

---

---

## **Detección de virus papiloma humano (HPV) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida. Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p16INK4a.**

*Morelva Toro de Méndez<sup>1</sup> y Antonio Ferrández Izquierdo<sup>2</sup>.*

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

<sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Sección de Citopatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, España.

**Palabras clave:** citología líquida, HPV, p16INK4a, anormalidades celulares, patología cervical.

**Resumen.** La citología del cuello uterino en base líquida mejora la calidad de la muestra y el material residual podría ser utilizado para realizar pruebas complementarias, como la detección del virus papiloma humano (HPV) y estudio inmunocitoquímico de biomarcadores. El propósito de este estudio fue correlacionar la presencia de HPV y la inmunoexpresión de p16INK4a en las muestras citológicas en base líquida para examinar la utilidad de estas nuevas herramientas en la detección de cáncer de cuello uterino. Las pacientes incluidas (n=67) presentaban una citología anormal o patología cervical previa. La detección y genotipificación de HPV se realizó con PCR-SPF10/LiPA (*INNOLiPA Extra Amp*) y para la inmunodetección de p16INK4a se utilizó el anticuerpo clon E6H4. La citología convencional proporcionó los mismos hallazgos citológicos que la citología en base líquida. La prevalencia general del HPV fue de 43,3% (29/67). El HPV16 fue el tipo viral más frecuente (31,03%) y el 48,3% de los casos presentó infección múltiple. En el 35,8% de las muestras cervicales se detectó inmunoexpresión de la p16INK4a y ésta fue significativamente ( $p < 0,020$ ) asociada a la presencia de HPV. Estos resultados apoyan la evidencia que la implementación de nuevas tecnologías en la rutina diaria del laboratorio contribuye significativamente en la detección precoz del cáncer de cuello uterino y en el aporte de datos importantes para facilitar en el manejo clínico adecuado de la paciente. La detección de HPV combinada con la p16INK4a podría ser utilizado en la evaluación de pacientes con mayor riesgo a desarrollar lesiones cervicales significativas.

**Detection of human papilloma virus (HPV) in liquid-based cervical samples. Correlation with protein p16INK4a expression. *Invest Clin* 2011; 52(1): 3 - 14.**

**Key words:** liquid cytology, HPV, p16INK4a, cellular abnormalities, cervical pathology.

**Abstract.** The liquid-based cervical cytology improves the quality of the sample and the residual sample could be used efficiently to carry out complementary tests, such as the detection of HPV DNA and the immunocytochemical biomarkers study. The purpose of this study was to correlate the presence of HPV and immunorexpression of p16INK4a in liquid-based cervical samples to examine the utility of these new tools in the detection of cervical cancer. The included patients (n=67) presented an abnormal cytology or previous cervical pathology. The HPV detection and genotyping were carried out with PCR-SPF10/LiPA (INNOLiPA Extra Amp) and for p16INK4a immunodetection was used antibody clone E6H4. The conventional cytology provided the same cytologic interpretations that those of liquid-based cytology. The overall HPV prevalence was 43.3% (29/67). HPV16 was the most frequent viral type (31.03%) and 48.3% of the cases were infected with multiple HPV types. p16INK4a immunorexpression was observed in 35.8% of liquid-based cytological samples and this was significantly ( $p < 0.020$ ) associated to the HPV presence. These results support the evidence that the implementation of new technologies in the daily routine of the laboratory, contribute significantly in the early detection of cervical cancer and provide important data to help in the patient's efficient management. The combined use of HPV detection and p16INK4a expression could be used for evaluation of patients with more risk to develop significant cervical lesions.

*Recibido: 28-04-2010. Aceptado: 15-07-2010.*

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa de mortalidad femenina a nivel mundial, con una elevada incidencia en países subdesarrollados constituyendo un problema de salud pública (1). El frotis citológico se ha utilizado amplia y efectivamente para la pesquisa del cáncer de cuello uterino a nivel mundial disminuyendo notablemente la mortalidad por este tipo de neoplasia. Actualmente, se continúa utilizando la citología como método para la detección precoz de esta neoplasia. Sin embargo, re-

sultados citológicos inexactos, relacionados con errores de muestra y preparaciones citológicas no óptimas son un asunto por resolver para así mejorar la pesquisa de las lesiones cervicales (2).

Nuevas tecnologías como la citología en medio líquido, la tipificación del virus papiloma humano (HPV por sus siglas en inglés) y el estudio de biomarcadores se han introducido para aumentar la eficiencia de la detección de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras e identificar las pacientes de alto riesgo a desarrollar lesión clínicamente significativa. La citología en

base líquida es un método de preparación de muestras celulares introducido en 1996 para reducir la proporción de muestras inadecuadas para estudio citológico mejorando de esta forma la sensibilidad y especificidad en la detección de anomalías celulares, al obtener muestras libres de artefactos para una mejor evaluación microscópica. Además, el material residual puede ser utilizado para realizar pruebas complementarias como la detección de DNA de HPV y estudio inmunocitoquímico de biomarcadores (3-5).

