



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

“Utilidad de las tinciones de Inmunohistoquímica p16 y Ki67 para la reclasificación de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC 2) como lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de bajo o alto grado en el Centro Médico Naval entre los años 2012-2019”

"Usefulness of p16 and Ki67 Immunohistochemical stains for the reclassification of cervical intraepithelial neoplasms (NIC 2) as low or high grade squamous intraepithelial lesions (LIE) at the Naval Medical Center between the years 2012-2019"

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO
DE ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

AUTORA

LIS NATIVÉ ZELADA HERNANDEZ

ASESOR

NAZARIO AUGUSTO ORTIZ MUCHOTRIGO

CO-ASESOR

ANGÉLICA ASECIO AGUEDO

LIMA – PERÚ

2020

2. RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es una de las neoplasias más frecuentes que afecta a mujeres, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial y el segundo en América Latina. El mayor porcentaje se produce en los países en vías de desarrollo, lo que se atribuye a los precarios programas de prevención y detección de las lesiones precursoras.

El Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología cervical han publicado una serie de recomendaciones con la finalidad de unificar la terminología de las lesiones del tracto anogenital asociadas al Virus del Papiloma Humano (VPH). Una de sus recomendaciones es utilizar una terminología de dos niveles: Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, en lugar de la clasificación de 3 niveles anteriormente utilizada (NIC 1, NIC 2, NIC 3) ya que el NIC 2 fue considerado una lesión biológicamente equívoca que caía entre los cambios morfológicos de la infección por VPH y las lesiones precursoras del Carcinoma de células escamosas. La misma terminología es utilizada en la última edición publicada de Organización mundial de la salud sobre la clasificación de los tumores del tracto genital femenino.

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo determinar la utilidad de las tinciones de Inmunohistoquímica p16 y Ki67 para la reclasificación de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC 2) como lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de bajo o alto grado, para lo cual utilizaremos la base de datos del servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico Naval "Cirujano Mayor Santiago Távora", en la que seleccionaremos las biopsias que fueron diagnosticadas como NIC 2 durante los años 2012 al 2019.

Al utilizar el p16 y Ki67 la evaluación de los NIC 2 será más certera y podremos clasificar de manera eficaz las biopsias como de LIE de bajo o alto grado, con lo que tendremos un grupo de pacientes que se beneficiarán ya que no serán sobre tratadas ni sub tratadas; lo cual tendrá un impacto social y económico

Palabras clave: Lesión escamosa intraepitelial, p16, Ki67

3. INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización mundial de la salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el cáncer de cérvix es la cuarta neoplasia más frecuente en mujeres en todo el mundo y el mayor porcentaje de estos casos se produce en los países menos desarrollados; en América latina esta neoplasia ocupa el segundo lugar, lo cual es atribuido a los precarios programas de prevención y detección de las lesiones precursoras. (1) (2)

Las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino tardan muchos años en aparecer, y cuando se detectan tempranamente pueden tratarse en forma óptima.

En el año 2003 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) publicó el libro titulado “Clasificación de los tumores de mama y órganos genitales femeninos”, en donde las lesiones precursoras de Carcinoma de células escamosas fueron denominadas Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC), y clasificadas como NIC 1, NIC 2 y NIC 3. (3)

El Colegio Americano de Patólogos (CAP) y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología cervical (ASCCP), en el 2012, publicaron el Proyecto de estandarización de terminología escamosa anogenital inferior para lesiones asociadas al Virus del Papiloma Humano (LAST Project), en donde utilizan el término Lesión escamosa intraepitelial (LIE) bajo grado y Lesión escamosa intraepitelial de alto grado para denominar a los precursores del Carcinoma de células escamosas.

