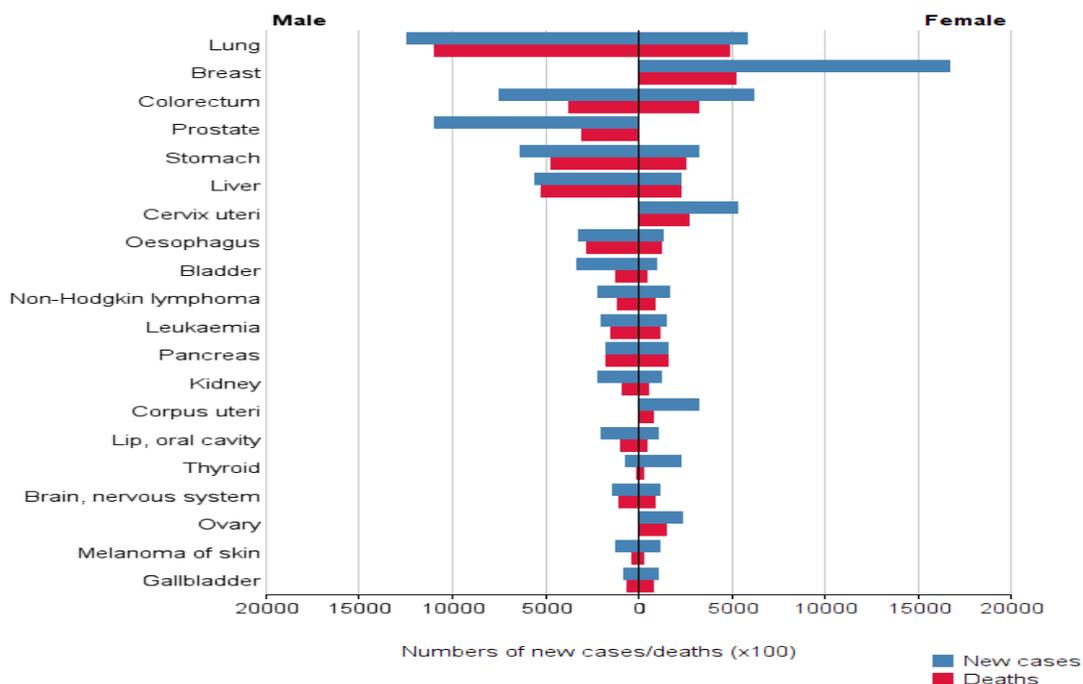
Estos biomarcadores identifican células que estén transformándose o sea que estén en proceso de neoplasia, detectando con mayor sensibilidad y especificidad LIEBG y LEIAG. El Test dual P16 Ki67 en la citología tiene Sensibilidad del 95,1% y especificidad de 82%. **(6)**

2.1. Epidemiología del cáncer del cérvix en países en vía de desarrollo

El cáncer de cérvix (CaCu) a nivel mundial se encuentra dentro de las primeras diez causas de incidencia y mortalidad durante el año 2012 según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC). (17) (Gráfica 1) En los países en desarrollo, el CaCu ocupa el segundo lugar en producir nuevos casos y mortalidad (Gráfica 2), causando el 85% del total de casos de muertes por cáncer cervical. Es responsable del 15% del total de cánceres en la mujer.

Gráfica 1

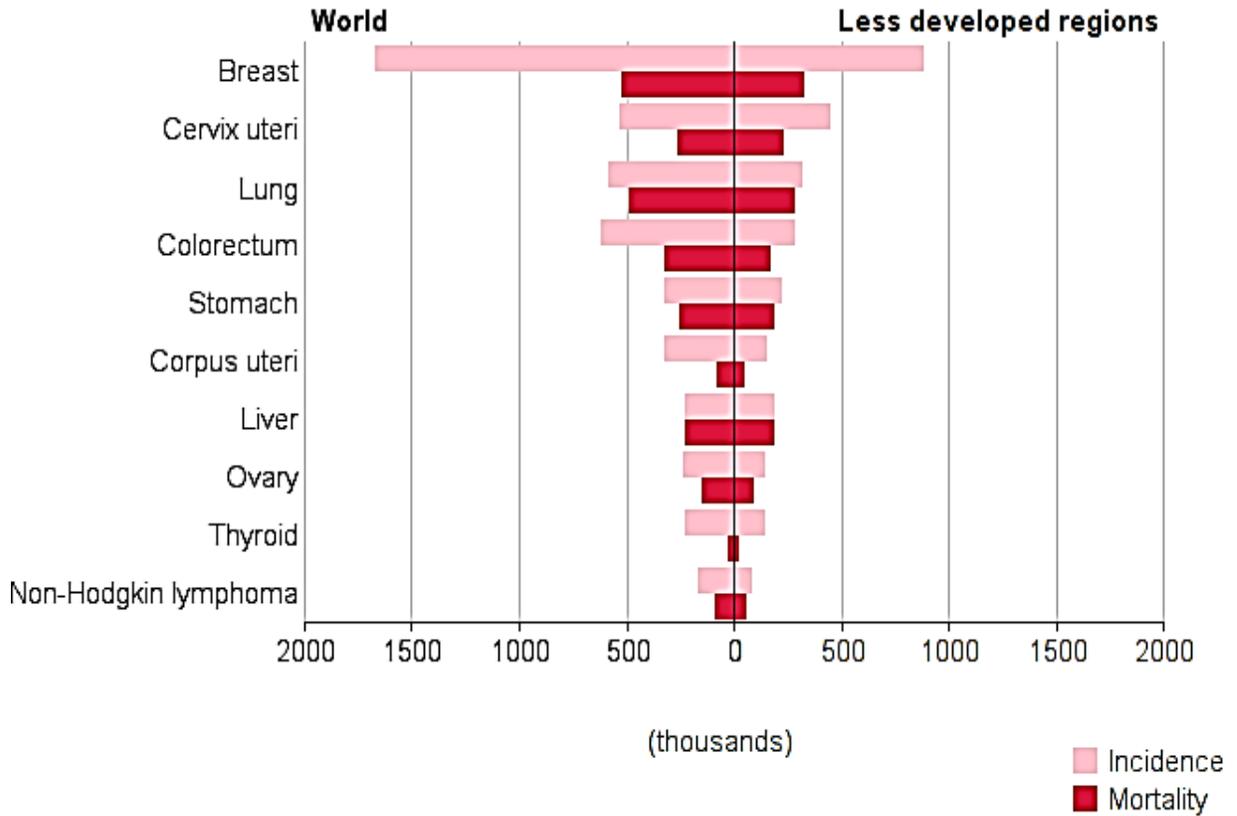
Incidencia y mortalidad de los casos de cáncer a nivel mundial año 2012



Fuente: GLOBOCAN 2012

Gráfica 2

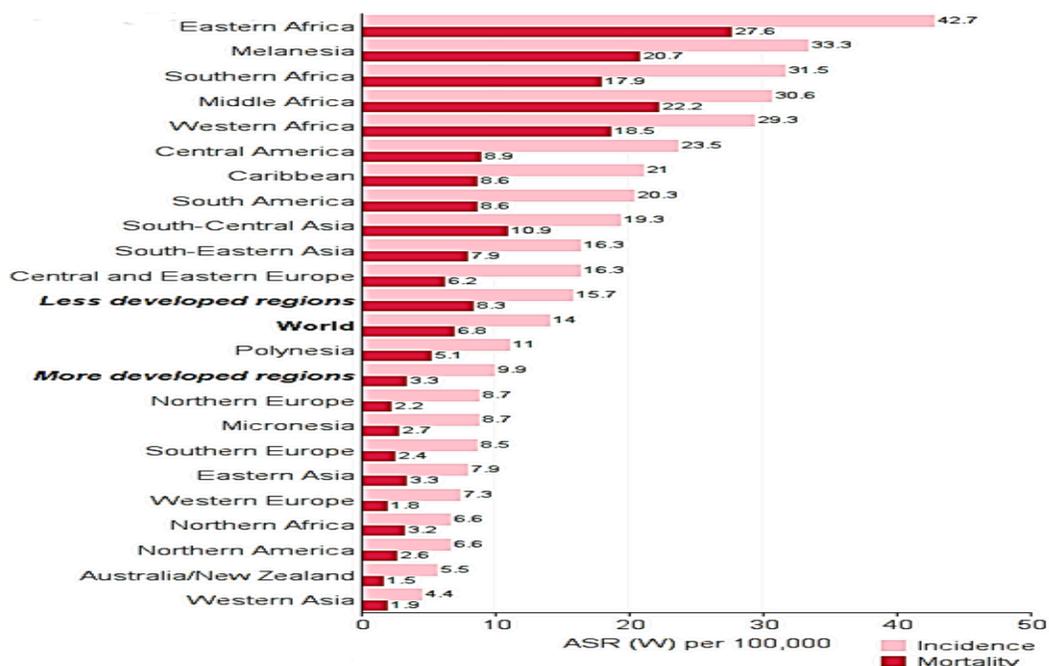
Incidencia y Mortalidad del cáncer de cérvix en países en desarrollo 2012



Fuente: GLOBOCAN 2012

A nivel mundial América Central ocupa la séptima posición en incidencia y sexto lugar en mortalidad (22.2 y 11.1 por 100,000 habitantes respectivamente) por CaCu. **(18) (Gráfica 3)**

Gráfica 3
Incidencia y mortalidad a nivel mundial por cáncer cérvix
por regiones 2012



Fuente: GLOBOCAN 2012

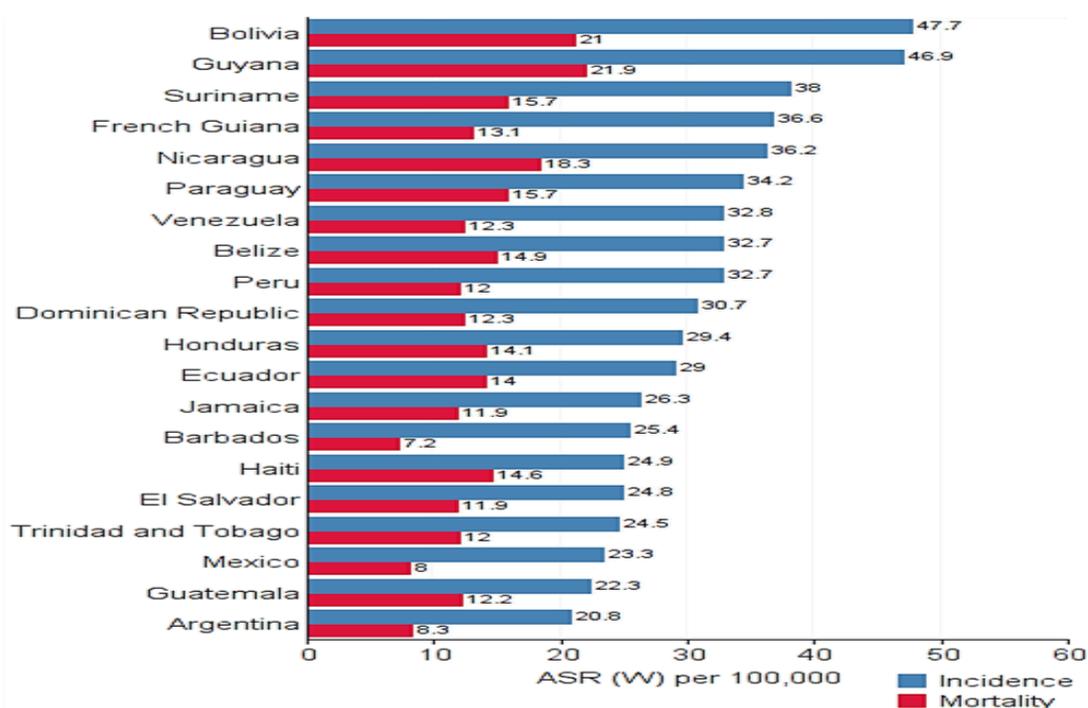
En los países en desarrollo, el CaCu ha cedido su lugar como el principal tipo de cáncer, al cáncer de mama. Sólo en el África subsahariana, América Central, Asia sur central y Melanesia sigue siendo el principal cáncer que afectan a las mujeres. **(19)**

2.2. Epidemiología del cáncer del cérvix en Latino América

La alta incidencia de CaCu en la región de Latino América se observa en las estadísticas mundiales. Así mismo las tendencias en los países en desarrollo no han modificado su incidencia a lo largo de los años. Se reconoce la dificultad en recaudar los datos epidemiológicos de esta enfermedad debido a que el control y registro de algunos países es deficiente.

Según los datos obtenidos y publicados por el Globocan 2012 se observa que los países Bolivia, Guyana, Nicaragua tienen las más altas tasas de incidencia en Latino América. **(17)** **(Gráfica 4)** Guatemala tiene una incidencia similar a México, Honduras, El Salvador y Perú, con una tasa aproximada es de 39 por 100,000. **(15)**

Gráfica 4
Incidencia y mortalidad a nivel mundial por cáncer cérvix
en Latino América 2012

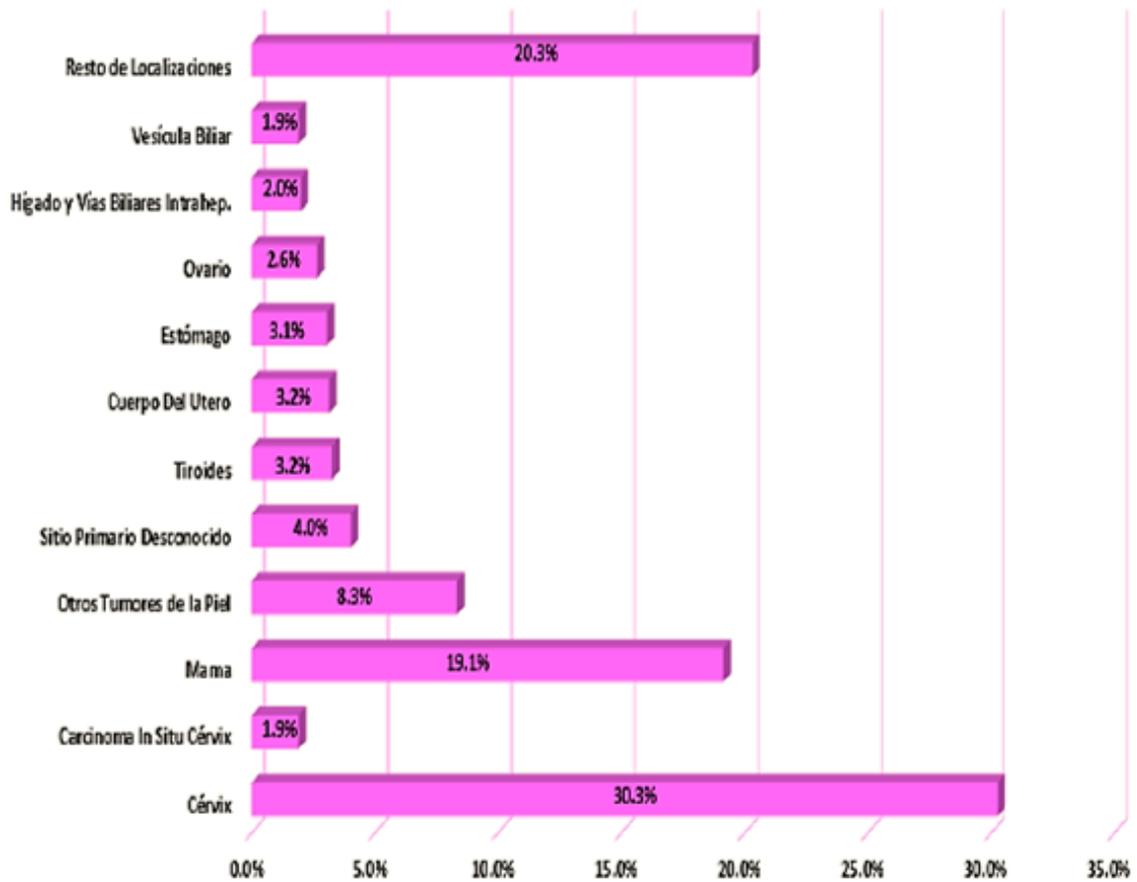


Fuente: GLOBOCAN 2012

2.3. Informe epidemiológico del cáncer del cérvix en Guatemala

Según los datos presentados por el Registro Hospitalario de Cáncer del INCAN-Guatemala para el 2014, la primera causa de incidencia es el cáncer de cérvix invasivo (30.3%). **(Gráfica 5)** **(20)**