El sistema en base líquida proporciona muestras de excelente calidad, con buena preservación del material celular y libre de elementos que pudieran interferir en la lectura del frotis como sangre y células inflamatorias permitiendo una mayor detección de células anormales y aumentando así la exactitud diagnóstica, al reducir los resultados citológicos falsos negativos. Su gran ventaja es la utilización del material residual para pruebas complementarias al estudio morfológico. La principal desventaja señalada es su elevado costo (6, 7).

El cáncer invasor de cuello uterino esta precedido por un espectro de lesiones intraepiteliales. Ciertos tipos de HPV de alto riesgo oncogénico (HR-HPV), como los tipos HPV 16 y 18, entre otros son considerados el factor inductor de la carcinogénesis cervical y la causa necesaria para el desarrollo del cáncer (8, 9). Como parte de los programas de control de cáncer cervical, la detección temprana de esta infección permite un adecuado manejo de la paciente dependiendo del tipo viral involucrado, para prevenir el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) y cáncer (10, 11).

Los HR-HPV interactúan con las principales proteínas reguladoras del ciclo celular (proteína Retinoblastoma/pRb y la p53) provocando su inactivación funcional, con la consecuente transformación celular y origen de la neoplasia maligna (12). La oncoproteína E7 de los HR-HPV se une específi-

camente a la pRb, lo cual conduce a la liberación del factor de transcripción E2F. En las células normales, la proteína inhibidora de quinasas dependiente de ciclina p16INK4a desacelera el ciclo celular mediante inactivación de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), que se encargan de fosforilar a la pRb. En su estado hipofosforilado, la pRb forma un complejo con el factor E2F, con el consecuente efecto negativo sobre la p16INK4a. La pérdida funcional de pRb conduce a la sobreexpresión de la p16INK4a y a la proliferación celular descontrolada (13). Por ello, la p16INK4a es considerada un biomarcador con elevada sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo de HSIL con expresión activa de oncogenes de HR-HPV (14, 15).

Estas nuevas metodologías han servido como complemento al estudio morfológico de las células del cuello uterino siendo útiles en el mejoramiento de su exactitud diagnóstica y aumentando la detección de pacientes de mayor riesgo a desarrollar lesiones clínicamente significativas (16, 17).

El objetivo de este estudio fue correlacionar la presencia de HPV y la inmunexpresión de la p16INK4a en las muestras citológicas en base líquida para examinar la utilidad de estas nuevas herramientas en la detección de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

Se incluyeron las muestras celulares obtenidas de pacientes que acudieron a la consulta de ginecología del Hospital Clínico de Valencia, del Instituto Valenciano de Oncología (IVO) y del ambulatorio de Masamagrell, en Valencia, España, desde el 15 de julio hasta el 15 de septiembre de 2008, por presentar antecedentes de patología cervical o citología anormal. Las pacientes fueron informadas sobre el estudio y fueron

incluidas aquellas que aceptaron participar en el mismo. A cada paciente se le tomaron 2 muestras cervicales: una para elaboración de frotis citológico convencional con espátula de Ayre y *cytobrush* y fijación inmediata con *cytofix* y una segunda muestra para citología en medio líquido con *cervexbrush*, el cual se enjuagó inmediatamente en el vial con líquido fijador Preserv-Cytec Thin Prep® (Cytec Corporation, Madrid, España). Los datos de cada paciente fueron obtenidos de la solicitud del examen.

### Metodología

**Preparación de las muestras.** Ambos tipos de muestra fueron sometidas a estudio morfológico mediante la técnica de Papanicolaou. Las muestras celulares en base líquida fueron procesadas en el equipo ThinPrep Cytec® (Thin-Prept Processor, Cytec Corporation, Madrid, España). Se prepararon dos extendidos: uno para tinción con Papanicolaou y estudio de la morfología celular de rutina y otro para determinación inmunocitoquímica de la p16INK4a. Los frotis así elaborados se fijaron durante 30 min en etanol absoluto. La interpretación de los hallazgos citológicos en ambos tipos de citologías, convencional y líquida, se realizaron en base a los criterios establecidos por el Sistema Bethesda 2001 para la citología del cuello uterino. El material residual de las muestras celulares en base líquida se utilizó para la detección molecular del HPV. La totalidad del material residual contenido en el Preserecyte-ThinPrep fue trasvasado a un tubo de centrifuga y centrifugado a 13.000 rpm durante 5 min. Se transfirieron 1000  $\mu$ L del concentrado celular a un microtubo rotulado evitando de forma cuidadosa la contaminación cruzada entre las muestras. Se le añadió 1 mL de agua bidestilada a cada microtubo, luego se agitaron en vortex brevemente para resuspender las células y finalmente, las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