El LAST Project recomienda el uso de esta terminología dual en lugar de la antigua clasificación de tres niveles ya que el NIC 2 fue considerado una lesión biológicamente equívoca que caía entre los cambios morfológicos de la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el precáncer. Para ello recomiendan utilizar los marcadores de inmunohistoquímica p16 y Ki67 cuando estábamos frente a un resultado de NIC 2 (según la antigua terminología). (4)

La marcación inmunohistoquímica de p16 positiva fuerte y en bloque respalda una categorización de la enfermedad como LIE de alto grado (precancerosa) y la tinción débil o en parches como LIE de bajo grado (cambios morfológicos por VPH).

Con respecto al anticuerpo de inmunohistoquímica Ki67 la conclusión es que muestra características operativas similares, pero menos documentadas en comparación con p16 y la recomendación es utilizarlo si el p16 no está disponible o es técnicamente inadecuado (equívoco). (5)

Desde la publicación de las recomendaciones del Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología cervical, la nueva terminología para las lesiones precursoras del Carcinoma de células escamosas del cuello uterino, viene siendo estudiada y ampliamente utilizada.

En tal sentido en el año 2014 la OMS publicó una nueva edición de su libro “Tumores de los órganos reproductores femeninos” de la IARC en donde utilizó la misma clasificación de dos niveles recomendada por la CAP y la ASCCP. (6)

A nivel mundial diversos autores concluyen que las tinciones de inmunohistoquímica p16 y Ki67 proporcionan una gran ayuda para evaluar las biopsias con diagnóstico histológico de NIC 2, además de que presentan una baja tasa de falsos positivos. Esto viene repercutiendo eficazmente en la elección del tratamiento que reciben las mujeres,

ya que los NIC 2 diagnosticados morfológicamente que tienen marcadores de inmunohistoquímica p16 y/o Ki 67 negativo, se comportan como un NIC 1 y por lo tanto es justificable que estas lesiones sean diagnosticadas como lesión escamosa intraepitelial de bajo grado con lo cual no sería necesario someter a las pacientes a tratamiento invasivo (quirúrgico). En cuanto a las biopsias con tinciones de p16 y Ki67 positivas, estas lesiones son diagnosticadas como LIE de alto grado, se comportan como un NIC 3 y presentan mayor riesgo de progresar a cáncer, por lo que necesitan tratamiento invasivo (quirúrgico). (7) (8) (9).

EL Colegio americano de patólogos mantiene un compromiso respecto al monitoreo y actualización de la literatura, al momento las recomendaciones continúan vigentes y son ampliamente utilizadas a nivel mundial, el Perú no es ajeno a éstas.

Sin embargo, en el Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, en la actualidad, aún no se utiliza la nomenclatura recomendada por el LAST Project y el uso de marcadores de inmunohistoquímica para diagnosticar lesiones escamosas de cérvix, no se encuentra estandarizado. Si bien es cierto realizar pruebas de inmunohistoquímica demandan un coste adicional al tratamiento de una biopsia, al utilizar el p16 y Ki67 la evaluación de los NIC 2 será más certera y podremos clasificar de manera eficaz las biopsias como de LIE de bajo o alto grado, con lo que tendremos un grupo de pacientes que se beneficiarán ya que no serán sobre tratadas ni sub tratadas; lo cual tendrá un impacto social y económico

La finalidad de este proyecto de investigación es determinar la utilidad de los marcadores de inmunohistoquímica (p16 y Ki 67) y con ello identificar cuáles de los diagnósticos morfológicos con coloración de Hematoxilina – Eosina (H&E) de NIC 2 en el Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” durante los años 2012 al 2019, serán catalogados como lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y cuáles serán lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado , según lo que indica el LAST Project y la actual clasificación de tumores del tracto genital femenino de la OMS para las lesiones precursoras del cáncer de cérvix.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la utilidad de las tinciones de Inmunohistoquímica p16 y Ki67 para la reclasificación de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC 2) como lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de bajo o alto grado en el Centro Médico Naval entre los años 2012-2019.