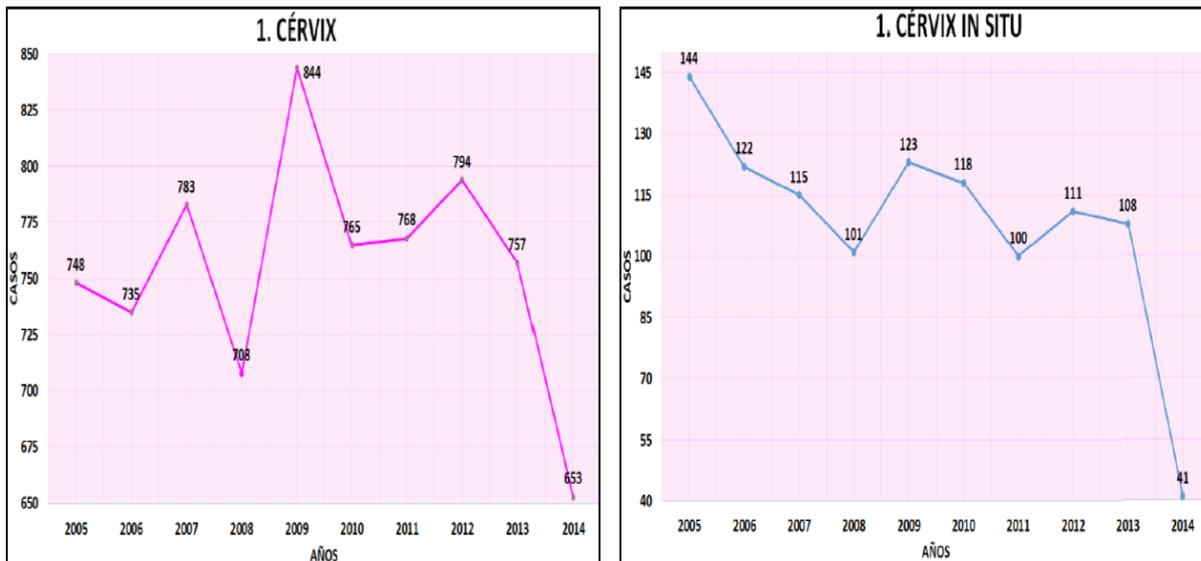
Gráfica 5
Localizaciones (CIE-10) más frecuentes en las mujeres con cáncer
Registrados durante el año 2014, INCAN-Guatemala



Fuente: Registro de Cáncer del INCAN-Guatemala

Durante los últimos diez años se observó una incidencia promedio de 767 casos anuales, aunque para el año 2014 hubo una reducción de casos nuevos de cáncer invasor (653 casos) y cáncer de cérvix in situ (41 casos). **(Gráfica 6) (20)**

Gráfica 6
Tendencia del cáncer de cérvix en las mujeres
Registradas durante el año 2014, INCAN-Guatemala



Fuente: Registro de Cáncer del INCAN-Guatemala

2.4. Biología molecular del virus del papiloma humano (VPH)

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae, puede infectar y replicarse en el núcleo de células epiteliales (piel y mucosas). Posee una cápside proteica de simetría icosaédrica y en su interior el material genético bajo la forma de ADN doble cadena circular; carece de envoltura (virus desnudo). Los genomas de los distintos VPH evidencian una gran similitud en su organización. Poseen nueve marcos de lectura abiertos (en inglés “open reading frames, ORFs”) diferentes; cada uno de ellos representa un gen viral que codifica una proteína responsable de características biológicas tales como el rango de hospedador, el tropismo tisular y la patogenia de la infección. El genoma puede ser dividido en tres regiones. La región larga de control (LCR) o región no codificadora, representa el 15% del genoma viral y contiene el origen de la replicación, algunas secuencias promotoras, estimuladoras y represoras de la expresión de genes y de la replicación del DNA. **(21) (Figura 1)**

La región temprana (E, por early) representa alrededor del 45% del genoma viral y contiene al menos 7 genes. Codifica proteínas involucradas en la transcripción viral (E2), la replicación del DNA viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7) y, posiblemente, algunos pasos tardíos del ciclo viral (E4). Los genes E6 y E7 son considerados oncogenes virales por su capacidad transformante. Las proteínas que codifican (oncoproteínas E6 y E7) en los VPH de alto riesgo pueden unirse con las proteínas celulares supresoras tumorales p53 y pRB, respectivamente, alterando la proliferación celular y la apoptosis. **(21) (Figura 1)**

La región tardía (L, por late) comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, esenciales para la replicación viral productiva. L1 codifica para la proteína principal de la cápside; es un gen altamente conservado en los virus Papiloma de distintas especies y entre los distintos tipos de VPH, razón por la cual es uno de los blancos preferidos para el diagnóstico molecular; mientras que L2 codifica para la proteína menor de la cápside y muestra marcadas diferencias aun entre los tipos que infectan a una misma especie. **(21) (Figura 1)**

Los Virus del Papiloma Humano (VPH), son muy diversos, y probablemente se producen en la mayoría de los mamíferos y aves. Cientos de tipos VPH se han detectado en los seres humanos, siendo los de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 89) y los de alto riesgo (16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) que pueden producir cáncer en el ser humano. Luego de tres décadas de investigación y la dedicación de un gran número de especialistas, se han obtenido las secuenciaciones de miles de VPH aislados. Existe una base de datos que nos permite proponer un sistema de clasificación que probablemente será más estable, mientras que se encuentran más tipos de VPH. **(21, 22) (Figura 1)**

Figura 1
Aspectos Biológicos del Virus del Papiloma Humano

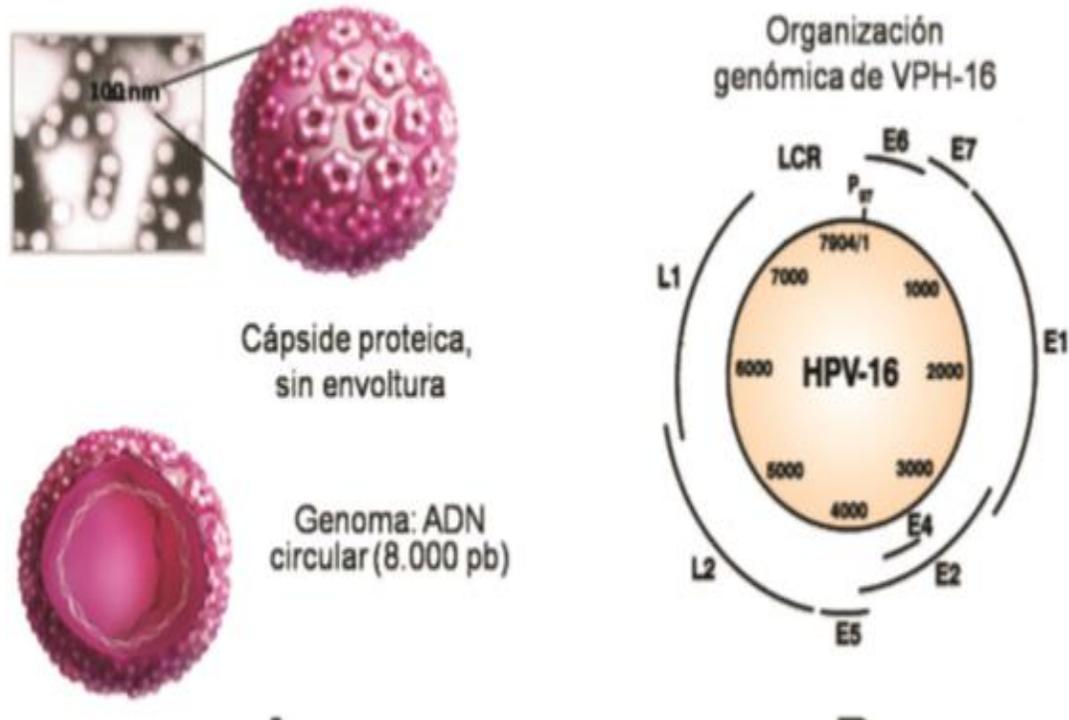


Figura 1. Morfología esférica de la partícula de VPH con sus capsómeros y el ADN en el interior.

2.4.1. Etiopatogenia

Los tres genes del VPH que poseen capacidad de la estimulación de proliferación son: E5, E6 y E7. El gen E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección. Estimula a la célula en el crecimiento mediante la formación de un complejo con el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. **(23)**

También se demostró que E5 ayuda a prevenir la apoptosis después del daño de ADN. Sin embargo, en células infectadas por el VPH en lesiones que progresan a cáncer cervical, el ADN viral en estado episomal, con frecuencia al integrarse en la célula huésped de ADN la codificación de la secuencia del E5 es lesionada. **(24)**

Por lo tanto, la proteína E5 no es obligatoria para desencadenar la carcinogénesis mediada por el VPH. Un papel más significativo para la transformación maligna de la célula son las proteínas y sus genes E6 y E7, expresadas en tejidos o tumores malignos, que son capaces de immortalizar a las células humanas transformadas; es decir no son obligadas a entrar a apoptosis. **(24)**

Varias funciones se han descrito para las proteínas de los genes del VPH E6 y E7. Las primeras observaciones revelaron que E6 interactúa con p53 y E7 interactúa con RB para bloquear la actividad de estos supresores de tumores. De hecho, algunas de las funciones importantes de la proteína E6 se originan a partir de su interacción con la P53 para posteriormente degradarla así como a la proteína BAK denominada pro apoptótica lo que se traduce en la resistencia a la apoptosis y el aumento de la inestabilidad cromosómica. **(25)**

Además, la activación de telomerasa y el postulado de inhibición de la degradación de las quinasas de la familia SRC por medio de la oncoproteína E6 parecen cumplir funciones importantes en la estimulación del crecimiento. Se ha especulado que la estabilización de las formas activadas de miembros específicos de la familia de las cinasas SRC podría contribuir a la transformación del VPH. **(26)**

La cinasa INK4A dependiente de ciclina inhibidora conocida como p16 parece contrarrestar estas funciones. Sin embargo la E7 interactúa y degrada la RB, liberando posteriormente el factor de transcripción E2FdeRBe que inhibe al gen INK4A. **(10)**

La alta actividad de E2F podría conducir a la apoptosis en células que expresen el E7. Sin embargo la E7 puede estimularla fase S cuando a su vez estimula los genes de ciclina A y ciclina E. (Zerfass, 1995) igual y parece bloquear la función de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina WAF1 (también conocido como CIP1 y p21) y KIP1 (también conocido como p27). **(25)**

La E6 parece verse afectada por INK4A, mientras que E7 no está afectada por esta inhibición de la activación directa de las ciclinas A y E. La E6, a su vez, evita que la apoptosis inducida por E7 al degradar la inducción de apoptosis de las proteínas p53 y BAK. **(25)**

Actualmente no se ha observado un papel en la conversión maligna de la célula con respecto a las proteínas tempranas del VPH (como son E1, E2 y E4). Las L1 y L2 son dos proteínas estructurales, que conforman la cápside viral, que no se expresan en las células precancerosas ni malignas, aunque han sido importantes para el desarrollo de vacunas.

El sistema inmune es importante en el control de Infecciones de VPH.(27)

Hay pruebas de la participación de la inmunidad celular por medio de linfocitos T-ayudadores así como de la inmunidad Humoral en las células en regresión de las lesiones premalignas. (28)

El escape a la vigilancia inmunológica surge como un paso importante en la progresión de los tumores vinculados al VPH. Además hay otros dos modos de control en la proliferación de células que están infectadas por el VPH para protegerlos en contra de la transformación maligna: una consiste en la inhibición de la función oncogénica viral, y el otro consiste en control de la transcripción de los genes virales. (25)

La proteína del VPH llamada E6 está compuesta por 150 aminoácidos y por dos dedos de Zinc que representan regiones esenciales para su función. La proteína E6 afecta las células epiteliales en el humano, actúa junto con el factor activado Ras transformando a las células. La actividad más relevante de la proteína E6 es la degradación de p53 a través de la unión de la ubiquitinligasa, dejando a la célula a merced del daño del ADN. Otra actividad relevante es su función como factor de transcripción que estimula a la telomerasa, factor estimulador del endotelio vascular, fibronectina y del oncogen c-Myc.

La proteína E7 afecta la regulación de la proliferación celular, interactuando con proteínas reguladoras, especialmente en el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S. Además se asocia con las desacetilasas de histonas, factores de transcripción del tipo AP1, la proteína de interacción con la caja TATA, diferentes ciclinas y con cinasas dependientes de ciclinas conocidas como CDK. La proteína E7 al igual que la proteína E6 es expresado durante el proceso de transformación maligna de la célula. (26)

En las líneas celulares que han sido transfectadas por el ADN de E6 del HPV, el gen CDKN2A, que codifica al INK4A, es normalmente inactivado por metilación, mutación o eliminación. INK4A inactiva a los complejos de la ciclina D1-CDK4 ó a la ciclina D1-CDK6, lo que impide la expresión de ciclina E y por tanto la progresión a través del celular ciclo. La interrupción o inhibición constante del gen CDKN2A en las células inmortaliza a la célula, induciendo la mitosis o división celular. (26)

La expresión del gen E7 puede estimular directamente a las ciclinas A y E a través de su interacción con la pRb. En las células que se inmortalizan por E6 y E7, el gen CDKN2A se mantiene intacto. (27)

2.5. Citologías

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda tres pruebas de cribado para la detección temprana de CaCu (Cáncer Cervico Uterino) : 1) la citología convencional (Papanicolaou), 2) inspección visual con ácido acético (IVAA) y 3) pruebas de detección del VPH, con el objetivo de prevenir la morbilidad y mortalidad del CaCu, de manera fácil y accesible. **(29,30)**

La incidencia de CaCu en muchos países ha disminuido cuando hay acceso a centros de asistencia en salud y se les practica el frote cervical para estudio de citología exfoliativa conocido como Papanicolaou (PAP), para detectar lesiones precursoras de CaCu. Sin embargo, en Estados Unidos de América y Europa aún es la segunda causa de cáncer en mujeres entre los 22 y 44 años de edad. El 7% de resultados de citología son anormales, los cuales requieren de la referencia a colposcopia para realizar la biopsia dirigida. **(31)**

El PAP tiene algunas limitaciones. La tasa de falsos negativos de lesiones pre malignas se encuentra entre 15% y 50%, mientras que el 30% son falsos positivos.**(32)**

2.6 Pruebas de ADN del VPH

La Sociedad Americana del Cáncer, la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical y la Sociedad Americana de Patología Clínica recomiendan el uso de la prueba del ADN del VPH AR en pacientes entre 30 y 65 años cada 5 años. **(33)** La persistencia de los VPH AR son la causa del CaCu, especialmente los tipos 16 y 18 que están involucrados en el 70% de los casos. **(32)**

En programas de tamizaje de CaCu, la detección de VPH puede realizarse mediante pruebas directas que permiten la identificación del genoma del VPH-AR, mediante la amplificación de un fragmento de ADN viral, con o sin genotipificación o mediante la detección

de ARNm. Las primeras identifican de manera directa el ADN de algunos de los 13 tipos de VPH que son considerados carcinogénicos sin realizar amplificación previa del ADN. Las segundas amplifican un fragmento del ADN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener millones de copias del mismo tanto de manera convencional como en tiempo real. Las pruebas de genotipificación permiten identificar los tipos virales de manera específica (usualmente el VPH 16 y 18) y las de ARNm identifican la expresión de los genes de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. **(29)**

Las pruebas de ADN del VPH AR han sido desarrolladas para aumentar la sensibilidad en la búsqueda de pacientes con lesiones cervicales. Las pruebas desarrolladas hasta ahora para ello son: Captura híbrida 2 (HC 2), Linnear Array, Cobas, Seeplex HPV4A, Aptima HPV, Pre Tect HPV Proofer, Real Time Abbott, y PCR Amplicor. **(29, 34)**

La HC2 está aprobada por la FDA (Food And Drug Administration) desarrollada por Quiagen, cuyo principio es amplificar hibridación y por lumniscencia detecta la presencia de VPH AR y de bajo riesgo; sin embargo no genotipifica ni distingue la coinfección múltiple. **(29, 34)**

En 2011 Cobas fue también aprobado por la FDA; La prueba del VPH Cobas 4800 realiza la extracción de ADN, amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) y detecta en tiempo real de una manera automatizada. Se puede distinguir rápidamente VPH16/18 de otros 12 tipos VPH AR. El Seeplex HPV4A es un multiplex PCR automatizado al igual que Cobas. **(29, 34)**