**Detección y tipificación de HPV.** La extracción de DNA se realizó de forma tradicional utilizando el método de fenol-cloroformo. 50  $\mu$ L del microtubo con la suspensión celular fueron centrifugados a 12.000 rpm, durante 5 min. El precipitado fue resuspendido en 500  $\mu$ L de solución de lisis compuesta por SDS 0,5%, Tris HCl 10mM pH8, NaCl 0,15M, EDTA 5mM más 25  $\mu$ L de proteinasa K (100  $\mu$ g/mL) y se incubó a  $56^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. El sobrenadante fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la PCR. La calidad del DNA extraído fue comprobada con la amplificación del gen control interferon mediante el uso de los cebadores INF150 DR y DF que generaron un fragmento de 150 pb. La detección del DNA viral se llevó a cabo utilizando el kit de trabajo de INNO LiPA genotyping Extra Amp (Innogenetics, Barcelona, España) y siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Este kit amplifica un segmento de 65 pb de la región L1 del genoma viral, que permite detectar por lo menos 54 tipos distintos de HPV. En cada PCR se incluyeron controles positivos (CPOS) obtenidos a partir de muestras de cuello uterino previamente tipificadas, así como el proporcionado por la casa comercial. Los controles negativos (CNEG) estaban constituidos únicamente por mezcla de reacción y 10  $\mu$ L de agua bidestilada. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 40  $\mu$ L más 10  $\mu$ L DNA problema/CPOS/CNEG. Finalmente, todos los micromicrotubos de reacción fueron ubicados en un termociclador (GeneAmp® PCR system 2700, Applied Biosystem), bajo las siguientes condiciones:  $37^{\circ}\text{C}$  10 min,  $94^{\circ}\text{C}$  9 min, durante 40 ciclos:  $94^{\circ}\text{C}$  30 segundos,  $52^{\circ}\text{C}$  45 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  45 segundos y 10 min a  $72^{\circ}\text{C}$  para extensión final. Los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 3%. Para la tipificación de las secuencias virales presentes fue utilizado el ensayo de INNO-LiPA HPV genotyping *Extra*, que permite la identi-

cación de 28 tipos específicos de HPV, de bajo y alto riesgo.

**Detección inmunocitoquímica de p16INK4a.** Las muestras celulares fueron rehidratadas con agua destilada. La recuperación antigénica se llevó a cabo con un tampón de citrato 1:10 en un baño a 95°C. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente, la peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3%. Luego, a los tubos se le añadieron 200  $\mu$ L del anticuerpo primario anti-p16INK4a clon E6H4 (Dako) dilución 1:50 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguido, se colocaron 500  $\mu$ L del anticuerpo secundario comercial (Dako) durante 15 minutos y el complejo avidina-biotina comercial (Dako) durante 15 minutos. Finalmente, la reacción fue revelada con diaminobenzidina (DAB) durante 10 minutos y se realizó una contra tinción con hematoxilina de Harris, durante 30 segundos. La evaluación se efectuó con un microscopio de luz considerando los patrones de tinción en las diferentes células epiteliales normales y anormales (18, 19). Las muestras citológicas fueron consideradas positivas si presentaban más de 10 células bien preservadas con tinción marrón nuclear y/o citoplasmática. Las células inflamatorias, bacterias y moco con tinción no fueron tomadas en cuenta.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el paquete SPSS 12.0 y la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) fue utilizada para la correlación de las variables. Un valor *p* igual a 0,05 o menor fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

Se incluyeron 67 muestras citológicas del cuello uterino tomadas de forma tradicional y en base líquida. La edad de las pa-

cientes osciló en el rango de 20-77 años, con una media de 40,9 años. Algunas muestras (30%) recolectadas de forma tradicional mostraron amontonamiento celular, sangre e inflamación o ausencia de células endocervicales; sin embargo, estas limitantes no afectaron la interpretación citológica, ya que los resultados de éstas coincidieron con la interpretación de las muestras recolectadas en base líquida, en la totalidad de los casos. En ambos tipos de muestras se observaron claramente las células características de lesión cervical (Fig. 1). Las citologías fueron clasificadas en: 44 (63,8%) negativas para lesión intraepitelial o malignidad (NLIM), 1 (1,5%) con atipias de origen a determinar (ASC-US), 16 (23,1%) con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y 8 (11,6%) con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). No hubo ningún caso de cáncer invasor. La prevalencia general de la infección por HPV en las muestras celulares fue de 43,3% (29/67). El tipo viral específico más frecuente fue el HPV16 en 9/29 (31,03%) seguido del HPV66 en 2/29 (6,89%). Los tipos HPV18, HPV31, HPV33 y HPV X se presentaron en la misma proporción (3,45%), un tipo viral por caso. El 48,3% (14/29) mostró infección múltiple y esta se presentó en varias combinaciones, sin importar el resultado citológico y predominando los HPV de alto riesgo oncogénico: 6 casos eran NLIM y el resto presentaba anormalidades en células epiteliales. La distribución de la presencia de HPV de acuerdo a los resultados citológicos fue: NLIM 8 casos (18,2%), 1 caso de ASC-US (100%), 12 casos de LSIL (75%) y el 100% de los casos de HSIL (8 casos). Las muestras celulares en base líquida mostraron un mínimo de células inflamatorias y detritus celulares, las células epiteliales se observaron bien preservadas y dispersas sobre el fondo de frotis limpio, lo cual permitió la observación clara de las células inmunorreactivas para p16INK4a. La immuno-