ESPECÍFICO

1. Determinar la expresión del p16 y Ki 67 en los casos diagnosticados como NIC 2.
2. Determinar el porcentaje de NIC 2 que serán reclasificados como LIE de bajo grado con la expresión de los marcadores de Inmunohistoquímica p16 y Ki67
3. Determinar el porcentaje de NIC 2 que permanecerán como LIE de alto grado con la expresión de los marcadores de Inmunohistoquímica p16 y Ki67
4. Valorar la sensibilidad y especificidad de las tinciones de Inmunohistoquímica p16 y Ki67 para reclasificar los NIC 2 como LIE de bajo o alto grado.
5. Determinar el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de las tinciones de inmunohistoquímica p16 y Ki67.

5. MATERIAL Y MÉTODO

a) Diseño del estudio

Estudio descriptivo de corte transversal retrospectivo.

b) Población

Todas las biopsias cervicales con diagnóstico de NIC 2 del Centro Médico Naval «Cirujano Mayor Santiago Távara» durante los años 2012-2019.

Criterios de inclusión

- Biopsias cervicales con diagnóstico de NIC 2 realizado durante los años 2012 - 2019 en el Centro Médico Naval «Cirujano Mayor Santiago Távara».

Criterios de exclusión.

- Biopsias cervicales con diagnóstico de NIC 2 cuyos tacos de parafina no se encuentren en el archivo del servicio de Anatomía Patológica.
- Biopsias cervicales con diagnóstico de NIC 2 cuyos tacos de parafina no contengan material suficiente para realizar los cortes histológicos necesarios.

c) Muestra

El tamaño de la muestra serán todas las biopsias con diagnóstico final de NIC 2 que cumplan los criterios de inclusión y exclusión.

d) Definición operacional de variables:

VARIABLES	DESCRIPCION CONCEPTUAL	DIMENCIONES	INDICADORES	INSTRUMENTO
p16	Proteína supresora de tumores	Positivo	Tinción en bloque y fuerte con expresión nuclear y citoplasmática en un segmento continuo de células (al menos 10 células); que debe involucrar capas basales y parabasales.	Tinción de inmunohistoquímica
		Negativo	Tinción debil o en parches	
Ki67	Proteína nuclear relacionada con el ciclo celular prototípico, expresada por células en proliferación.	Positivo	Difusa tinción en todos los estratos epiteliales (desde el basal al superficial)	Tinción de inmunohistoquímica
		Negativo	Tinción de las células de la capa basal, tercio inferior o mitad del epitelio	

NIC	Clasificación de las lesiones precursoras del Carcinoma de células escamosas de cérvix según International Agency for Research on Cancer (IARC) (2003)	NIC 1	La maduración está presente en los dos tercios superiores del epitelio, y las células superficiales contienen atipia variable pero generalmente leve, que puede incluir un efecto citopático viral (coilocitos). Las anomalías nucleares están presentes en todo momento, pero son leves. Las figuras mitóticas están presentes en el tercio basal y no son numerosas, las formas atípicas son raras.	Evaluación histomorfológica
		NIC 2	La maduración está presente en la mitad superior del epitelio, y la atipia nuclear es conspicua en las capas epiteliales superior e inferior. Las figuras mitóticas generalmente se limitan a los dos tercios basales del epitelio, las formas atípicas pueden aparecer.	
		NIC 3	La maduración (incluida la queratinización de la superficie) puede estar ausente o limitada al tercio superficial del epitelio. Las anomalías nucleares están marcadas en la mayor parte o en la totalidad del grosor del epitelio. Las figuras	

			mitóticas pueden ser numerosas y se encuentran en todos los niveles del epitelio. Las mitosis atípicas son frecuentes.	
LIE	Clasificación de las lesiones precursoras del Carcinoma de células escamosas de cérvix según LAST Project	LIE de bajo grado	Lesión del epitelio escamoso que representa la manifestación morfológica de una infección producida por VPH. Bajo grado se refiere al bajo riesgo asociado de cáncer concurrente o futuro.	Evaluación histomorfológica
		LIE de alto grado	Lesión del epitelio escamoso que conlleva un riesgo importante de desarrollo de cáncer invasivo si no se trata.	