El Gen-Probe Aptima HPV se basa en la captura y amplificación mediada por transcripción, y la protección de la hibridación para la detección de la expresión del ARNm del gen viral E7 de 14 tipos de VPH AR. **(29, 34)**

El ensayo PreTect VPH Proofer (Norchip) se realizó por TDL. Es un PCR multiplex de amplificación basada la secuencia en tiempo real del gen viral E6/E7RNAm expresadas por cinco tipos de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, y 45) utilizando conjuntos de cebadores específicos. **(29, 34)**

El Real Time Abbott HPVHR assay (Abbott) es una prueba de PCR multiplex de tipo cualitativo en tiempo real, que también identifica específicamente el VPH 16 y VPH18,

mientras que al mismo tiempo permite detectar el resto de los tipos de VPH AR :31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. **(35)**

La prueba de tiempo real y cuantificación por PCRq, implica la preparación automatizada de muestras y extracción de ADN combinado con PCR en tiempo real. Esta tecnología detecta y cuantifica 17 diferentes tipos de VPH, incluyendo los tipos de que se consideran tipos de alto riesgo en HC 2, y los de bajo riesgo, es decir tipos 6/11, 16,18,31,33,35, 39,45,51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67 y 68, descrito por Micalessi et. al.**(36)**

Como se observa en la tabla 1 diversos grupos de investigación determinaron la sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos de detección del VPH según resultado de citología y biopsia. Los dos métodos con mejor sensibilidad y especificidad son captura híbrida de segunda generación y Cobas. Las pruebas de HPV presentaron mayor sensibilidad y especificidad en los casos de pacientes con resultados de citología y biopsias con lesiones NIC 2 y 3 o LEIAG. **(37)**

TABLA 1
Estudios comparativos entre métodos de detección de virus del papiloma humano de alto riesgo según grupos de investigación

Grupo de Investigación	Nº de muestras	Citología/ Biopsia	Método de detección VPH AR	Sensibilidad %	Especificidad %
Szarewski A. et al. (33)	583	NIC2(359) + NIC3(224)	HC 2	96.3	19.3
			Cobas	95.2	24.0
			PreTect HPV	74.1	70.8
			Proofer		
			AptimaHPV	95.3	28.8
			Gene Probe		
			Abbott Real Time	93.3	27.3
			BD HPV	95.0	24.2

Luu H. et al. (35) Meta análisis	22,417	ASCUS/LEIB	PCR- Amplicor	70	45
		G	HC2	51	56
		LEIAG		85	62
			PCR- Amplicor HC 2	89	73
Ki E. et al.(32)	146	LEIAG	HC2	88.9	67.9
			Cobas 4800	83.4	76.4
			Seeplex	71.9	74.5
			HPV4A		
Comar M. et al.(36)	94	ASCUS	HC2	36	30
			Linnear Array	29	24
Depuydt C. et al.(34)	93	NIC2,3(87) Adenocarcino ma(5) Escamoso invasivo(1)	qPCR	93.6	86.5
			HC2	83.9	94.5
Phillips S. et al. (37)	407	ASCUS	Cobas	90.5	-----
			HC2	80.8	-----
			Linnear	91.7	-----
			Array	92.7	-----
			Amplicor		

La Prueba de genotipado del VPH Linear Array. Diseñada por (Roche Diagnostics) utiliza cebadores biotinizados para detectar una secuencia de nucleótidos dentro de la región L1polimórfica del genoma de VPH que es de aproximadamente 450 pb longitud, contiene grupos de cebadores específicos para los genotipos siguientes: 6, 11, 16, 26, 18,31, 33, 35,

39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 70, 73 y 82. Se efectúa manualmente e interpreta cualitativamente.

El uso de la citología y carga viral de los VPH de alto riesgo por medio de la captura híbrida en combinación provee sensibilidad en 100%, valor predictivo negativo 100% y una especificidad de 76.6% en casos de pacientes con enfermedad residual del cérvix tratados con conización. **(33)**

Se ha valorado la sensibilidad, especificidad y Valor predictivo negativo de la citología cervical y prueba de ADN VPH, en LEIAG con los siguientes resultados: La sensibilidad es 64% y 97% para Citología y Prueba de ADN VPH respectivamente, La especificidad es 89.1 % y 92.4% para Citología y Prueba de ADN VPH respectivamente y por último el Valor Predictivo Negativo es 99.75% y 99.98% para Citología y Prueba de VPH respectivamente. **(34)**

2.7. Prueba de inmunohistoquímica P16 y Ki67

Los biomarcadores P16 y Ki67 identifican a las células que están alteradas de la vía de la proteína Retinoblastoma E2F, la cual es un factor de transcripción que ayuda a inducir a que una célula se divida; pero está inactiva cuando se une a la proteína retinoblastoma (Rb). Cuando el oncogen E7 de VPH de alto riesgo se une a la célula huésped con Rb epitelial, a continuación, se libera E2F liberando ó produciendo p16 como un intento para frenar y equilibrar el ciclo celular, ya que también es activado por E2F libre. En el epitelio escamoso no infectada, p16 es normalmente sólo en raras ocasiones detectables mediante técnicas de inmunohistoquímica en las células basales. En contraste, hay un aumento paradójico en p16 en displasia de alto grado, que también se puede detectar con inmunohistoquímica. **(35, 38)**

Los VPH de alto riesgo aumentan el Ki-67 el cual es un antígeno nuclear y un marcador de proliferación celular, expresada en todas las fases del ciclo celular, excepto en fase G0. El anticuerpo monoclonal MIB-1, que está dirigido contra Ki-67, es utilizado rutinariamente por los patólogos como un método para determinar la actividad proliferativa de las células en muestras de histología. Así mismo se ha utilizado en la evaluación de lesiones cervicales dudosas y pruebas de Papanicolaou para aumentar especificidad. **(36)**

Algunos estudios han complementado la citología con otras pruebas para detectar las lesiones cervicales. Una de ellas es el uso de un biomarcador que tiñe células transformadas denominada la prueba de Inmunohistoquímica P16^{INK4a}, la cual se aplica en citología. **(Figura 2)** En un estudio se comparó la sensibilidad y especificidad de la prueba en citología con respecto a VPH ADN por captura híbrida y PCR, en lesiones cervicales NIC 2 y 3, teniendo la prueba de Inmunohistoquímica P16^{INK4a}, mayor porcentaje de especificidad 67% a 69%. **(39)**

En un estudio realizado en Tailandia, se asoció la citología con la prueba de Inmunohistoquímica p16 y con el Test de ADN del VPH por medio de la captura Híbrida obteniendo la sensibilidad del 100% en lesiones de Alto Riesgo NIC 2 y NIC 3. **(37)**

Figura 2

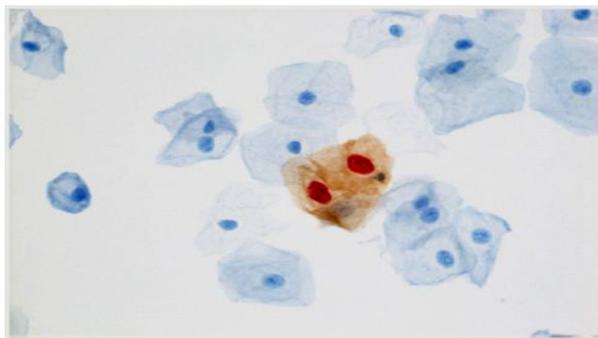


Figura 2: Prueba de doble tinción P16 y Ki67 en citología de exfoliados Cervicales. Núcleo celular color rojo Ki67 positiva y citoplasma Color café marrón P16 positivo. **(38)**

2.8. Comparación de prueba P16 con respecto a la prueba doble tinción P16 y Ki67 en citología cervical

La especificidad de la Prueba P16 y Ki67 está aumentada con respecto a la prueba P16 sola. La sensibilidad para Atipia Escamosa de significancia indeterminada (ASCUS, por sus siglas en inglés) es de 92.2% (95%CI) para ambas pruebas; la especificidad para ASCUS es de 80.6 y 63.4% (95% CI) para prueba de doble tinción P16 / Ki67 y P16 respectivamente. Con respecto a LEIBG la sensibilidad es de 94.2% y 92 % respectivamente y la especificidad fue del 68% y 47%.**(13)**

2.9. Comparación de Prueba de doble tinción P16 y Ki67 respecto a la prueba de ADN del HPV de alto Riesgo

Se ha comparado la sensibilidad y especificidad de la prueba de doble tinción P16 y Ki67 en LEIAG con respecto a prueba de ADN de VPH de Alto Riesgo. Se reporta que la sensibilidad es similar aunque la especificidad es mayor en la Prueba de doble tinción (62% a 72%) que la de Prueba de ADN de HPV de Alto Riesgo (37.8%). Por lo cual es una prueba que detecta mejor las pacientes realmente sanas. **(35)**

2.10. Interpretación de la prueba P16 y Ki67

La presencia de una o más células epiteliales del cuello uterino (s) que muestra dentro de la misma célula un citoplasma color marrón y una tinción color rojo nuclear indica expresión de p16 y la expresión de Ki-67, respectivamente, que define un resultado positivo, independientemente de la interpretación de las anomalías en mortalidad. **(Figura 3)** Los casos sin ningún tipo de células inmunorreactivas doble se considera negativo para p16/Ki-67 doble tinción de citología. **(13)**

Figura 3

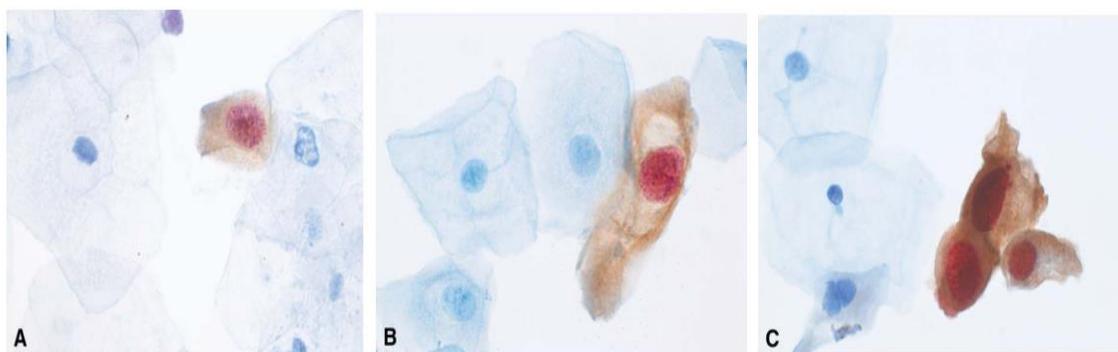


Figura 3: Test dual P16/Ki67 en citología cervical. Las células transformadas caracterizadas por un citoplasma café marrón debido a la sobreexpresión de la Proteína 16 y núcleo celular color rojo por la expresión Ki67. La doble tinción se interpreta positivo , tanto el núcleo color rojo como citoplasma color marrón: en la figura (A) se observa células con ASC-US. (B) LEIBG y (C) LEIAG. **(39)**

2.11. Histología de biopsia cervical

Se toma biopsia dirigida del cérvix bajo visión del colposcopio, la cual orienta el sitio más significativo para realizar la biopsia. Posteriormente se realizan cortes en parafina siendo teñidas para ser observada al microscopio.

En un estudio realizado con un panel de cuatro patólogos de diferentes Hospitales de Estados Unidos y Canadá, se evidenció la correlación de los resultados de muestras de histología con diferentes lesiones precursoras NIC 1, NIC 2 y NIC 3 con tinción de hematoxilina eosina. Utilizando el análisis estadístico de concordancia de Kappas (*K*) no ponderado comparando entre parejas de patólogos diagnósticos dicotomizados como NIC positivo versus NIC negativo (incluyendo normal, insatisfactorio y metaplasia) o NIC 2/3 positivo versus NIC 2/3 negativo (incluyendo normal, insatisfactorio, metaplasia y NIC 1), la concordancia interobservador para cada panelista fue $K = 0.756$ a 0.865 . **(31)**

La concordancia entre los diagnósticos de citología e histología (Biopsia dirigida por colposcopia del cérvix) es satisfactoria en 82%; la citología subestima lesiones en el 2.3% y sobreestima la enfermedad cervical en el 16.1%. **(40)**

Las lesiones de displasia leve o conocidas como lesión intraepitelial de bajo grado (NIC 1) progresan hasta displasia severa en sólo 1% por año, mientras que de las lesiones moderadas (NIC 2) progresan a displasia severa (NIC 3) en 16% en 2 años y en un 25% en 5 años. No obstante, la detección temprana y tratamiento del VPH en las lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión hasta cáncer. **(30)**

En los últimos años, la inmunohistoquímica ha tenido un gran impacto en el campo de la patología cervical, como en otras áreas de diagnóstico de la patología ginecológica. La inmunohistoquímica siempre se debe utilizar como complemento del examen morfológico y los resultados no deben ser interpretados en forma aislada, especialmente cuando se trata con los tumores malignos. Ningún marcador es totalmente específico sensible para cualquier lesión determinada. Es probable que en los próximos años, la inmunohistoquímica, junto con las investigaciones moleculares, jugarán un papel cada vez más importante en el campo de diagnóstico de patología cervical. También se espera que estos métodos sean considerados como factor pronóstico predicción en diversas neoplasias de cuello uterino. **(41)**

La prueba de inmunohistoquímica P 16^{INK4a} en cortes de biopsias tiñe las células afectadas por el VPH de alto riesgo, siendo más evidente cuando las lesiones son de Alto Grado o de cáncer invasivo. **(Figura 4)**

Figura 4

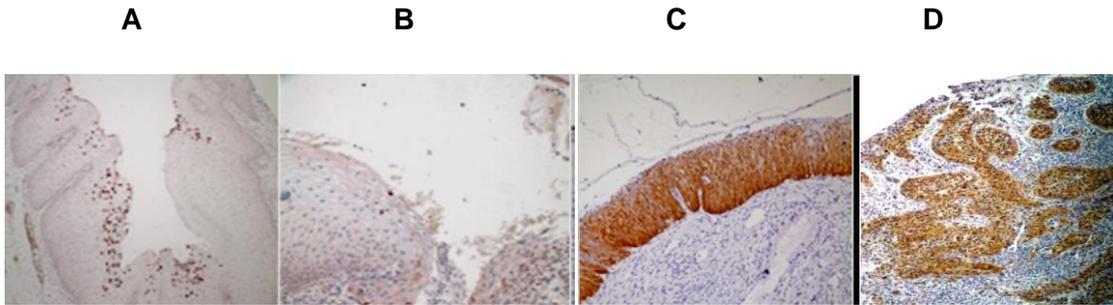


Figura 4: Muestras Histológicas del cérvix con la prueba P16INK4a. Representando los diferentes tipos de lesiones, en la imagen A y B muestran lesión de bajo grado; en la imagen C. Lesión de alto grado y en D. Lesión de cáncer invasiva del cérvix.

En un estudio se midió el índice de concordancia ponderado para interpretar biopsias del cérvix con tinción por inmunohistoquímica P16, el cual fue de 0.80 con IC 95% 0.66 a 0.89. **(42)**

2.12. Diagnóstico Colposcópico

La colposcopia existe desde 1920, no fue hasta 1970 que cobró auge debido a que fue aceptado en Estados Unidos como procedimiento que debiera rectificar los hallazgos de citología. En Guatemala específicamente en el INCAN fue utilizado desde 1978 por el Dr. J. Miguel García Valle fundando la primera Unidad de Colposcopia.

La colposcopia permite examinar y evaluar el cérvix, detectando lesiones benignas o sospechosas de malignidad. El principal objetivo de la colposcopia es detectar lesiones premalignas. El frote cervical advierte la sospecha de lesiones por lo que la prueba de citología al estar anormal debiera estar acompañada del examen colposcópico y posteriormente de una biopsia dirigida. La Colposcopia es interpretativa, subjetiva y falible. **(43)**

Es importante que el que practique la colposcopia determine el sitio más apropiado para la toma de biopsia ya que de ello depende el diagnóstico histológico, el cual también está sujeto de interpretación. **(44)**

El aspecto fundamental para el diagnóstico certero final es la Correlación de la Citología, la Histología y la Impresión colposcópica. **(43)**

La Federación Internacional para la Patología Cervical y Colposcopia (IFCPC, por sus siglas en inglés) propuso en el año 2002 una terminología fácil, reproducible, con una excelente correlación interobservador para predecir los hallazgos histológicos del cérvix; teniendo una sensibilidad de 86% y especificidad del 30.3% en distinguir un cuello sano versus Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)/ Carcinoma.**(12)**

La propuesta contiene los siguientes criterios, para predecir los hallazgos histopatológicos (Metaplasia cervical, Enfermedad de Bajo Grado cervical, Enfermedad de Alto Grado cervical y Cáncer Invasivo del cérvix):

1. Hallazgos colposcópicos sugestivos de Metaplasia Cervical: epitelio acetoblanco delgado, base o puntilleo fino, mosaico fino o yodo positivo.
2. Hallazgos colposcópicos sugestivos de enfermedad de Bajo Grado Cervical: epitelio acetoblanco delgado, base o puntilleo fino, mosaico fino o yodo positivo.
3. Hallazgos colposcópicos sugestivos de enfermedad de Alto Grado Cervical: Epitelio acetoblanco denso, puntuación o puntilleo grueso, Mosaico grueso, Vasos atípicos y Iodo negativo.
4. Hallazgos colposcópicos sugestivos de Cáncer Invasivo del cérvix: Erosión, acetoblanco denso, puntuación o puntilleo grueso, mosaico grueso, vasos atípicos.