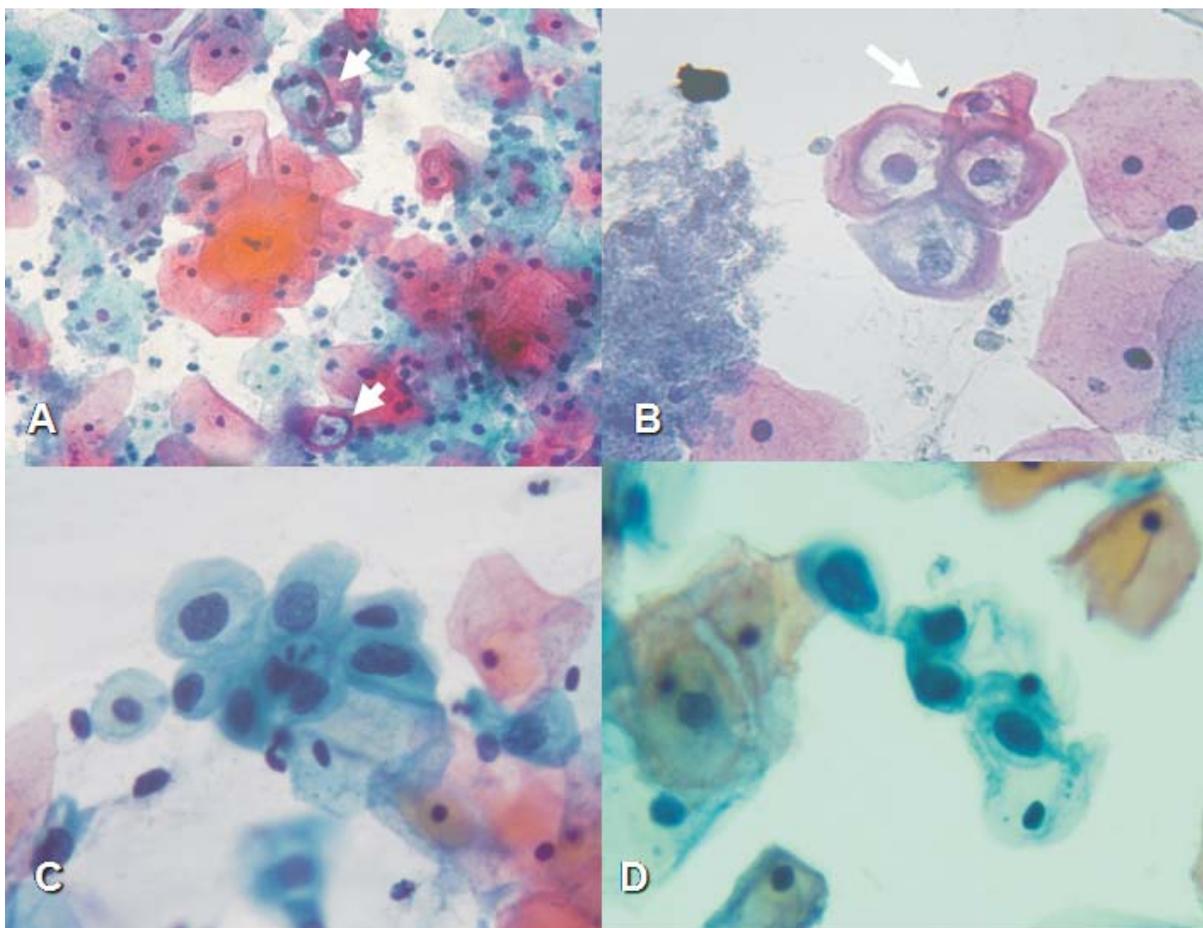


Fig. 1. Imágenes de la citología convencional A (10X), C (40X) y en base líquida B (40X), D (40X). Caso 1. Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado/infección por virus papiloma humano (*LSIL/HPV*): coilocitos (flecha). Caso 2. Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado (*HSIL*): células metaplásicas discarióticas.

rreactividad fue de intensidad variable dependiendo de la presencia de alteraciones morfológicas. Se observó inmunotinción en células inflamatorias, células profundas y de tipo metaplásicas inmaduras morfológicamente sin atipias, así como en bacterias, pero menos intensa que la observada en las células anormales. Se detectó expresión inmunocitoquímica de la proteína p16INK4a en el 35,8% (24/67) de los casos. La inmunonexpresión fue intensa en las células anormales (Fig. 2). Hubo asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,02$ ) entre la expresión de p16INK4a y la presencia de HPV. En aquellas muestras positivas para HPV se

observó expresión de la proteína p16INK4a con mayor frecuencia que en las HPV negativas. De 29 casos HPV positivos, 24 (83%) mostraron inmunorreactividad ante p16INK4a. De 38 casos HPV negativo, sólo 2 (5%) mostraron inmunoreactividad frente a 36 (95%) sin reacción. Al correlacionar el hallazgo citológico con la presencia de HPV y la inmunorreactividad de la p16INK4a (Tabla I) no se encontró correlación entre estas variables ( $p=0,280$ ). Sin embargo, las muestras citológicas NLIM en su mayoría fueron negativas para HPV (36/44) y las pocas células reactivas (4/44) eran metaplásicas inmaduras sin atipias y de intensidad

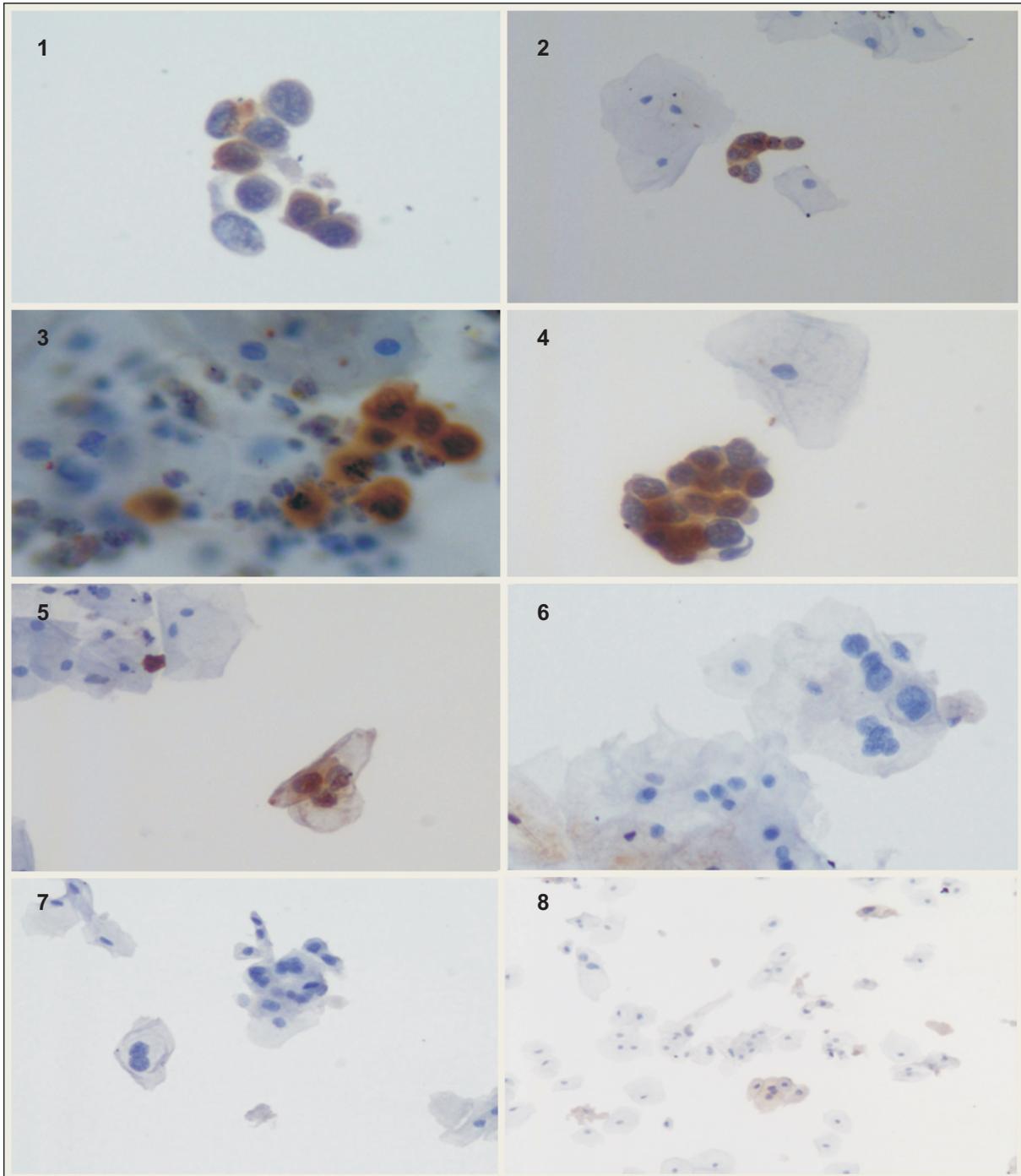


Fig. 2. Inmunocitoquímica. Células inmaduras anormales (*HSIL*) con inmunorreactividad para p16INK4a (1-4), (40X). Dos casos de *LSIL* (5 y 8) y p16INK4 positivos (20X y 10X). El caso de células escamosas con atipias de significado indeterminado/*ASC-US* (6) fue negativo para p16INK4a. Una muestra *LSIL* (7) con coilocitos sin reacción para p16INK4a.

**TABLA I**  
RELACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE p16INK4a, PRESENCIA DE HPV Y HALLAZGOS CITOLÓGICOS

	Nº casos	p16INK4a		HPV	
		Reactivos	Sin reacción	Positivo	Negativo
NLIM	44	4(9%)	<b>40(91%)</b>	8(18,2%)	<b>36(81,8%)</b>
ASC-US	1	-	1(100%)	1(100%)	-
LSIL	14	12(85,7%)	2(14,3%)	12(85,7%)	2(14,3%)
HSIL	8	8(100%)	-	8(100%)	-
Total	67	24	43	29	38

NLIM = negativo para lesión intraepitelial o malignidad. ASC-US = atipias de significado indeterminado. LSIL = lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. HSIL = lesión intraepitelial de alto grado. VPH = virus papiloma humano.

leve. El único caso de ASC-US, aunque positivo para HPV, no mostró reacción para p16INK4a. Los casos HPV positivo/p16INK4a positiva presentaron en su mayoría anormalidades en células epiteliales: 12 LSIL (85,7%) y las 8 HSIL (100%); 4 (9%) casos NLIM/HPV positivo también mostraron expresión de la p16INK4a (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

La citología ha reducido significativamente la morbimortalidad femenina por cáncer de cuello uterino en muchos países. Sin embargo, las discrepancias citohistológicas así como el conocimiento del papel de la infección por HR-HPV en la carcinogénesis cervical han impulsado el desarrollo de nuevas estrategias de pesquisa que contribuyan en el mejoramiento de la detección precoz de esta neoplasia. La implementación de nuevos ensayos complementarios al estudio citológico en la rutina diaria del laboratorio ha significado un mayor avance en el esclarecimiento de los eventos críticos del origen de este cáncer y por ende un aumento en su detección y prevención (14).

La introducción de la citología en base líquida mejora significativamente la calidad

de la muestra a evaluar permitiendo la reducción de resultados falsos negativos, una mayor detección de lesiones intraepiteliales y aprovechamiento del material residual para realizar pruebas moleculares e inmunocitoquímicas complementarias (4, 6).

En el presente estudio, las muestras citológicas en base líquida mostraron un fondo de frotis limpio de moco, sangre y otros elementos enmascaradores y se redujo al mínimo el número de muestras inadecuadas (5, 20). La lectura del extendido fue más rápida, pues el material celular se hallaba reducido a un área circular mínima del frotis, bien preservado y sin superposición celular (21). Se logró una total concordancia en la interpretación de ambos tipos de muestras citológicas (22, 23). El material residual se utilizó para otros ensayos evitando así una nueva toma de muestra a la paciente y demoras en el diagnóstico (22).

La infección persistente por ciertos tipos de HR-HPV se ha establecido como la principal causa del cáncer de cuello uterino y sus precursores (9, 24). La prevalencia general de la infección por HPV varía en un rango que oscila entre el 1,4%-82% dependiendo del área geográfica en relación con las características epidemiológicas de la po-

blación estudiada y de los métodos empleados para la detección del DNA viral (25). En este estudio, el 43,3% de las muestras presentaban HPV, en su mayoría de alto riesgo oncogénico. Probablemente el elevado porcentaje obtenido en este estudio se debió a que las muestras estudiadas pertenecían a pacientes bajo vigilancia por patología cervical previa. Sin embargo, estudios epidemiológicos han revelado que la infección por HR-HPV es muy común, particularmente en pacientes jóvenes (26).

Aunque la prevalencia de la infección por HPV se incrementa con la presencia y el grado de las lesiones cervicales, algunos datos indican que existen variaciones importantes en función de las características de la población estudiada (27). La distribución de los diferentes tipos de HPV en pacientes con cáncer/SIL alrededor del mundo es heterogénea (28), siendo de gran utilidad determinar los tipos de HPV más frecuentes en las diferentes poblaciones, en la era de la vacuna. En este estudio, el tipo viral más frecuente fue el HPV16 (31,3%) tanto en las citologías normales como en las anormales, coincidiendo con lo reportado en la amplia literatura mundial, seguido de otros tipos virales también de riesgo oncogénico como el HPV66, 18, 31, 33 y 58. Además, el HPV16 fue hallado en todas las categorías citológicas, tanto en forma única como en coinfección, al igual que en otras regiones españolas (29). El HPV66 fue el segundo tipo viral más frecuente, lo cual es significativo debido a que este es considerado de probable riesgo oncogénico (9). El HPV18 se presentó en una baja frecuencia (3,45%) así como los HPV31 y 33. Debido a que todos estos tipos virales se han aislado de cáncer y HSIL es necesario conocer su verdadera prevalencia en las distintas regiones geográficas, a fin de definir las necesidades profilácticas de cada región.

La presencia de HPV en muestras citológicamente normales también es muy va-

riable; en las pacientes con citología normal de este estudio fue de 18,2% siendo este porcentaje semejante al encontrado en otras pacientes españolas (28). En los casos con anomalías celulares se encontró HPV en todas las categorías, siendo elevado en las LSIL y HSIL (22, 30). Dos casos de LSIL fueron HPV negativos. Es posible que entre el 5% y el 10% de las LSIL sean negativas para HPV, probablemente debido a resultados moleculares falsos negativos o a una sobrevaloración citológica (41). En este estudio, las causas quizás estuvieron relacionadas con una delección de la región L1 del genoma viral, hipocelularidad o errores técnicos, por lo que a estas pacientes se les debe repetir el análisis molecular para HPV.