d) Procedimientos y técnicas:

Materiales

- Base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico Naval « Cirujano Mayor Santiago Távara »
- Archivo de láminas y bloques de parafina del Centro Médico Naval « Cirujano Mayor Santiago Távara »
- Láminas con carga positiva
- Kit CINtec® p16^{INK4a} (DAKO)
- Anti-Human Ki-67 Antigen Clon MIB-1 (DAKO)
- Micrótopo
- Microscopio óptico
- Laptop
- Hojas bond en tamaño A4
- Microscopio óptico

Instrumentos

- Base datos en el programa de Microsoft Excel 2013, para el procesamiento de los datos obtenidos y los estudios estadísticos.
- Ficha de recolección de datos y diagnóstico final - Anexo 1.

Metodología

Primero se obtendrá el permiso correspondiente de la comisión de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y del Centro Médico Naval « Cirujano Mayor Santiago Távara ». Se solicitará la conformidad del Jefe del servicio de Anatomía Patológica para realizar la búsqueda en la base de datos. Los datos de todas las biopsias con diagnóstico de NIC2 que fueron realizadas durante los años 2012 al 2019 serán recolectados en la Ficha de recopilación de datos y diagnóstico final (Anexo 1); éstos serán ingresados a una base de datos en Microsoft Excel 2013 para su posterior procesamiento.

Luego se procederá a la búsqueda de tacos de parafina y láminas de H&E que corresponden a las biopsias seleccionadas y se realizará dos cortes histológicos de 4 micras en una misma lámina que serán procesados con el kit CINtec® p16^{INK4a} (DAKO) para la demostración por inmunohistoquímica de la proteína p16 y Anti-Human Ki-67 Antigen Clon MIB-1 (DAKO) para la demostración por inmunohistoquímica de Ki67.

Se realizará una técnica de doble tinción de inmunohistoquímica haciendo uso del mismo sistema enzimático y revelado con distintos cromógenos. Se utilizará primero el marcaje con DAB (color marrón) y segundo el marcaje con AEC (color rojizo)

Las láminas obtenidas serán evaluadas teniendo en cuenta la presencia y el tipo de marcación inmunohistoquímica.

Dicha evaluación será realizada por un médico anatomopatólogo con un mínimo de 5 años de experiencia en el área de ginecopatología.

Los resultados se colocarán en la ficha de recopilación de datos y el diagnóstico final (Anexo 1); luego serán ingresadas a la base de datos de Microsoft Excel 2013 para su posterior análisis estadístico.

e) Aspectos éticos del estudio

La investigación se desarrollará realizando una revisión de los informes patológicos obtenidos de la base de datos de Anatomía Patológica para lo cual se obtendrá la autorización del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y del Centro Médico Naval « Cirujano Mayo Santiago Távara »; así como el permiso del Jefe del Servicio de Anatomía Patológica. Éste es un estudio retrospectivo por lo cual no representa riesgo alguno para las pacientes. Se protegerá la confidencialidad de las biopsias al utilizar códigos propios para la investigación, así mismo se resguardarán las bases de datos generadas limitando el acceso a ellas a través de contraseñas.

f) Plan de análisis

Los datos que se obtengan se ingresarán a la base de datos de Microsoft Excel 2013, realizando un control de calidad en la digitación, a través de la doble revisión de los mismos. Se reportará las variables cualitativas con tablas de distribución de frecuencias y porcentajes; el análisis descriptivo será presentado mediante gráficos, se utilizará diagramas circulares.