2.13. Tratamiento o diagnóstico de lesiones cervicales

Muchos clínicos han tratado las LEIAG con conización cervical preservando la anatomía y función del cérvix. En 1965, Anderson demostró que la conización terapéutica ofrece protección contra el cáncer cervical como alternativa a histerectomía.**(45)**

Los índices de curación con mínima morbilidad en lesiones preinvasivos del cérvix fueron reportados al utilizar criocirugía, electrocauterio con asa diatérmica y láser CO₂. **(46)**

La conización es diagnóstica cuando:

1. Hay sospecha de lesión en el canal endocervical.
2. Existe discrepancia o no correlación entre resultado de citología e histología
3. Hay sospecha de lesión microinvasiva del cérvix **(47)**

En 1990 el uso del asa electroquirúrgica conocida como Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP) ganó popularidad. El procedimiento consta de la remoción de la zona de transformación similar al de conización con bisturí. La conización con asa de diatermia conocida en Europa como LLETZ (large loop excision transformation zone) y en los Estados Unidos como LEEP, fue creada por Cartier y sus colaboradores en 1984 y descrito su empleo en 1989 por Prendiville. **(48)**

La conización tipo LLetz tiene varias ventajas: menos costo, fácil técnica y buen éxito en la resolución de los casos tratados por lesiones preinvasivas, especialmente en el ectocérvix. **(49)** La conización tipo LLETZ tiene un rango más alto de escisión incompleta de las lesiones cervicales 37% con respecto a la conización con bisturí el cual es 28.9%. **(50)** Es una alternativa aceptable a la conización con bisturí, en mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y colposcopia insatisfactoria. Hay una tendencia a tener recurrencia en los casos con lesiones escamosas intraepiteliales después de realizar LLETZ (16.4%) en comparación con Conización con bisturí (12.4%). Según datos de estudios anteriores, la conización con bisturí se asoció más con trabajo de parto prematuro. La conización tipo LLETZ tuvo menos costo y complicaciones de hemorragia. **(51)**

La conización tipo LLETZ tiene un riesgo de sangrado del 7%. En comparación con las otras técnicas de conización como las realizadas con bisturí en frío, laser y CO₂ no hay diferencias significativas. Tampoco hay diferencias en cuanto a complicaciones asociadas con la conización cervical como infección y estenosis cervical aunque se reporta que a la inspección histológica del canal endocervical los bordes quirúrgicos no preservan la estructura debido a la quemadura ocasionada por la electrocirugía. **(52)**

2.14. CORRELACIÓN CITOLÓGICA – COLPOSCOPIA E HISTOLOGÍA

La discrepancia o no correlación es definido como la diferencia de 2 grados entre citología y resultado de histología, como por ejemplo un diagnóstico de LEIAG por citología y cervicitis por histología. En el Hospital Universitario de North Staffordshire evaluaron la correlación multidisciplinaria clínico patológico, revisaron los casos en donde hubo discrepancia o no correlación, durante 3 años, detectando 35% de los casos con discrepancia entre la Citología con respecto a histología y 10% con discrepancia entre citología y colposcopia. **(11)**

En Columbia Británica, Canadá se estudiaron por 4 años a 84,244 pacientes evaluando la correlación de los resultados de citología del cérvix, histología e impresión colposcópica, evidenciando la correlación de impresión colposcópica con respecto a la citología fue del 90%, la correlación de la citología con respecto a la histología fue 82% , sobreestimando en 16.1% . El 77% de los casos con resultado en citología de LEIAG fueron confirmados con histología. Concluye el estudio que la sensibilidad de citología y colposcopia fueron altos pero la especificidad de bajo a moderado. La asociación entre citología y colposcopia fue altamente significativa ($P < 0.001$). **(10)**

2.15. JUSTIFICACION

La aplicación de la prueba de doble tinción con biomarcadores P16 y Ki67 en la citología, podría aumentar la precisión de los diagnósticos en las pacientes, disminuyendo la falta de correlación Citológico con la impresión colposcópica y la histología, contribuyendo a tener menos casos de pacientes sometidos a conización cervical innecesariamente.

Actualmente se reporta en el INCAN de Guatemala que en el 30 % de las pacientes a quienes se les realizó conización del cérvix, la histología final es reportada negativa o sea sin lesión preinvasiva del cérvix; lo cual demuestra que casi un tercio de los procedimientos de conización fueron realizados innecesariamente. Esto es debido a que el diagnóstico previo a la realización de las conizaciones no son precisos, provocando falta de correlación o disociación citología histológico.

CAPITULO III

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el valor de la prueba de inmunohistoquímica p16^{ink4a}- Ki67 en citologías anormales, de pacientes que consultan a la unidad de colposcopia del INCAN durante el 2012 y 2013.

ESPECÍFICOS

- 3.1 Valorar la correlación de los resultados del test con doble tinción P16 y Ki67 en la citología cervical con respecto a la impresión colposcópica.
- 3.2 Valorar la correlación de los resultados del test con doble tinción P16 y Ki67 y la tinción convencional en citología cervical respecto a la histología.
- 3.3 Determinar el acuerdo diagnóstico de las citologías e histologías con la doble tinción P16 y Ki67.
- 3.4 Estimar la sensibilidad y especificidad del test con doble tinción P16 y Ki67 en la citología cervical según el tipo de lesión cervical diagnosticado por histología

CAPITULO IV

HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis Nula. La sensibilidad y especificidad del test con doble tinción p16 Ki67 en la citología cervical según el tipo de lesión cervical diagnosticado por histología es menos confiable.

Hipótesis Alternativa. La sensibilidad y especificidad del test con doble tinción p16 Ki67 en la citología cervical según el tipo de lesión cervical diagnosticado por histología es más confiable.

4.2. Hipótesis Nula. El índice de concordancia entre los patólogos no es mejor con el test con doble tinción P16 y Ki67.

Hipótesis Alternativa. EL índice de concordancia entre los patólogos es mejor con el test con doble tinción P16 y Ki67.

CAPITULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio

Estudio observacional de corte transversal, prospectivo.

5.2. Población

Se incluyen a todas las pacientes que se les efectuó colposcopia en el Instituto de Cancerología, con un resultado de citología anormal (ASCUS, AGUS, LEIBG, LEIAG y Cáncer invasivo) durante el periodo 2012 y 2013.

5.3. Selección y tamaño de la muestra

La muestra para el presente estudio fue por conveniencia. Se colectaron 200 muestras de citología y 200 de biopsias cervicales de pacientes en dos años.

5.4. Unidad de análisis

Pacientes con resultados de citología anormal (ASCUS, AGUS, LEIBG, LEIAG y Cáncer invasivo) y que se les efectuó colposcopia en el Instituto de Cancerología durante el periodo 2012 y 2013.

5.5. Criterios de inclusión

5.5.1. Pacientes con Resultado de Citología anormal realizada e interpretada en el INCAN como ASCUS, NIC I, II, III o Cáncer invasivo

5.6. Criterios de exclusión

5.6.1. Embarazadas

5.6.2. Pacientes con diagnóstico previo de cáncer de cérvix invasor.

5.6.3. Pacientes con histerectomía previa

5.7. Recolección de datos

5.7.1 Procedimientos para la recolección de información

Las pacientes que tienen algún resultado anormal de citología realizada en el INCAN que consultaron a la Unidad de Colposcopia, fueron entrevistadas e informadas de forma verbal y por escrito del estudio. Todas aquellas pacientes que desearon participar en el estudio, leyeron y firmaron el consentimiento informado. Fueron excluidas del estudio sólo 24 muestras debido a la mala calidad de muestras que no permitieron realizar un adecuado diagnóstico.

Para la toma de muestra citológica fue por medio de citobrush, el cual se introduce en el canal endocervical y se gira o da vueltas 3 veces. Posteriormente se introduce el cepillo en solución alcohol bufferado.

La colposcopia se efectuó utilizando colposcopio marca Leisegang modelo optic con aumentos 7.5, 15 y 30 aumentos; y aplicando ácido acético al 5% al cérvix, posteriormente se realizó la biopsia dirigida de las lesiones sospechosas observadas bajo visión directa. Las biopsias fueron tomadas con pinzas Tishler y preservadas en formol bufferado al 10%.

Las muestras de exudado cervical fueron procesadas en el laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos (FCMUSAC).

Realización de la prueba P-16 ink4a+ Ki67 en citología y cortes histológicos en laboratorio de patología de la Facultad de Ciencias Médicas del CUM. Cada muestra de frote del cérvix y biopsias o conos se les procedió a realizar inmunotinción según las recomendaciones del fabricante. A las muestras de frotis de exfoliados cervicales se les procesó con inmunotinción p16 y Ki67 y a las biopsias y o conos cervicales con inmunotinción p16; en grupos de 10 a 15.

Para las citologías se utilizó la doble tinción o el Test Dual CINtec plus P16 Ki67 siguiendo las instrucciones del fabricante (Laboratorios mtm Roche de Alemania); posteriormente se tiñen con fondo de hematoxilina eosina con base acuosa.

Para las biopsias y conos cervicales, se realizan cortes de 4 μm de grosor para la inmunotinción de la P16, utilizando el sistema En Vision (Dako) p16INK4a se detectó utilizando el kit CINtec histología (clon E6H4, mtm Laboratories, Heidelberg, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes histológicos tanto para la Inmunotinción de P16 y para la tinción de hematoxilina eosina, fueron obtenidos del mismo bloque de parafina. Ver anexo 9.4.

Los cortes histológicos fueron realizados por el Departamento de Patología del INCAN y procesados en el Departamento de Patología de la FCMUSAC.

Posteriormente se enviaron las muestras al Hospital Clinic de Barcelona, con el Dr. Jaume Ordi, Jefe del departamento de patología del Hospital Clinic de Barcelona. Dicho investigador fue el experto en la interpretación de las muestras, y se midió la concordancia de sus resultados con los dos grupos de patólogos de Guatemala.

5.7.2. Análisis de datos

El análisis se efectuó por medio del programa SPSS 17.

La sensibilidad y especificidad se medirá en cuadro de 2 x 2 con la prueba de histología como Gold Estándar con la doble tinción P16 y Ki67. Índice de correlación Tau B de Kendall para establecer la correlación entre Hallazgos citológicos e impresiones colposcópica. Se efectuó índice de concordancia, interobservador, de las interpretaciones de las muestras procesadas por P16 – Ki67 Kappa.

5.7.3. Impacto de la investigación

El tema de esta investigación beneficiará a guatemaltecas que buscan el diagnóstico y tratamiento apropiado de lesiones del cérvix evitando el progreso de dichas lesiones a cáncer invasivo, evidenciando la importancia de realizar la prueba de P- 16 ink4a - Ki 67 para confirmar lesión escamosa intraepitelial de bajo o alto grado, por medio de los datos de sensibilidad y especificidad.

5.7.4. Cronograma

PERÍODO DE TIEMPO	DESCRIPCIÓN
Primer Trimestre	Compra de equipo y reactivos necesarios para el laboratorio Recibir las recomendaciones necesarias de parte de los profesores de Barcelona España.
Segundo Trimestre	Inicio de recolección de muestras en Guatemala, pacientes de INCAN y tabulación de datos. Por vía internet se harán las consultas que vayan surgiendo del trabajo de campo.
Ultimo trimestre	Enviar las muestras finales para interpretación de laminillas en Barcelona, España como grupo experto. Así mismo se interpretarán las laminillas de frotos exfoliados cervicales y muestras histológicas en Guatemala por dos grupos 1) Patólogos de la USAC y 2) Patólogos del INCAN

CAPITULO VI RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del estudio de investigación “Valor de la prueba de inmunohistoquímica P16 INK4A- KI67 en citologías anormales de pacientes que consultan a la unidad de colposcopia del INCAN”, doscientas pacientes aceptaron participar en el estudio, 24 pacientes fueron excluidas debido a que las muestras de citología o histología tenían escaso material, el cual no era apto para interpretación.

6.1. Datos generales de pacientes tratadas en la unidad de colposcopia INCAN periodo 2012 y 2013

Se presentan los datos generales de las 176 pacientes participantes. La mediana de edad fue 41 años (rango de 17 a 70 años). El 57.55% de las pacientes eran menores de 40 años. Según las gestas o embarazos, más de la tercera parte (38.07%) reportan 4 gestas o más; 32 pacientes (18.18%) reportan más de 6 hijos. Dentro de los métodos anticonceptivos el más empleado fue ligadura, Pomeroy o anillos en 36 pacientes (20.4%) y 116 pacientes (65.9%) refieren no haber utilizado alguno. **(Tabla 2)**

Tabla 2

Datos generales de 176 pacientes tratadas en la unidad de colposcopia INCAN periodo 2012 y 2013

Rangos de edad	n (176) X 41 ± 14.2	%
menor 20	7	3.98
21 a 30	38	21.59
31 a 40	56	31.98
41 a 50	36	20.45
51 a 60	18	10.23
mayor de 61	21	11.93
Gestas	F	%
0	6	3.41
1	33	18.75
2	27	15.34
3	43	24.43
4	23	13.07
5	12	6.82
>6	32	18.18
Métodos Anticonceptivos	F	%
Ninguno	116	65.9
Ligadura, pomeroy o anillos	36	20.4
Orales	12	6.86
Trimestral	7	4.00
Jadell	3	1.7
DIU	2	1.1

DIU Dispositivo Intra Uterino

FUENTE Papeletas de pacientes, Unidad de Colposcopia INCAN

6.2. Citología e Histología Convencional

Sesenta y seis pacientes (37.5%) presentaron lesiones de escamosas de alto grado en la prueba de PAP, mientras que el 15.34% ya tenían una neoplasia invasora. Al efectuar la biopsia dirigida por colposcopia, los resultados de histología revelaron 62 (35.23%) LEIAG y 30 (17.04%) Carcinoma Invasivos; 51 (28.98%) no demostraban lesiones preinvasoras ni invasoras. **(Tabla 3)**

Se efectuaron 38 Conización con asa del cérvix, ya sea por tratamiento o por diagnóstico. De éstos, 12 casos (31.57%) fueron diagnosticados como cervicitis, 8 casos (21.05%) como LEIBG, 12 casos (31.57%) como LEIAG, 3 casos (7.9%) como carcinoma microinvasivo y 3 casos (7.9%) como Carcinoma Epidermoide Invasivo. **(Tabla 3)**

Se presentan los resultados de las citologías con tinción convencional respecto al resultado de histologías H y E finales ya sea por biopsia o cono cervical. A cada paciente se le efectuó biopsia cervical bajo visión colposcópica, las cuales fueron procesadas y teñidas con hematoxilina y eosina. **(Tabla 3)**

En 20 casos existió la discrepancia entre citología y biopsia. Específicamente, en los casos en que la citología informó LEIAG o cáncer invasivo y la biopsia reportó Cervicitis o LEIBG, se indicó cono diagnóstico. Por lo tanto, se consideró como diagnóstico final o concluyente el resultado del cono cervical. **(Tabla 3)**

Tabla 3

Resultados de estudios convencionales de citología de exfoliado, biopsia y cono cervical de 176 pacientes tratadas en la Unidad de Colposcopia INCAN, periodo 2012 y 2013

Resultados de Citologías convencionales	n (176)	%
AGUS	3	1.70
ASCUS	22	12.50
ASCH	3	1.70
LEIBG	55	31.26
LEIAG	66	37.50
Carcinoma Invasor	27	15.34
Carcinoma Epidermoide Invasivo	24	88.89
Adenocarcinoma invasivo	3	11.11

Resultados de Histología biopsia H y E	n (176)	%
Negativo o normal, cervicitis, metaplasia, endocervicitis, pólipo	51	28.98
LEIBG (NIC 1, coilocitosis o Condiloma)	33	18.75
LEIAG (NIC 2 o 3)	62	35.23
Carcinoma Invasivo (Según tipo)	30	17.04
Carcinoma microinvasivo sospecha	6	3.41
Adenoescamoso invasivo	1	0.57
Carcinoma epidermoide invasivo	20	11.36
Adenocarcinoma invasivo	2	1.14
Adenocarcinoma mucinoso	1	0.57
Resultados de Histología Cono H&E	n (38)	%
Cervicitis	12	31.57
LEIBG (NIC 1, coilocitosis o condiloma)	8	21.05
LEIAG, (NIC 2 o 3)	12	31.57
Carcinoma microinvasivo	3	7.9
Carcinoma epidermoide invasivo	3	7.9

NLB normal lesiones benignas, LEIBG: Lesión escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; LEIAG Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado; ASCUS: Atípi­a Escamosa de Significado Indeterminado; ASCH: Atípi­a Escamosa de Alto Grado; AGUS: Atípi­a Escamosa Glandular de Significado Indeterminado,

FUENTE: Papeletas de las pacientes, Unidad de Colposcopia INCAN

6.3. Impresión colposcópica

Cada paciente fue evaluada por colposcopia. Se interpretaron como “Negativas” las considerándolas lesiones consideradas como benignas; “Poco Significativa” las lesiones consideras LEIBG; “Significativas” las lesiones consideradas LEIAG; y “Muy Significativa” las Lesiones consideradas carcinomas invasivos. **(Tabla 4)**

Tabla 4
Impresión colposcópica de 176 pacientes tratadas en la unidad de colposcopia INCAN, periodo 2012 y 2013

Impresión colposcópica	n (176)	%
Negativa	21	11.9
Poco Significativa	70	39.8
Significativa	59	33.5
Muy Significativa	26	14.8

FUENTE: Informe de colposcopia en las Fichas clínicas, Unidad de Colposcopia INCAN

6.4. Citología con biopsia o cono cervical con tinción H y E

Hubo 83 casos con citología con LEIBG, ASCUS, ASCH o AGUS, en que no fue necesario conizarlas debido a que se consideró que la biopsia dirigida fue la determinante en el diagnóstico final. Entre ellos, 19 (22.9%) revelaron LEIAG o carcinoma invasor. **(Tabla 5)**

De 27 pacientes con citología que revelaba carcinoma invasor, se confirmó en 13 casos (48.1%) el diagnóstico por histopatología. Hubo discordancia en 14 casos (51.85%) ya que fueron diagnosticados como menores o iguales a LEIAG por conización cervical. **(Tabla 5)**

De 66 pacientes con citología que reportaron LEIAG, hubo 15 casos (50%) reportó carcinoma invasivo por histopatología. **(Tabla 5)**

Tabla 5
Resultados de Citología con Biopsia o Cono cervical con Tinción H y E.

Citología tinción Convencional	Diagnóstico final de Histología H y E				Total n 176 %
	NLB n 52 %	LEIBG, Coilocitosis n 32 %	LEIAG n 62 %	Carcinoma Invasivo n30 %	
LEIBG, ASCUS, ASCH, AGUS	40 (76.9)	24 (75)	17 (27.4)	2 (6.7)	83 (47.2)
LEIAG	7 (13.5)	6 (18.8)	38 (61.3)	15 (50.0)	66 (37.5)
Carcinoma Invasivo	5 (9.6)	2 (6.3)	7 (11.3)	13 (43.3)	27 (15.3)

NLB normal lesiones benignas, LEIBG: Lesión escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; LEIAG Escamosa Intraepitelial de Alto Grado; ASCUS: Atípia Escamosa de Significado Indeterminado; ASCH: Atípia Escamosa de Alto Grado; AGUS: Atípia Escamosa Glandular de Significado Indeterminado,

6.5. Citología convencional de cérvix con Cono cervical

De las 38 pacientes que se les realizó conización de cérvix 17 casos tenían resultados por citología LEIAG, de estas 13/17 casos (76.41%) fueron reportados por cono con cervicitis o LEIBG. De 17 casos con citología de carcinoma invasivo, 7/17 casos (41.17%) fueron reportados por cono con cervicitis o LEIBG, lo cual refleja que fueron innecesariamente realizados 20/30 (51.73%) conizaciones. **(Tabla 6)**

TABLA 6
Interpretación de Citologías Convencionales de Cérvix de acientes que se les realizó Cono Cervical (n=38)

Interpretación de citología convencional	Diagnostico en cono cervical					Total
	Cervicitis	LEIBG	LEIAG	Microinvasivo	Carcinoma epidermoide Invasivo	
LEIBG, ASCUS, AGUS, ASCH			3		1	4
LEIAG	7	6	2	1	1	17
Carcinoma Invasivo	5	2	7	2	1	17

LEIBG: Lesión escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; LEIAG Escamosa Intraepitelial de Alto Grado; ASCUS: Atíпия Escamosa de Significado Indeterminado; ASCH: Atíпия Escamosa de Alto Grado; AGUS: Atíпия Escamosa Glandular de Significado Indeterminado.

6.6. CITOLOGIA E HISTOLOGIA CON INMUNOTINCION

En la Tabla 7 se presentan las interpretaciones de las 176 muestras de citología e histología con inmunotinción. Se observa que de las 90 muestras reportadas normales, con cambios inflamatorios, LEIBG, ASCUS, ASCH o AGUS, se diagnosticaron por histología final con tinción P16, 23 casos con LEIAG (25.6%) y 2 carcinomas invasivos (2.2%). Con respecto

a las 67 citologías con LEIAG, se confirmó por histología LEIAG en 48 casos (71.6%) y carcinoma invasivo en 15 casos (22.4%). Hubo discordancia en 4/67 casos (6%) que resultaron ser lesiones benignas a la conización cervical. Finalmente de los resultados por citología con carcinoma invasivo se diagnosticó por histología 4/19 LEIAG (21.1%) y se confirmó carcinoma invasivo en 15 casos (78.9%).

Dentro de los resultados de citología con doble tinción se clasificaron 61 casos con citología normal o cambios inflamatorios. De éstos 41/61 (67.21%) fueron diagnosticados por biopsia como normal o cervicitis, siendo un grupo que podría haber evitado hacer la colposcopia. Sin embargo hubo casos que a la biopsia se detectó LEIAG o cáncer cervical 13/61 (21.31%) considerándolos falsos negativos. **(Tabla 7)**

Tabla 7
Resultados de citología con doble tinción según diagnóstico final de histología con tinción P16

Citología con doble tinción	Diagnóstico final de histología con tinción P16				Total n 176 %
	Normal, Lesiones Benignas n 48 %	LEIBG, Coilocitosis n 21 %	LEIAG n 75 %	Carcinoma Invasivo n32 %	
Normal , CI	41 (85.4)	7 (33.3)	12 (16.0)	1 (3.1)	61 (34.7)
LEIBG, ASCUS, ASCH, AGUS	3 (6.2)	14 (66.7)	11 (14.7)	1 (3.1)	29 (16.5)
LEIAG	4 (8.3)	0 (0)	48 (64.0)	15 (46.9)	67 (38.1)
Carcinoma Invasivo	0 (0)	0 (0)	4 (5.3)	15 (46.9)	19 (10.8)

NLB normal lesiones benignas, LEIBG: Lesión escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; LEIAG Escamosa Intraepitelial de Alto Grado; ASCUS: Atípia Escamosa de Significado Indeterminado; ASCH: Atípia Escamosa de Alto Grado; AGUS: Atípia Escamosa Glandular de Significado Indeterminado,

6.7. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de citología e histología con inmunotinción

Para detectar casos con \geq LEIAG se comparó la Citología con tinción convencional y con doble Tinción obteniéndose el índice de sensibilidad de 79.35% y 76.64% respectivamente, los cuales no son diferentes significativamente. Así mismo se observó mayor especificidad (76.16% vs 94.20%) y mayor Valor predictivo positivo (78.49% vs 95.35%) para la citología con doble tinción. **(Tabla 8)**

Tabla 8
Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo para lesiones \geq LEIAG con Prueba de citología tinción convencional y con doble tinción.

Tipo de citología según Tinción	Sensibilidad Valor % (IC 95%)	Especificidad Valor % (IC 95%)	VPP Valor % (IC 95%)	VPN Valor % (IC 95%)
Convencional	79.35 (70.53-88.16)	76.16 (66.49-85.89)	78.49 (69.61-87.38)	77.11 (67.47-86.75)
Doble tinción	76.64 (68.15-85.12)	94.20 (87.96-100.0)	95.35 (90.32-100.0)	72.22 (62.41-82.03)

VPP Valor Predictivo Positivo, VPN Valor Predictivo Negativo

6.8. Índice de concordancia inter observador de citología y biopsia con Inmunotinción

De cada paciente se evaluó una citología y una o dos muestras de histología (biopsia y cono cervical). Fueron 2 patólogos de Guatemala (A y B) y 1 de Barcelona España considerado el experto. Se obtuvo el índice de concordancia con Kappa Ponderado entre cada patólogo y el experto según tipo de muestra (citología y biopsia o cono cervical). Las muestras de biopsia y cono cervical obtuvieron mayor índice de concordancia 0.82 y 0.87 respectivamente considerada muy buena. Con respecto a la citología con doble tinción hubo diferencia en los índices de concordancia 0.56 y 0.72 respectivamente consideradas de moderada a buena. **(Tabla 9)**

Tabla 9
Índice de concordancia inter observador según tipo de muestra interpretada

Tipo de muestra	kappa Ponderado		IC (95%)	
	Patólogo		Patólogo	
	A	B	A	B
Citología con doble Tinción**	0.56 *	0.72*	0.43-0.69	0.62-0.82
Biopsia cervical con Tinción P16**	0.82 *	0.87*	0.75-0.88	0.86-0.91
Cono Cervical con Tinción P16**	0.87*	0.86*	0.70-1.00	0.66-1.00

****Kappas Globales** para citología con Test Dual 0.66; IC 95% (0.58 0.71). X^2 4.08, Valor p de homogeneidad 0.12. Para Biopsia Kappa 0.84, IC 95%(0.80 0.87), X^2 4.69 y Valor p de homogeneidad 0.1. Para Conos cervicales 0.84, IC 95% (0.73 0.95) X^2 0.05 y Valor homogeneidad p 0.94. IC intervalo de confianza

6.9. Índice de correlación entre citología e histología con inmuntinción

Así mismo se presentan los resultados de Índice de correlación con la prueba Tau b de Kendall entre cada una de las pruebas e Impresión colposcópica. El índice de correlación entre citología con tinción dual con respecto a Impresión colposcópica fue 0.489, considerada de moderada correlación; siendo mayor el índice entre Citología con tinción dual y diagnóstico final de histología con P16 el cual es de 0.684, considerada de buena correlación. Las p de significancia fueron < 0.001 . **(Tabla 10)**

Tabla 10

Índices de Correlación entre los tipos de citología con respecto a Histología e impresión Colposcópica según tipo de lesiones cervicales.

Índice de Correlación Tau b Kendall	Citología Convencional		Diagnóstico final con H&E/impresión colposcópica	Citología doble tinción		Diagnóstico final de Histología P16 /impresión colposcópica
	Diagnóstico final con H&E	Impresión colposcópica		Diagnóstico final de histología a P16	Impresión Colposcópica	
Valor	0.481	0.584	0.681	0.684	0.489	0.571
P significancia	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

CAPITULO VII

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Respecto a la sensibilidad, en nuestro estudio, no hubo diferencia significativa entre ambos tipos de citologías; sin embargo la citología con Test de doble tinción P16 y Ki67 fue más específica (94.2%); que la citología convencional (76.16%). Según la literatura consultada la citología con doble tinción tiene especificidad del 82%. (Petry et al., 2011).

La correlación de los resultados del Test con doble Tinción P16 y Ki67 en citología cervical con respecto a Impresión colposcópica es de 0.489; considerado de Regular. Se advierte que la correlación de las citologías convencionales fue mayor 0.584; no habiendo ventaja con el Test de doble Tinción P16 y Ki67.

Comparando la correlación de los resultados de citología con doble tinción P16 y Ki67 vs la citología convencional con respecto a los resultados de Histología, se observa que fue superior el índice de correlación con el Test con doble Tinción P16 y Ki67 siendo 0.684 el cual es de Bueno; el de la citología convencional fue de 0.481 considerado de Regular.

Los acuerdos entre evaluadores de Guatemala y España fue mayor el índice de concordancia en interpretación de muestras de histologías respecto a la citología; siendo 0.87 y 0.72 respectivamente. Consideradas de buenas a muy buenas.

7.1 CONCLUSIONES

- 7.1.1 El test de doble tinción con P16 y Ki67 en citología cervical tiene mayor especificidad y VPP respecto a la citología convencional siendo 94.2%. No hay diferencia significativa en la Sensibilidad respecto a la citología convencional.

- 7.1.2 Existe buena correlación entre resultados de citología con doble tinción P16 y Ki67 y los resultados de histología, según los diferentes tipos de lesiones cervicales siendo 0.684. El índice de correlación de la colposcopia fue de 0.571. Existe buena correlación en ambos índices.

- 7.1.3 La correlación del test con doble tinción P16 y Ki67 en citología cervical con respecto a los resultados de histología fue mayor, que en la citología convencional, siendo 0.684.

- 7.1.4 El índice de Correlación es regular entre los resultados de citología con doble tinción P16 y Ki67 y la impresión colposcópica, la cual es de 0.489.

7.2 RECOMENDACIONES

- 7.2.1 Debido a la buena correlación, alta especificidad y valor predictivo positivo de la citología con test de doble tinción P16 y Ki67 respecto a los resultados finales de histología, se recomienda aplicar dicho test en aquellos casos de pacientes que existan falsos positivos es decir las citología que sobre diagnostica las lesiones del cérvix; dicha prueba se podría aplicar en los casos en los que haya discrepancia entre la citología cervical y la biopsia previo a realizar una conización diagnóstica del cérvix.
- 7.2.2 Debido a la buena correlación y alta especificidad de citología con test de doble tinción P16 y Ki67 respecto a los resultados finales de histología, se recomienda aplicar dicho test en aquellos casos en los que haya discrepancia entre la citología cervical convencional y la biopsia, pues los falsos positivos pueden disminuir en un 17%, evitando una conización diagnóstica del cérvix en estas pacientes.
- 7.2.3 El test de doble tinción podría ser incluido en el protocolo de manejo de la Unidad de colposcopia del INCAN, posterior a realizar estudios de mayor número de casos en que haya discrepancia o no correlación entre pruebas de citología de exfoliado cervical y biopsia cervical; así tener mayor significancia y sustento su aplicabilidad.
- 7.2.4 Se prevee que la utilidad de la tinción dual disminuiría el número de casos de innecesario de conizaciones cervicales; ofreciendo mejorar la eficiencia y certeza en los diagnósticos de lesiones del cérvix.
- 7.2.5 La prueba de doble tinción se puede aplicar en citologías con exfoliados cervicales.

CAPITULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex [Internet]*. 2003 Jan;45 Suppl 3(1):S306-14.
2. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer* 2005;92(12):2195–200.
3. Nikolaos P. Polyzos MD, Antonis Valachis MD, Davide Mauri MD JPAIM. Papanicolaou test. *Can Med Assoc*. 2011;183(6):337–43.
4. Larios. Correlación citológica-colposcópica e histológica de lesiones de bajo y alto grado en cérvix. *Rev Hosp Gral Dr M* 2006;7(2):54–8.
5. Clary KM, Silverman JF, Liu Y, Sturgis CD, Grzybicki DM, Mahood LK, et al. Cytohistologic discrepancies: a means to improve pathology practice and patient outcomes. *Am J Clin Pathol* 2002;117(4):567–73.
6. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge 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(3):505–9.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5):342–50.
8. Carrillo A, C M, Mohar A, Meneses A, Carrillo A, Mohar A, et al. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Publica Mex*. 2004;46(1): 7-15
9. Jacobs M V, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B, et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol* 1999 Jul;52(7):498–503.
10. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA, et al. p16 INK4a Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A Comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Pathology*. 2003; 16(7):665-73.
11. Allard JE, Rodriguez M, Rocca M, Parker MF. Biopsy Site Selection During Colposcopy and Distribution of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*. 2005;9(1):36–9.
12. Hammes LS, Naud P, Passos EP, Matos J, Brouwers K, Rivoire W, et al. Value of the

- International Federation for Cervical Pathology Cervical Disease. *J Low Genit Tract Dis.* 2007;11(3):158–65.
13. Benedet J. An analysis of 84,244 patients from the British Columbia cytology–colposcopy program. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):127–34.
 14. Moss EL, Byrom J, Owen G, Pearmain P, Douce G, Todd R, et al. Multidisciplinary Colposcopy Clinicopathology Correlation Meetings: An Activity Review. *J Low Genit Tract Dis.* 2009;13(3):169–73.
 15. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol* 2012; 12(3): 128-37.
 16. 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(3):158–66.
 17. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. [en línea] Geneva: WHO; 2011. [citado 24 Mar 2013]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
 18. Jemal Ahmedin, Bray Freddie, Center Melissa, Ferlay, Ward Elizabeth FD. Global cancer statistics. ... *Cancer J Clin* 2011;61(2):69–90.
 19. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518–27.
 20. Liga Nacional Contra el Cáncer. Registro hospitalario año 2014. Guatemala. [en línea] Guatemala: INCAN; 2014 [citado 25 Mar 2017]. Disponible en: <http://regcangua.zzl.org/>
 21. Picconi María Alejandra. Detección del virus del papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2013; 73: 585-596.
 22. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324(1):17–27.
 23. DiMaio D. Papillomavirus E5 Proteins. 2007;3(8):82–96.
 24. Schwarz Elizabeth KU. Falta Titulo de Artículo Prospective Evaluation of Colposcopic Features in Predicting Cervical Intraepithelial Neoplasia: Degree of Acetowhite Change Most Important . *Nature.* 1985;314(7):111–4.

25. Jones DL, Alani RM, Mu K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21 Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;2:2101–11.
26. Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(17):9557–62.
27. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 2010;117(2 Suppl):S5-10.
28. Song S, Lee J, Lee N, Saw H, Kang J, Lee K. Interferon- γ (IFN- γ): A possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol Oncol* 2008;108:543–8.
29. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Incorporación de la prueba del virus del Papiloma humano en programas de prevención cervicouterino. Manual para gerentes de programas de salud. Washington, DC.: OPS; 2016.
http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=36609&lang=es
30. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology. Screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2012;137(4):516–42.
31. Cai B, Ronnett BM, Stoler M, Ferenczy A, Kurman RJ, Sadow D, et al. Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. *Am J Surg Pathol* 2007;31(12):1854–60.
32. Bigras G, Marval F De. The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load : results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13 842 women. *Br J Cancer.* 2005;93(5):575–81.
33. Rijkaart DC, Coupe VMH, van Kemenade FJ, Heideman D a M, Hesselink a T, Verweij W, et al. Comparison of Hybrid capture 2 testing at different thresholds with cytology as primary cervical screening test. *Br J Cancer* 2010;103(7):939–46.
34. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G, et al. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(11):3033–42.

35. Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006;103(2):631–6. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyingyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol* 2006; 103(1):62–6.
36. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer a L, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of p16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma: Pilot Studies. *Cancer Cytopathol* 2011; falta volumen50(4):1–9.
37. Toro de Méndez Morelva, Ferrández Izquierdo Antonio, Llombart Bosch Antonio. Tinción dual inmunocitoquímica de p16INKa/Ki-67 para la detección de lesiones del cuello uterino asociadas a infección por el virus del papiloma humano. *Invest Clin* 2014;55(3): 238–248.
38. Atkins K. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: p16/Ki-67 in cervical papanicolaou Tests. *Cancer Cytopathol* 2011;119(3):145–7.
39. Miroshnichenko GG, Parva M, Holtz DO, Klemens J a, Dunton CJ. Interpretability of excisional biopsies of the cervix: cone biopsy and loop excision. *J Low Genit Tract Dis* 2009;13(1):10–2.
40. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* 2007;39(1):97–111. Dijkstra MG, Heideman D a M, de Roy SC, Rozendaal L, Berkhof J, van Krimpen K, et al. p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol* 2010;63(11):972–7.
41. Jeronimo J, Schiffman M. Colposcopy at a crossroads. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(2):349–53.
42. Hopman H, Voorhorst F. Colposcopia interp de imagenes observer Agreement.pdf ver nombre. 1994. p. 206–9.
43. Bennett BB, Stone IK, Anderson CD, Wilkinson EJ. Gynecology Deep loop excision for pre hysterectomy endocervical evaluation. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;176:82–6.
44. Ueda M, Ueki K, Kanemura M, Izuma S, Yamaguchi H, Nishiyama K, et al. Diagnostic and therapeutic laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006;101(1):143–6.
45. del Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A, et al. Value of p16(INK4a)

- as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201(5):488.e1-7.
46. Young NR. The effect of loop electrosurgical excision procedure on the subsequent risk of preterm delivery. Nicole Rae Young. The University of Toledo. *American Journal of America* 2010; 109(5) 132-145.
<http://utdr.utoledo.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1448&context=graduate-projects>
 47. Giacalone PL, Laffargue F, Aligier N, Roger P, Combecal J, Daures JP. Randomized study comparing two techniques of conization: cold knife versus loop excision. *Gynecol Oncol* 1999;75(3):356–60.
 48. Huang LW, Hwang JL. A comparison between loop electrosurgical excision procedure and cold knife conization for treatment of cervical dysplasia: residual disease in a subsequent hysterectomy specimen. *Gynecol Oncol* 1999;73(1):12–5.
 49. El-Nashar S, Hopkins M, Cliby W, Famuyide A. Can LEEP replace cold knife conization for the management of cervical intraepithelial neoplasia in women with unsatisfactory colposcopic examination? A systematic review and a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2011;120(2011):S105–S105.
 50. Lewis PL. Electrosurgical Loop Conization in the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstet Gynecol* 1994;10:229–34.

CAPITULO IX

ANEXOS

9.1.1. Boleta de información a la paciente y consentimiento informado

Objetivo de la Investigación

Como parte de la evolución de la medicina la búsqueda de nuevos conocimientos es necesaria para el tratamiento de las enfermedades que afectan a las personas. En este estudio se necesita obtener una muestra del cuello de la matriz ó cérvix, utilizando instrumentos descartables y estériles. A partir de esa muestra, la investigación busca realizar una prueba complementaria al Papanicolaou, donde se podría detectar con mayor certeza lesiones premalignas del cáncer de cérvix. Dentro de las expectativas que se tienen de este estudio es poderla aplicar en un futuro para diagnosticar mejor y evitar el desarrollo de cáncer cervical.

El estudio está aprobado por La Unidad de Colposcopia del INCAN, La Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala y por el departamento de patología de la Universidad Clinic de Barcelona.

El estudio es coordinado por coordinado Dr. Alberto García González. Profesor e investigador de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala y ejecutado por el Dr. Carlos Enrique de Jesús López Sánchez.

Propósito

Evaluar una prueba diagnóstica que mejora la detección de células del cérvix que podrían llegar hasta cáncer. Esta prueba ayudará a los otros estudios como la colposcopia y la biopsia del cérvix

- 1) El procesamiento de las muestras del exfoliado del cérvix ó llamado Papanicolaou se utilizarán en la investigación llamada:

“CORRELACION CLINICA DEL TEST DE DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN CITOLOGÍA CERVICAL CON RESPECTO A COLPOSCOPIA E HISTOLOGÍA, SEGÚN EL TIPO DE LESION CERVICAL”

- 2) El investigador dará los resultados a los médicos a cargo de su caso y si usted lo solicita será notificada a través de ellos.
- 3) No serán entregadas los resultados a terceras personas.
- 4) La muestra y su procesamiento podrá conservarse hasta que sea de utilidad en el estudio. La investigación durará 24 meses a partir del 2012.
- 5) Los científicos investigadores no entregarán las muestras a ninguna tercera parte, cumpliendo con esto privacidad y confidencialidad.

Procedimiento

- 1) Se extraerá una sola muestra de exfoliado cervical, la cual se realizará con material descartable y desinfectado (estéril). Esta muestra se obtiene al iniciar la colposcopia, estudio por el que usted consultó a esta clínica. La muestra es similar a la de un Papanicolaou donde más adelante se observaran células coloreadas con reactivos especiales; por lo tanto las molestias son similares a la toma de un Papanicolaou, siendo el dolor temporal el más frecuente.
- 2) Con éstas muestras se realizarán las pruebas de coloración, las cuales se llevarán a cabo en el laboratorio de Biomédica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de Patología de Universidad Clinic de Barcelona España, lo que avala la calidad de las mismas.
- 3) Esta muestra será enviada a los laboratorios mencionados y en 6 meses se tendrá su resultado.

Riesgos e incomodidades

Los riesgos del estudio son casi nulos en la paciente, ya que solamente se obtendrá una muestra de exfoliado cervical con material estéril y descartable.

Quienes pueden participar

Mujeres que son referidas a la Unidad de Colposcopia del INCAN, con un resultado de papanicolaou anormal. Que no haya tenido tratamiento de radioterapia, quimioterapia o conización cervical y que no esté embarazada.

Beneficios potenciales

Los beneficios por participar en este estudio pueden ser:

- En un futuro aplicar una prueba más precisa en las mujeres Guatemaltecas, que consultan a colposcopia para complementar los estudios y detectar mejor las lesiones premalignas.
- Aportar información para el médico tratante en la institución donde está siendo tratada.
- Recibir información del estudio si así lo desea.

Alternativas

La única alternativa es no participar en el estudio. Al negarse a colaborar con el estudio no afecta la atención médica en esta institución donde está siendo tratada.

Costos financieros

No hay gastos para usted por participar en este estudio.

Dudas pueden realizarla con el investigador Dr. Enrique López Sánchez o Alberto García González

Tel. 57152257

Si está interesada en participar favor leer y llenar la boleta que se le presenta a continuación. A las pacientes analfabetas se les leerá por el personal médico o por algún familiar que le acompañe.

9.1.2. Consentimiento informado

Nombre de la paciente _____

Fecha _____ No de registro Médico _____

Institución a que pertenece _____

Con la firma de este documento, dejo constancia, yo _____, que he sido informada acerca del estudio que se realizará en las muestras que me tomaron previamente. He recibido además una copia de la información al paciente, sobre la investigación. El médico ha resuelto personalmente las dudas que he planteado con respecto a la investigación.

Además he sido informado del derecho que tengo de retirarme de este estudio, sin que afecte la atención médica dada por esta institución.

Autorizo al médico y equipo de investigación a recabar la información que requiere la ficha del estudio, manteniendo la confidencialidad de los datos. Acepto voluntaria y libremente participar en esta investigación.

Firma o huella de la paciente

Testigo/ enfermera(o) ò médico

Dr. Alberto García González

Investigador principal

9.1.3. Cartas de autorización

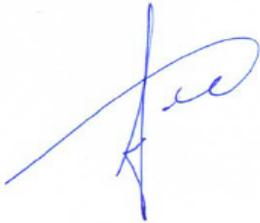
 UNIVERSITAT DE BARCELONA	Facultat de Medicina Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia Casanova, 143 08036 BARCELONA	 Health University of Barcelona Campus
---	--	---

Dr. Jaume Ordi
Tel. +34 93 227 5450
Fax. +34 93 227 5717
jordi@clinic.ub.es

Dr. Alberto García González
Universidad San Carlos de Guatemala

Querido Dr . García,

Por la presente te comunico que será un placer apoyarte en tu proyecto del Test Dual P16 y Ki67 en frotos citológicos, mediante el procesamiento de las muestras y su interpretación en nuestro laboratorio. En nuestro laboratorio dicha técnica está incorporada en la rutina diaria y tenemos una larga experiencia en su interpretación. Recibe un cordial saludo.



Jaume Ordi, M.D., Ph.D.
Profesor de Anatomía Patológica
Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona
Hospital Clinic
Villarroel 170
08036 Barcelona
España
Tel. +34 93 227 5450
Fax +34 93 227 5717
email: jordi@clinic.ub.es



Guatemala, 8 de agosto del 2012.

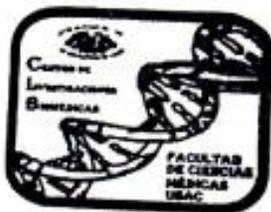
A quién Corresponda

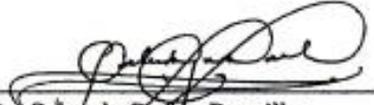
Por este medio hacemos constar que el personal del Laboratorio de Investigación Biomédica, de La Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dará apoyo para la ejecución del trabajo de Investigación del Dr. Alberto García González, titulada:

***"CORRELACION CLINICA DEL TEST DE DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN
CITOLOGÍA CERVICAL CON RESPECTO A COLPOSCOPIA E HISTOLOGÍA,
SEGÚN EL TIPO DE LESION CERVICAL"***

El apoyo consiste en: Procesamiento de muestras de exfoliados cervicales con el test de doble tinción P16 y Ki67. Así mismo en la interpretación de las muestras que serán procesadas con el Test de doble tinción P16 y Ki67.


Dra. Elisa Hernández de Rodas
Directora del Laboratorio
de Investigaciones Biomédicas

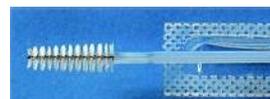



Dr. Orlando Rodas Pernillo
Médico Patólogo
Docente de posgrado patología

9.2. Instrucciones de la toma de muestra del Cérvix para citología.

Equipo para la toma:

- *Espéculo de plástico descartable
- * Cepillo endocervical descartable
- * Frasco con solución de PBS
- * Guantes descartables
- * Solución salina normal al 0.9 %



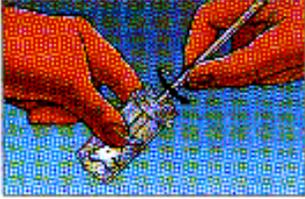
Condiciones de la Paciente: Sin menstruación, no embarazada y estar 72 horas sin relaciones sexuales, ni haber tenido tratamientos Vaginales (gel, cremas ni óvulos)

A la toma de la muestra: El examinador debe colocarse guantes descartables, si se desea lubricar el espéculo hacerlo con solución salina normal al 0.9%, para la toma de la muestra del cérvix utilizar el cepillo endocervical descartable, rotarlo 3 veces en dirección de las manecillas del reloj, el cepillo deberá introducirlo en el frasco con solución PBS y cortar el mango de plástico, tapan el frasco y dejarlo a temperatura ambiente. Ver las siguientes figuras

El cepillo endocervical se introduce en el canal endocervical, el resto de las hebras hacen contacto con el ectocérvix.



Al introducir la escobilla vía vaginal, se coloca la zona larga dentro del canal endocervical, luego se rota suavemente 3 vueltas en dirección a las manecillas del reloj.



La muestra se coloca en el frasco en solución de PBS, cortar el mango de la escobilla, justo por debajo del tapón o cierre del frasco.

Etiquetar el frasco con el Nombre, fecha y registro médico.

El recipiente puede quedar a temperatura ambiente.

La muestra obtenida podrá ser utilizada para realizar la citología con la prueba de Inmunotinción P16y Ki67

9.3. Ficha de recolección de datos de colposcopia y estudios

Registro de Colposcopia _____

Fecha: _____

Nombre de la Paciente: _____ Edad: _____

Antecedentes G.O. Gestas _____ Paras: _____ Cesáreas: _____ Abortos _____

UR: _____

Anticonceptivo: _____

Nombre del examinador: _____

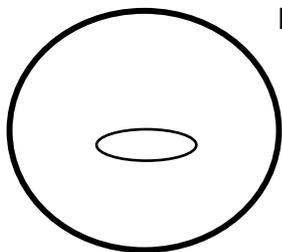
Indicación de la Colposcopia: (Resultado de citología) _____

Estudios Previos

Resultado de Citología Exfoliativa: _____ y/o

Biopsia: _____

Hallazgos Colposcópicos:



Ectopia Leucoplaquia Epitelio Acético Positivo

Punteado/Base Mosaico Vaso(s) Atípico(s)

Unión escamo columnar: Visible No visible

Otros:

Observaciones _____

No de Biopsias en cérvix: _____

Legrado Endocervical

Impresión Colposcópica: _____

Resultado Histología / Hematoxilina Eosina

No Registro de patología: _____

9.4. Instrucciones del kit cintec plus

I. Nombre del producto

CINtec® PLUS Kit

II. Uso previsto

Para uso en diagnóstico in vitro.

El CINtec® PLUS Kit es un ensayo inmunocitoquímico para determinar cualitativamente y de manera simultánea las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67 en preparaciones citológicas cervicales.

El uso de este kit está previsto para laboratorios de citología. La interpretación de los resultados debe realizarla un profesional certificado basándose en la historia clínica del paciente y en otras pruebas diagnósticas realizadas.

III. Resumen y explicación del dispositivo

Base científica

El control de la progresión de la división del ciclo celular eucariótico está efectuado por un complejo mecanismo de expresiones controladas y modificaciones postraduccionales (p. ej., fosforilación) de las proteínas que regulan el ciclo celular. La proteína p16^{INK4a} tiene una función crucial en la regulación del ciclo celular eucariótico. Es parte del control mediado por la proteína retinoblastoma (pRB) de la transición de las fases G1 a S y provoca la detención del ciclo celular durante el proceso de diferenciación celular. Por lo tanto, p16^{INK4a} tiene un efecto antiproliferativo cuando se expresa durante la progresión del ciclo celular. En células epiteliales terminales diferenciadas, la expresión de la proteína p16^{INK4a} se regula a niveles que normalmente no se pueden detectar mediante la inmunocitoquímica. [26;30]

Ki-67 es una proteína asociada con la proliferación que se puede detectar en el núcleo de las células, únicamente, durante la proliferación. Los análisis profundos del ciclo celular han revelado que el antígeno Ki-67 está presente en niveles detectables en todas las fases y, también, en la mitosis, mientras que las células en reposo o inactivas en la fase G₀ no muestran expresión de este antígeno. [3;23].

Como las células con sobreexpresión de p16^{INK4a} sólo pueden proliferar activamente si su sistema de control del ciclo celular está dañado, la expresión del marcador de proliferación Ki-67 y del marcador p16^{INK4a} dentro de una misma célula se deberían excluir mutuamente bajo condiciones fisiológicas normales. Por lo tanto, la expresión conjunta de Ki-67 y p16^{INK4a} en determinadas células se podría considerar como un indicador de desregulación del sistema de control del ciclo celular de las estas células.

En casos de neoplasia cervical, se ha detectado una fuerte sobreexpresión de p16^{INK4a} como consecuencia de la inactivación funcional de pRb causada por la oncoproteína E7 de los virus papiloma humano de los tipos de alto riesgo (VPH-AR) [13;21]. Como E7 es necesaria para establecer y mantener el fenotipo maligno

IV. Reactivos

Material suministrado

Cada kit incluye los siguientes materiales suficientes para realizar 50 pruebas. El número de las pruebas se basa en el uso de 200 μ L de los reactivos por cada portaobjetos.

1 **Peroxidase-Blocking Reagent**

Reactivo de bloqueo de la peroxidasa

11,5 mL, listo para su uso

Peróxido de hidrógeno al 3% que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN_3).

La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

2 **Primary Antibodies Solution**

Solución de anticuerpos primarios

11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16^{INK4a}, clon E6H4 y anticuerpo monoclonal de conejo antihumano Ki-67, clon 274-11 AC3, suministrado en 50 mM de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L azida de sodio (NaN_3) y proteína estabilizante.

3 **Visualization Reagent HRP**

Reactivo de visualización HRP

11,5 mL, listo para su uso

Reactivo de polímero conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-ratón purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas. La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

4 **Visualization Reagent AP**

Reactivo de visualización AP

11,5 mL, listo para su uso

Reactivo de polímero conjugado con fosfatasa alcalina y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-conejo purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas. La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

5 **DAB Buffered Substrate**

Sustrato tamponado DAB

16,0 mL

Solución de tampón sustrato, pH 7,5, que contiene peróxido de hidrógeno < 0,1%, estabilizantes, potenciadores y un agente antimicrobiano.

6 **DAB Chromogen**

Cromógeno DAB

0,85 mL

Solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina.

La solución de cromógeno (DAB) es nociva. Consulte las siguientes frases de riesgo y seguridad:

R40 Posibles efectos cancerígenos.

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

R68 Posibilidad de efectos irreversibles.

S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37 Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

NOTA: aunque la diaminobencidina está relacionada estructuralmente con la bencidina, no hay pruebas de la carcinogenicidad de la diaminobencidina.

Consulte las normas nacionales, regionales o locales para la eliminación del producto.

La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

7 **Naphthol Phosphate Substrate**

Sustrato naftol fosfato

25,0 mL,

Solución de tampón sustrato, pH 9,2, que contiene naftol-AS-TR-fosfato como sustrato, estabilizantes, potenciadores y un agente antimicrobiano.

8 **Fast Red Chromogen**

Cromógeno Fast Red

1,33 mL, solución de cromógeno Fast Red.

9 **Epitope Retrieval Solution 10x**

Solución de recuperación del epítopo 10x

500 mL, 100 mM de EDTA, pH 8,0, que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN₃).

10

CINtec® PLUS Mount

Montaje CINtec® PLUS

18,0 mL, medio de montaje permanente con una base acuosa para la conservación permanente de los preparados en portaobjetos con tinción con peroxidasa y fosfatasa alcalina como sistemas de visualización. Contiene 7,7 mmol/L de azida sódica (NaN₃)

Preparación de las muestras citológicas

Las muestras citológicas deben manipularse de manera adecuada para conservar adecuadamente dichas muestras para procedimientos de inmunocitoquímica. Sobre las muestras se deben realizar los métodos habituales de procesamiento celular.

Se pueden usar los portaobjetos ThinPrep® (Hologic™ Inc.) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante en un procesador de portaobjetos del sistema ThinPrep® 2000, (Hologic™ Inc.) o portaobjetos del sistema BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante, así como portaobjetos preparados manualmente (frotis convencionales).

Notas:

1. Preparación de las muestras ThinPrep®:

Por favor tenga en cuenta que no se recomienda el empleo del procesador ThinPrep® 3000, ya que el procedimiento de fijación con espray realizado con este instrumento podría generar la pérdida masiva de células.

2. Preparación de las muestras BD SurePath™:

Se ha comunicado ocasionalmente que el almacenamiento del material celular posterior al procedimiento de enriquecimiento en agua, puede tener un efecto negativo sobre la señal inmunocitoquímica; recomendamos que durante la preparación de los portaobjetos para la prueba con CINtec® PLUS respete siempre las instrucciones expuestas a continuación para evitar cualquier riesgo de pérdida de señal:

- a. Preparación de los portaobjetos directamente después del procesamiento de los portaobjetos con papanicolaou
 - i. En cuanto se haya realizado la tinción papanicolaou del respectivo portaobjetos BD SurePath™, se podrá preparar un segundo portaobjetos para cada caso.
 - ii. Coloque un segundo set de portaobjetos etiquetados en los soportes para portaobjetos.
 - iii. Si emplea el PrepStain™ con versión GYN 1.1 ó 1.2 para la preparación de portaobjetos, seleccione el programa "Sólo transferencia" ("Transfer only").
- b. Preparación posterior de portaobjetos con pellets celulares enriquecidos tras la preparación de portaobjetos Pap
 - i. Retire los soportes con los tubos del sistema PrepStain™ y añada aproximadamente 2 mL de líquido conservante BD SurePath™ a cada tubo.
 - ii. Tape los tubos y los podrá almacenar a temperatura ambiente hasta 4 semanas o refrigerados (2 – 8°C) hasta 6 meses.
 - iii. Si va a preparar un portaobjetos para CINtec® PLUS con una muestra almacenada, esta deberá atemperarse previamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Comience con el segundo paso de centrifugado del proceso de enriquecimiento GYN y realice el resto de los pasos del procedimiento de preparación.
- c. Preparación de portaobjetos con el material de muestra restante que permaneció en el vial de muestra original (aproximadamente 2 mL)
 - i. Añada 8 mL de líquido conservante BD SurePath™ al material restante en el vial BD SurePath™ (aprox. 2 mL)
 - ii. La muestra diluida se debe procesar con el PrepMate™ usando las técnicas convencionales y en el PrepStain™ usando la versión GYN 1.1 ó 1.2 para la preparación de portaobjetos con el programa "Sólo transferencia" ("Transfer only")

Inmediatamente después de la preparación, los portaobjetos ThinPrep® o BD SurePath™ deben fijarse en etanol al 99% durante 10 minutos hasta 1 hora y dejar secar durante 20 minutos hasta 16 horas (durante la noche). Las preparaciones citológicas ThinPrep® o BD SurePath™ no deben ser fijadas con reactivo de fijación pulverizable para muestras citológicas (spray) que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix®, Merck).

Los frotis convencionales deben fijarse con reactivo de fijación pulverizable (spray) para muestras citológicas que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix[®], Merck) inmediatamente después de la recogida de las muestras.

Antes de comenzar con el procesamiento de inmunotinción, se deberán rehidratar todas las muestras siguiendo el protocolo específico expuesto en el apartado 2.1.

A continuación se adjunta el resumen de la programación:

Paso del programa	Preparaciones citológicas ThinPrep [®] y frotis convencionales	Preparaciones citológicas BD Surepath [™]
1	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
2	Peroxidase-Blocking Reagent (Reactivo de bloqueo de la peroxidasa) 5 minutos	Peroxidase-Blocking Reagent (Reactivo de bloqueo de la peroxidasa) 5 minutos
3	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
4	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos
5	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
6	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos
7	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
8	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
9	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
10	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos
11	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
12	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
13	rinse ^s (Lavado)	rinse ^s (Lavado)
14	Switch (cambio)	Switch (cambio)
15	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos

16	rinse (con agua destilada o desionizada)	Rinse (con agua destilada o desionizada)
17	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
18	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos
19	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
20	—	Autostainer LabVision: "Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos Autostainer Dako: "Substrate" step: Fast Red (Paso "Sustrato": Fast red) 15 minutos
21	—	rinse* (Lavado)
22	rinse (con agua destilada o desionizada)	rinse (con agua destilada o desionizada)
23	switch (Cambio)	switch (Cambio)

* utilice el tampón de lavado para los pasos de lavado (rinse)

VIII. Interpretación de los resultados

El procedimiento del CINtec® PLUS Kit genera dos productos de reacción de distinto color: uno marrón que se precipita en el lugar donde hay antígeno p16^{INK4a} y uno rojo que se precipita en el lugar donde hay antígeno Ki-67. La tinción de células con color marrón (citoplasma y/o núcleo) indica la sobreexpresión de la p16^{INK4a}. La tinción de células con color rojo (núcleo) indica la expresión de Ki-67. Las células con ambas tinciones mostrarán una tinción marrón citoplasmática con un núcleo típicamente de color rojo intenso. Antes de interpretar los resultados, un patólogo/citotécnico cualificado con experiencia en procedimientos inmunocitoquímicos y formado en la interpretación de los portaobjetos de tinción de CINtec® PLUS debe evaluar los controles positivos y negativos. La interpretación de los resultados debe realizarla un profesional certificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

La interpretación de las muestras citológicas cervicales con tinción de CINtec® PLUS Kit, se deberá realizar evaluando la presencia de las células cervicales epiteliales que muestran ambas tinciones, la tinción marrón citoplasmática y la tinción roja del núcleo, que son indicativos de una expresión simultánea de p16 y Ki-67.

La presencia de una o más células cervicales epiteliales con la presencia de ambas tinciones, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo dentro de la misma célula, se interpreta como un resultado positivo del test CINtec® PLUS.

Si no se detectan células cervicales epiteliales con la presencia de ambas, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo, se interpreta con un resultado negativo del test CINtec® PLUS.

Por favor tenga en cuenta que la presencia de células cervicales epiteliales que muestren inmunoreactividad a tan sólo uno de los dos marcadores (como por ejemplo sólo la tinción marrón por p16 o sólo la tinción roja por Ki-67) no se considerarán un resultado positivo del test CINtec® PLUS; incluso si ambos tipos de células cervicales que muestran una inmunoreactividad se encuentran en la misma muestra citológica.

Si se detectaran células con indicación de discariosis severa que no presenten la tinción de ambos marcadores, p16 y Ki-67, los criterios morfológicos de interpretación no se deben ignorar.

9.5. Informe por paciente del estudio de citología exfoliativa.

INTERPRETACIÓN CITOLOGIA TEST DUAL			
------------------------------------	--	--	--

código	EDAD	Gestas	Anticoncepción

Informe de estudio Citología exfoliativa

Código de la muestra: _____

- Citología tradicional
- Citología con prueba de Inmunohistoquímica P16 y Ki67

Descripción de la calidad de la muestra

- Satisfactoria
- Satisfactoria pero limitada por _____
- Insatisfactoria por _____
- Presencia de Células endocervicales

TINCIÓN POSITIVA___

TINCIÓN NEGATIVA___

Microorganismo observados

- Cándida
- Tricomonas
- Gardnerella
- Flora Bacteriana Mixta

- Normal
- Cambios Inflamatorios Leve___ Moderado___ Severo___
- Metaplasia
- ASCUS (Células Escamosas Atípicas de significado indeterminado)
- AGUS (Células Glandulares Atípicas de significado indeterminado)
- LEIBG (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado) ó NIC I/Coilocitosis
- LEIAG (Lesión escamosa intraepitelial de alto grado) ó NIC II-III Ca Insitu
- Carcinoma epidermoide Invasivo
- Adenocarcinoma
- Carcinoma Mixto

Observaciones adicionales: _____

Patólogo _____

*Los criterios para considerar negativo una muestra es la ausencia completa de tinción, positividad focal si aparecen en células aisladas y positividad difusa cuando hay tinción mayor extensión ó área celular

9.6. Informe de Histología

código	EDAD	Gestas	Anticoncepción	Resultado Citología	Impresión Colooscópica

1 BIOPSIA

Informe de Histología	
Tipo de tinción	Hematoxilina Eosina
Tipo de muestra	Inmunohistoquímica P16
<input checked="" type="radio"/> Biopsia	
<input type="radio"/> Biopsia y Legrado <u>endocervical</u>	
<input type="radio"/> Cono cervical	
Descripción:	_____

Diagnóstico	
<input type="radio"/> Normal / <u>negativo</u> / <u>cervicitis</u> / <u>Metaplasia</u>	
<input type="radio"/> LEIBG(NICI/ <u>Coilocitosis</u>)	
<input type="radio"/> LEIAG (NIC II-III/ <u>CA Insitu cervical</u>)	
<input type="radio"/> Cáncer <u>epidermoide microinvasivo</u>	
<input type="radio"/> Cáncer <u>epidermoide Invasivo</u>	
<input type="radio"/> Adenocarcinoma	
<input type="radio"/> Carcinoma Mixto	
<input type="radio"/> Carcinoma Endócrino	
Médico Patólogo	_____

9.7. Base de datos de pacientes en Excel.

The screenshot shows the Microsoft Excel 2012 interface. The title bar reads "Datos Casos INCAN 2012.xls". The ribbon includes "Inicio", "Diseño", "Tablas", "Gráficos", "SmartArt", "Fórmulas", "Datos", and "Revisar". The ribbon tabs are "Inicio", "Diseño", "Tablas", "Gráficos", "SmartArt", "Fórmulas", "Datos", and "Revisar". The ribbon content includes "Editar", "Fuente", "Alineación", "Número", "Formato", "Celdas", and "Temas". The ribbon content includes "Pegar", "Fuente", "Alineación", "Número", "Formato", "Celdas", and "Temas". The ribbon content includes "Pegar", "Fuente", "Alineación", "Número", "Formato", "Celdas", and "Temas".

1	Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
2	No de Registro	nombre	Resultado Citología INICIAL	Resultado de Histología Biopsia	SE EFECTUÓ CONO	Resultado Citología Test Dual grupo A	Resultado Citología Test Dual grupo B	resultado Citología Test Dual grupo C	Impresión Colposcópica	Resultado Histología Cono
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										
32										
33										
34										

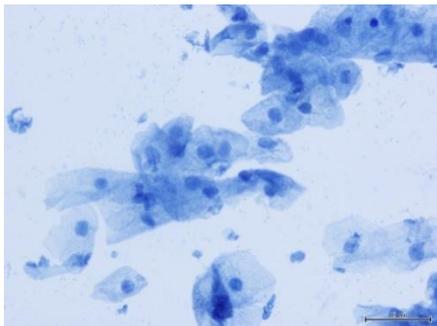
The status bar at the bottom shows "Vista normal", "Listo", and "Suma=0".

9.8. Atlas de tinciones con inmunohistoquímica de exfoliados y biopsias cervicales.

Fotos obtenidas de las muestras procesadas en la Facultad de Ciencias médicas- USAC

CITOLOGÍA

CAMBIOS BENIGNOS O INFLAMATORIOS



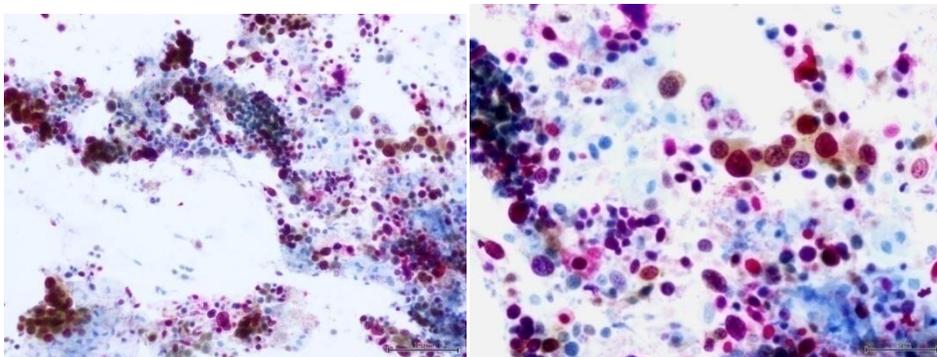
Relación núcleo citoplasma normal, presencia ó no de bacterias ó flagelados

LEIBG

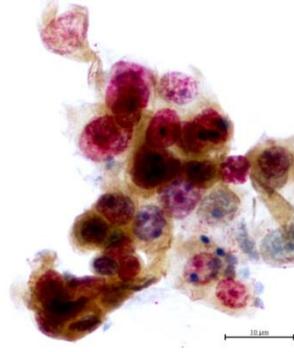
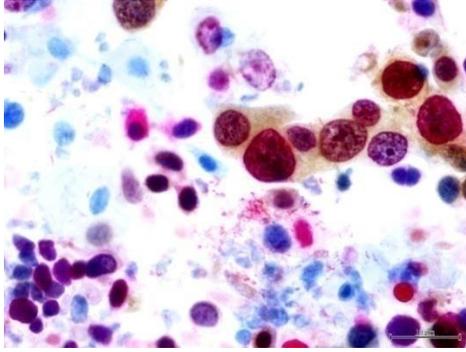


Presencia de células con núcleo rodeado de halo blanco (Coilocitosis)

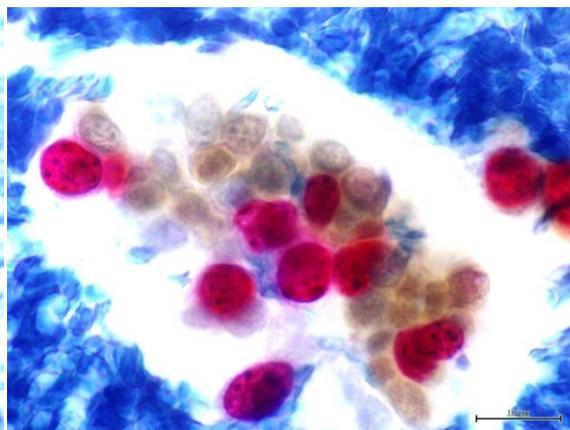
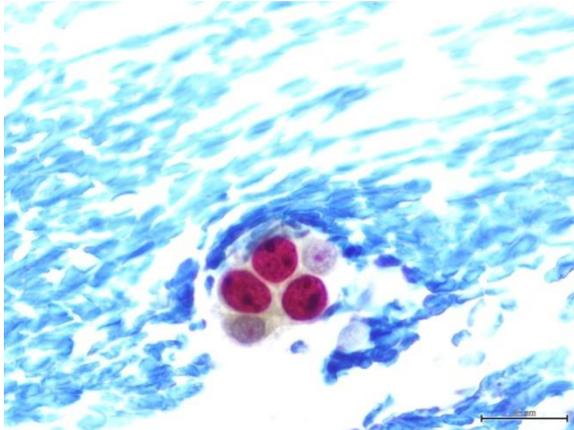
LEIAG



Tinción de núcleos color rojo y citoplasma color café marrón (positivo para P16 y Ki67)



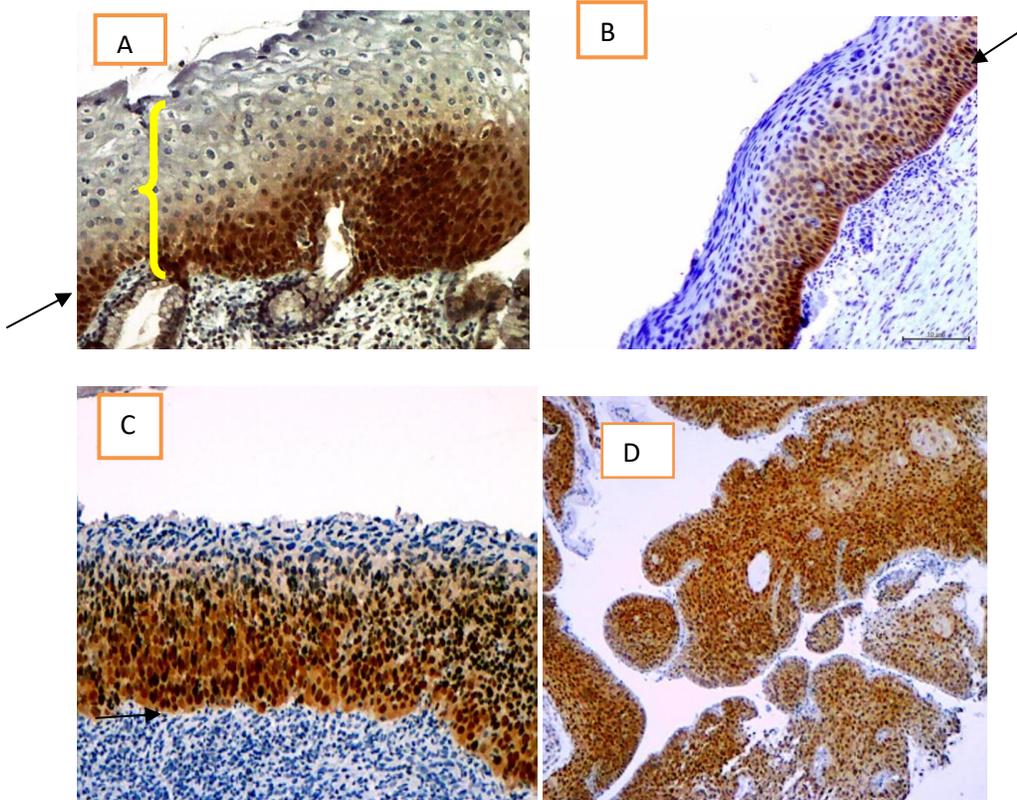
Observe la pérdida relación núcleo citoplasma, los núcleos se ven más grandes y hay nucléolos



Observe los núcleos rojos con nucléolos más oscuros dentro del mismo

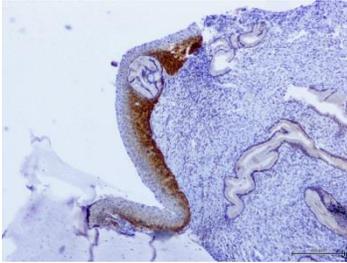
HISTOLOGÍA

Cortes de biopsias del cérvix con Inmunohistoquímica P16

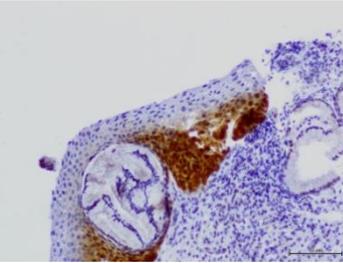


Biopsias del cérvix. Teñidas con inmunohistoquímica la proteína P16, se observa color marrón citoplasma y núcleo de las células transformadas. Se muestran Lesiones preinvasivas (aquellas que no atraviesan la capa basal y se encuentran en el epitelio únicamente, ver las flechas señalan la capa basal y las llaves el epitelio) y la Invasiva (aquella que ya penetra ó invade la capa basal). Dentro de las lesiones preinvasivas se clasifican 2 tipos de bajo y alto grado dependiendo del grosor epitelial afectado. Ver imagen A es de bajo grado (afecta sólo tercio inferior del epitelio); imágenes B y C afectan más del tercio inferior. Por último la imagen D es Cáncer invasivo no se preservan los límites del epitelio, penetrando la capa basal. Fotos de Investigación del Dr. Alberto García G, Centro de Investigación Biomédica/Facultad de Ciencias Médicas USAC. Proyecto Fodecyt No 75-2012

LEIAG

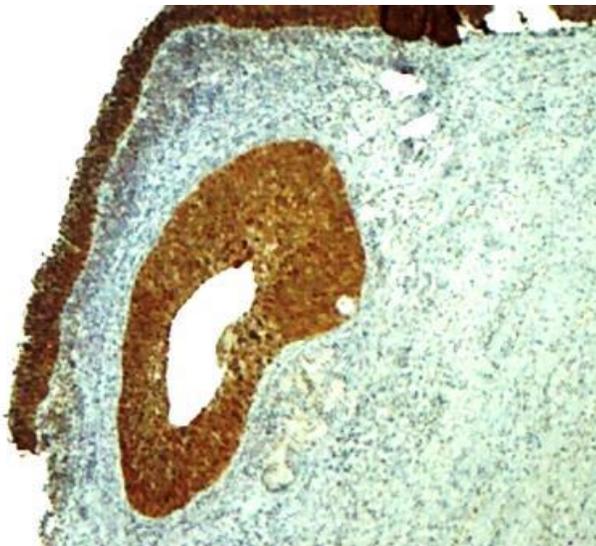


Aumento 10X



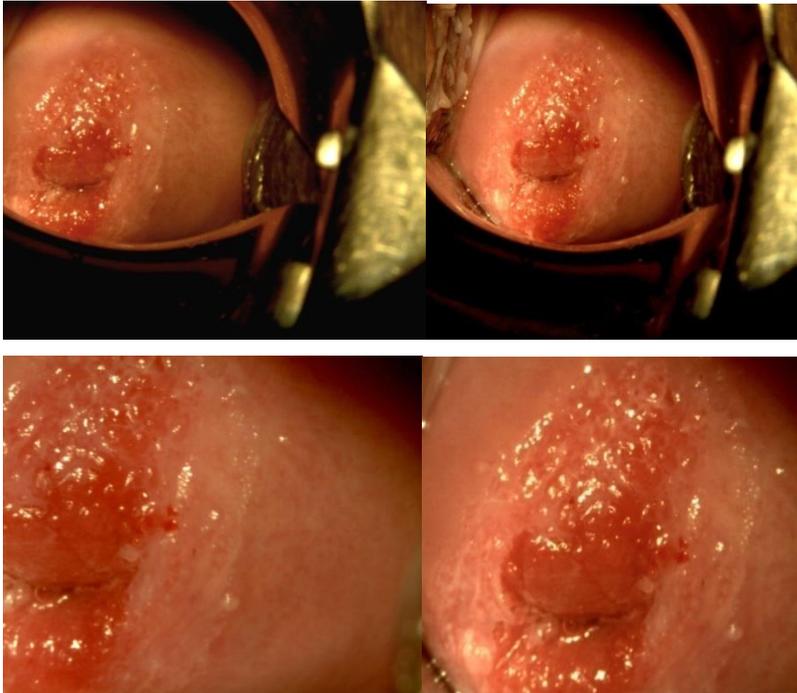
Aumento 20X

LEIAG CON EXTENSIÓN GLANDULAR



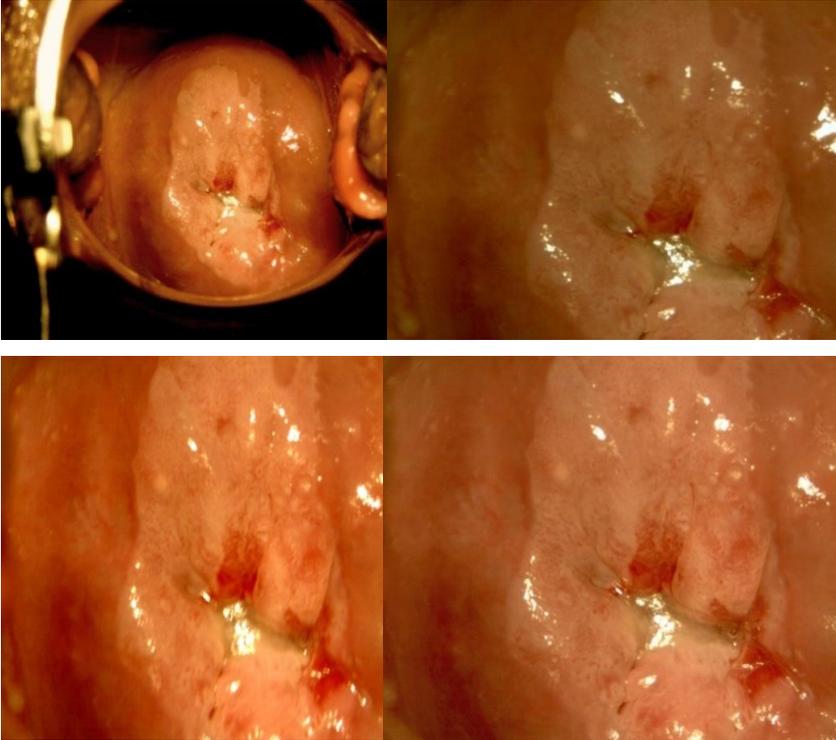
IMÁGENES POR COLPOSCOPIA

POCO SIGNIFICATIVA



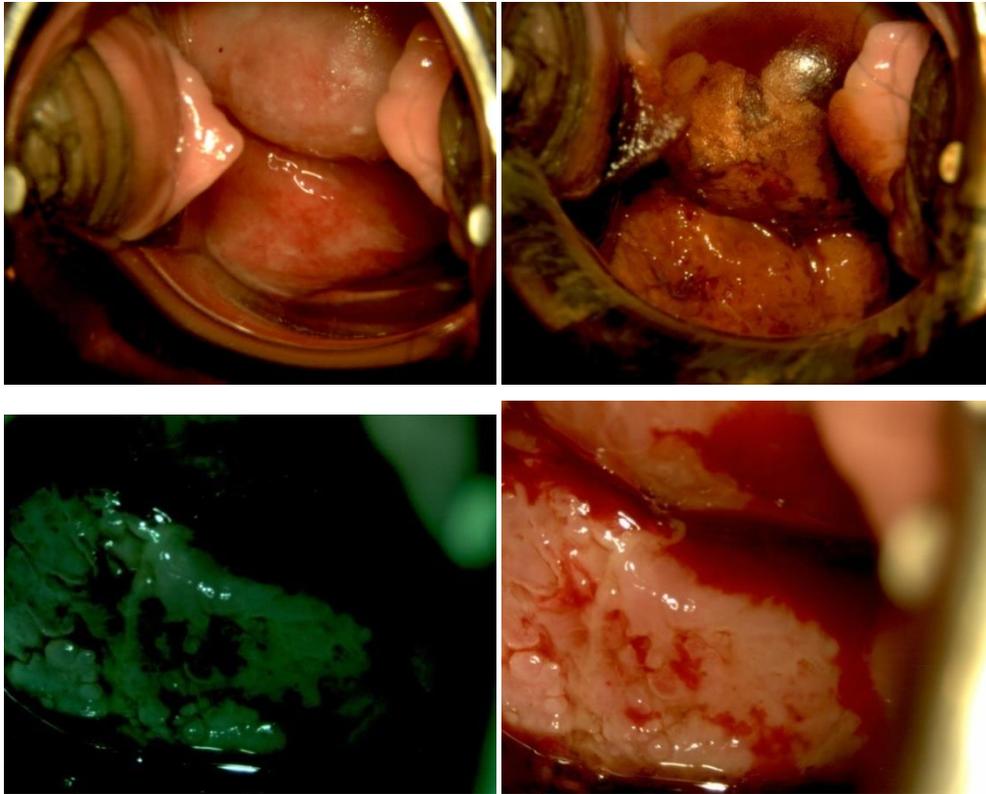
Zonas blancas tenues, asociados o no a ectopía

COLPOSCOPIA SIGNIFICATIVA



Epitelio acético blanco asociado a vasos tipo mosaico y/o base grueso

COLPOSCOPIA MUY SIGNIFICATIVA



Epitelio perdida la continuidad, epitelio blanco grisáceo, vasos atípicos,

El autor concede permiso para reproducir total o parcialmente y por cualquier medio la tesis titulada **“VALOR DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA P16 INK4A – KI67 EN CITOLOGÍAS ANORMALES DE PACIENTES QUE CONSULTAN A LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA”** para propósitos de consulta académica. Sin embargo, quedan reservados los derechos de autor que confiere la ley, cuando sea cualquier otro motivo diferente al que se señala lo que conduzca a su reproducción o comercialización total o parcial.