La infección por múltiples tipos de HPV es muy común entre la población (29) y tiene un significado controversial en relación a su asociación con el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Al respecto, investigaciones señalan que las pacientes con citología anormal e infección múltiple por HR-HPV podrían considerarse de mayor riesgo para el desarrollo de HSIL y cáncer; así mismo, se considera que la infección múltiple favorece la persistencia de un tipo viral oncogénico específico (31). En este estudio, el 43,3% de las muestras presentaron múltiples tipos de HPV, todos de alto riesgo oncogénico y en diferentes combinaciones. Los tipos virales 31, 33, 45, 51, 56, 58 y 66 fueron los más frecuentemente hallados en coinfección, lo cual debe ser considerado debido a que posiblemente esta asociación de tipos virales de alto riesgo favorezca de algún modo a la carcinogénesis cervical. La prevalencia de infección múltiple por HPV en este estudio fue semejante al porcentaje de otros investigadores, en diferentes áreas geográficas y en los que se incluyen pacientes con citologías anormales (17, 27). Aunque, en un estudio realizado en Colombia a 2.109 pacientes, de distintas regiones del

país y con diferentes condiciones socio-culturales, los autores determinaron que aproximadamente el 60% de ellas tenían infección múltiple señalando que probablemente el uso combinado de cebadores permitió una mayor detección de estos casos (32). Se requiere entonces de investigaciones futuras para revelar la verdadera importancia de la coinfección viral, a fin de contribuir en el esclarecimiento de su participación en el desarrollo del cáncer cervical.

Se considera que la p16INK4a puede ser un marcador predictivo de la presencia de células transformadas por HPV y de lesiones clínicamente significativas (19, 33, 34) y que su detección puede ser útil para el diagnóstico y en la detección de verdaderas lesiones intraepiteliales (33). En el presente estudio, la expresión de la p16INK4a se observó en el 35,8% de las muestras estudiadas y la mayor proporción de casos eran SIL. El único caso de ASC-US de este estudio aunque positivo para infección múltiple de HR-HPV, no expresó la p16INK4a, probablemente debido a que el DNA viral se encontraba en estado episomal, no integrado. Por ello, es necesario estudiar un mayor número de pacientes para determinar la utilidad del análisis de p16INK4a en frotis atípicos.

En este estudio encontramos asociación estadísticamente significativa entre las células anormales con expresión de p16INK4a y la presencia HR-HPV, lo cual confirma la utilidad de esta proteína en la identificación de células transformadas por el HPV (17, 35). Sin embargo, hallamos casos con sobreexpresión de p16INK4a y ausencia de HPV; probablemente esta inmunoreactividad se debió a mecanismos no relacionados con el HPV, a dificultades en la interpretación de los resultados inmunocitoquímicos o a que el método molecular no detectó el HPV presente (16, 20). Caso contrario también ocurrió: p16INK4a negativa/HPV positivo, lo cual pudo deberse a la

presencia de HR-HPV no integrado, HPV de bajo riesgo oncogénico o probablemente debido a una metilación del gen p16INK4a, sin expresión del mismo por silenciación genética (16). Finalmente, es posible que en los casos con anomalías celulares no existieran células inmunorreactivas, debido a que en la muestra quedaron muy pocas células anormales o ninguna (20). En cualquiera de los casos, deben repetirse las pruebas a fin de confirmar los resultados en correlación con los hallazgos citológicos. Nuestros resultados reafirman la utilidad del estudio de la expresión de la p16INK4a en la pesquisa de las lesiones del cuello uterino, ya que muestra elevada especificidad diagnóstica (18). Sin embargo, es conveniente realizar el seguimiento de las pacientes con positividad para este biomarcador, a fin de determinar su valor predictivo, lo cual será objeto de investigaciones futuras.

En conclusión, estos hallazgos apoyan la evidencia que la implementación de nuevas tecnologías en la rutina diaria del laboratorio contribuye significativamente en la detección precoz del cáncer de cuello uterino aportando datos importantes, que favorecen el manejo clínico apropiado de la paciente. La detección de HPV combinada con la p16INK4a podría utilizarse para la evaluación de pacientes con mayor riesgo a desarrollar lesiones significativas del cuello uterino.

#### AGRADECIMIENTO

Al personal médico del Hospital Clínico de Valencia, del Instituto Valenciano de Oncología y del Ambulatorio de Massamagrell. A las pacientes.

Este trabajo fue financiado en su totalidad por el Vicerrectorado de Política Científica e Investigación de la Universidad de Valencia. España. Código del proyecto: UV-ESTPC-08-2421.

## REFERENCIAS

1. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA J Clin* 2005; 55:74-108.
2. **Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME, Herrero R, Alfaro M, Bratti MC, Hildesheim A, Lorincz AT, Greenberg MD, Morales J, Schiffman M.** Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening. *Cancer* 1999; 87:48-55.
3. **Bernstein SJ, Sanchez-Ramos L, Ndujisi B.** Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:308-317.
4. **McGoogan E.** Liquid-based cytology: the new screening test for cervical cancer control. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2004; 30:123-125.
5. **Harrison WN, Teale AMJ, Jones SP, Mohammed MA.** The impact of the introduction of liquid based cytology on the variation in the proportion of inadequate samples between GP practices. *BMC Public Health* 2007; 7:191-195.
6. **Linder J, Zahniser D.** The ThinPrep Pap test. A review of clinical studies. *Act Cytol* 1997; 41:30-38.
7. **Giménez Mas JA, Sanz Moncasi P, Alfaro Torres J, Hörndler C, Urbiola Marcilla E.** Evaluación de dispositivos automatizados para diagnóstico citológico en la prevención del cáncer de cérvix. *Rev Esp Patol* 2002; 35:301-314.
8. **zur Hausen H.** Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-350.
9. **Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ.** International Agency for Research on Cancer Multi-center Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
10. **Molijn A, Kleter B, Quint W, van Door LJ.** Molecular diagnose of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl 1):543-551.
11. **Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE.** Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 2006; 103:12-17.
12. **Clarke B, Chetty R.** Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001; 82:238-246.
13. **Serrano M.** The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997; 237:7-13.
14. **von Knebel Doeberitz M, Syrjänen KJ.** Molecular markers: How to apply in practice. *Gynecol Oncol* 2006; 100:18-20.
15. **Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M.** Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 2007; 11:58-66.
16. **Samama B, Schaeffer C, Boehm N.** P16 expression in relation to human papillomavirus in liquid-based cervical smears. *Gynecol Oncol* 2008; 109:285-290.
17. **Schledermann D, Andersen BT, Bisgaard K, Dohse M, Ejersbo D, Hoelund B, Horal P, Lindh M, Ryd W.** Are adjunctive markers useful in routine cervical cancer screening?. Application of p16INK4a and HPV-PCR on ThinPrep samples with histological follow-up. *Diagn Cytopathol* 2008; 36:453-459.
18. **Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K.** Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINTec p16INK4a assay. *Cancer* 2007; 111:83-92.
19. **Trunk M, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Ulrich K, Ikenberg H, Schneider V, von Knebel Doeberitz M.** Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol* 2004; 48:771-782.
20. **Pientong CH, Ekalaksananan T, Kongnyoues B, Kritpetcharat O, Swadpnich U, Pengsa P, Yuenyao P.** Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human

- papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31:235-242.
21. **Schledermann D, Ejersbo D, Hoelund B.** Improvement of diagnostic accuracy and screening conditions with liquid-based cytology. *Diagn Cytopathol* 2006; 34:780-785.
  22. **Zuna RE, Moore W, Dunn ST.** HPV DNA testing of the residual sample of liquid-based Pap test: utility as a quality assurance monitor. *Mod Pathol.* 2001; 14: 147-151.
  23. **Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J.** Liquid compared with conventional cervical cytology a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2008; 111:167-177.
  24. **Toro M.** Caracterización inmunofenotípica del cáncer de cuello uterino asociado a la infección por HPV. [Tesis Doctoral]. Universidad de Valencia. España; 2006.
  25. **de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007 7(7):453-459.
  26. **Daltein V, Riethmuller D, Pretet J-L.** Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal french cohort study. *Int J Cancer* 2003; 106:396-403.
  27. **Capra G, Giovannelli L, Bellavia C, Migliore MC, Caleca MP, Perino A, Ammatuna P.** HPV genotype prevalence in cytological abnormal cervical samples from women living in south Italy. *Virus Res* 2008; 133:195-200.
  28. **Bernal M, Burillo I, Ignacio J, Moros M, Benito R, Gil J.** Human papillomavirus (HPV) infection and intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the uterine cervix: a cases-controls study in Zaragoza, Spain. *Infect Agent Cancer* 2008; 3:8-14.
  29. **Gómez-Román JJ, Echevarria C, Salas S, González-Morán MA, Pérez-Mies B, García-Higuera I, Nicolás-Martínez M, Val Bernal JF.** A type-specific study of human papillomavirus prevalence in cervicovaginal samples in three different Spanish regions. *APMIS* 2009; 117:22-27.
  30. **Ronco G, Cuzick J, Signan N.** HPV triage for low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Eur J Cancer* 2007; 43:476-480.
  31. **Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, Roccio M, Diletta Dacco M, Silini EM.** Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol* 2009; 113:115-119.
  32. **Soto-De León SC, Camargo M, Sánchez R, León S, Urquiza M, Acosta J, Monsalve D, Rodríguez LE, Patarroyo ME, Patarroyo MA.** Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:100-102.
  33. **Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T.** Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 1998; 48:580-585.
  34. **Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ.** Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4a antigen in thin-layer liquid-based specimens. *Act Cytol* 2002; 46 25-29.
  35. **Sahebali S, Depuydt CE, Boulet GA, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marek EA, Bogers JJ.** Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer* 2006; 118: 1254-1260.