Para el análisis de los datos se utilizará el paquete estadístico STATA 11.O, calculando la especificidad, la sensibilidad, el valor predictivo positivo y negativo. Teniendo un nivel de significación de 0.05.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino [Internet]. Francia: Recursos en línea de la Organización mundial de la salud [Actualizado 2020 marzo 11; citado: 2020 julio 1]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
2. El cáncer cervicouterino es el tercero más frecuente entre las mujeres de América Latina y Caribe, pero se puede prevenir. [Internet]. Washington: Recursos en línea de la Organización panamericana de la salud [Actualizado 2019 febrero 1; citado: 2020 julio 01]. Disponible en:

https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=4239

3. Tavassoli F, Devilee P. Editores. Pathology and Genetics of Tumours of Breast and Female Genital Tumours. Francia: Organización mundial de la salud; 2003.
4. Darragh T., Colgan T., Cox T, Heller D., Henry M., Luff R., *et al.* The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Archives of Pathology and Laboratory Medicine [en línea]. 2012. Octubre [citado: 2020 julio 1]; 136(10): [31 p.]. Disponible en: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/136/10/1266/133088/The-Lower-Anogenital-Squamous-Terminology>
5. Darragh T., Wilbur D., editores. Lower Anogenital Squamous. [Internet]. San Francisco: Colegio Americano de Patólogos; 2012 [citado: 2020 julio 1]. Disponible en: <https://documents.cap.org/documents/lower-anogenital-squamous-terminology-teaching.pdf>
6. In Kurman R, Carcangui L. Editores. Female Reproductive Organs. Francia: Organización mundial de la salud; 2014.
7. Thrall M. Effect of Lower Anogenital Squamous Terminology Recommendations on the Use of p16 Immunohistochemistry and the Proportion of High-Grade Diagnoses in Cervical Biopsy Specimens. American Journal of Clinical Pathology [en línea]. 2016. Abril [citado: 2020 julio 1]; 145(4): [6 p.]. Disponible en: <https://academic.oup.com/ajcp/article/145/4/524/2195457>
8. Rosado J. Utilidad del P16 y Ki67 en el manejo del NIC2 Centro Médico Oncomujer 2013 - 2015 [Tesis para optar el grado de maestro en medicina con mención en cirugía general y oncología]. Lima: Universidad de San Martín de Porres; 2016.
9. Castle P, Adcock R.,Cuzick J., Wentzensen N., Torrez-Martinez N., Torres S, *et al.* Relationships of p16 Immunohistochemistry and Other Biomarkers with Diagnoses of Cervical Abnormalities: Implications for LAST Terminology. Archives of Pathology and Laboratory Medicine [en línea]. 2019 Noviembre [citado: 2020 julio 1]; 144(6): [9 p.]. Disponible en: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/144/6/725/427474/Relationships-of-p16-Immunohistochemistry-and>

7. PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

Presupuesto

DESCRIPCION	COSTO UNITARIO (nuevos soles)	CANTIDAD	TOTAL (nuevos soles)
Láminas portaobjetos con carga positiva	2	200	400
Kit CINtec® p16 ^{INK4a} (DAKO)	3000	2	6000
Anti-Human Ki-67 Antigen Clon MIB-1 (DAKO)	3500	1	3500
500 Hojas bond	0.01	500	500
Estadístico	400	1	400
Tecnólogo	480	1	480
Médico anatomopatólogo	2000	1	2000
TOTAL			13280

Fuente de financiamiento

FUENTE DE FINANCIAMIENTO	MONTO (nuevos soles)	PARTICIPACION (%)
Aporte propio	6640	50%
Préstamo – Entidad financiera	2656	20%
Fondo concursable	3984	30%
TOTAL	13280	100 %

Cronograma

ANO	2020							2021					
MES	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Revisión de bibliografía	X												
Elaboración del protocolo		X											
Aceptación del proyecto			X	X									
Obtención de base de datos					X	X							
Búsqueda de tacos de parafina y láminas							X						
Realización de inmunohistoquímica								X					
Lectura de láminas de inmunohistoquímica									X	X	X		
Análisis de resultados												X	
Publicación													X

8. ANEXOS

ANEXO 1		
	Código de muestra	
DIAGNÓSTICO INICIAL		
Ki 67	POSITIVO	NEGATIVO
p16	POSITIVO	NEGATIVO
DIAGNÓSTICO FINAL	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado