



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

“UTILIDAD DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO EN EL
DIAGNÓSTICO DE LESIONES PREMALIGNAS DE CÉRVIX”

“UTILITY OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY IN
THE DIAGNOSIS OF PREMALIGNANT LESIONS OF THE
CERVIX”

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

AUTOR

JOAN MANUEL PEDRAZA LA BARRERA

ASESOR

DR. CESAR AUGUSTO CHIAN GARCIA

LIMA – PERÚ

2021

2.-RESUMEN:

Diversos estudios muestran gran variabilidad interobservador en la interpretación microscópica de lesiones intraepiteliales (LIE) de cérvix, principalmente entre LIE de bajo grado (NIC I) y LIE de alto grado (NIC II y NIC III), así como también existe gran variabilidad en la interpretación lesiones pre malignas respecto de los procesos reactivos inflamatorios.

El uso de p16 y ki67 ha demostrado mejorar la exactitud del diagnóstico para realizar dichas diferenciaciones, por lo cual podría ser aplicado como parte del protocolo de estudio de biopsias cervicales.

En este estudio, se evalúa la confiabilidad diagnóstica Intra e Inter-observador existente en el diagnóstico de muestras de cérvix evaluadas inicialmente con tinción histoquímica de H&E y posteriormente con tinción Inmunohistoquímica (IHQ) de KI67 y P16. Para este fin, primero se seleccionarán un total de 100 biopsias de cérvix que tengan diagnóstico previo de LIE de bajo o LIE de alto grado, y que además cuenten con estudio Inmunohistoquímico para p16 y ki67. A continuación, se realizará la evaluación histopatológica inicial por 2 patólogos expertos y se emitirá un primer informe histopatológico. Posteriormente, se evaluarán las láminas acompañadas de tinciones de Inmunohistoquímica y se emitirá un segundo informe histopatológico. Finalmente se evaluará la concordancia de ambos informes diagnósticos.

PALABRAS CLAVE: Cérvix, Neoplasia, Inmunohistoquímica

3.-INTRODUCCIÓN:

El cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública a nivel mundial, con una incidencia de 13.1 y una mortalidad de 6.9 por cada 100.000 mujeres. En Perú el cáncer de cérvix presenta una incidencia de 23.2 y una mortalidad de 10.2 por cada 100.000 mujeres (1). En casi todos los departamentos del Perú el cáncer de cérvix es el más frecuente. La tasa ajustada de mortalidad mostró una tendencia ascendente principalmente en departamentos de la sierra y selva (2).

En un estudio realizado por Magkana y col, se menciona que la citología (prueba de Papanicolaou) ha sido durante muchos años, la principal herramienta de detección de Cáncer de cérvix y que además ha contribuido a la reducción de la enfermedad en mujeres de 35 a 64 años, en al menos un 80%. (3)

Otro estudio realizado por Rubeša y col, refiere que luego de una citología positiva para lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG), se debería realizar una colposcopia. Así mismo, en caso de que esta última sea positiva, se debería optar por una biopsia y un curetaje endocervical, siendo la histopatología el estándar para el diagnóstico. (4)

Se sabe que la neoplasia cervical escamosa corresponde a todas las alteraciones del epitelio escamoso que ocurren a nivel de la zona de transformación del cérvix y están relacionadas al virus del papiloma humano (VPH). Estas lesiones pueden ser clasificadas en lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG relacionado a VPH 11) y lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG relacionada a VPH 16 y 18), siendo los de alto grado, quienes tienen mayor riesgo a desarrollar cáncer de cérvix. Anteriormente las Lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) englobaron a las denominadas NIC I (Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I) y las de alto grado a las denominadas NIC II y NIC III. Estas definiciones han sido reforzadas en el proyecto Lower Anogenital Squamous Terminology (LAST). (5)

Según el Proyecto de Normalización Terminológica de las Lesiones Escamosas asociadas al VPH en el Tracto Inferior Anogenital (CAP-ASCCP LAST Project), se recomienda usar un esquema de clasificación de dos categorías para clasificar a las lesiones intraepiteliales de cuello uterino, estas categorías corresponden a lesión intraepitelial escamosa de bajo y alto grado. (6)

Las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) están asociados a diferentes cambios estructurales en las células, como poca maduración citoplasmática en el tercio inferior del epitelio, pero donde la maduración comienza en el tercio medio y es relativamente normal en el tercio superior. Así mismo, las figuras mitóticas se limitan al tercio inferior del epitelio y a este nivel las células presentan características nucleares anormales que incluyen aumento del tamaño del núcleo, membranas nucleares irregulares y aumento de la relación núcleo/citoplasma. Por otra parte, también se puede observar la presencia de un efecto citopático característico del VPH (coilocitosis), el cual incluye multinucleación, agrandamiento y pleomorfismo nuclear, acompañado de halos perinucleares, pero sin las características de una lesión de alto grado. Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) se caracterizan por una proliferación de células escamosas o metaplásicas con características nucleares anormales que incluyen un tamaño nuclear aumentado, membranas nucleares irregulares y proporciones aumento de relación núcleo/citoplasma acompañadas de figuras mitóticas tanto en tercio inferior, como tercio medio y / o superficial del epitelio (6)

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN bicatenario no envuelto dentro de la familia Papillomaviridae. Hay más de 150 genotipos de VPH, los cuales son clasificados según su proteína de cápside codificadas por los genes tardíos L1 y L2, y se sabe que 40 de ellos infectan el tracto anogenital. Estos 40 genotipos se dividen en grupos de alto y bajo riesgo según su potencial oncogénico. HPV16 y HPV18 son genotipos de alto riesgo que se encuentran en más del 70% de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) y los carcinomas de células escamosas de cuello uterino. A diferencia de las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG), que representan infecciones transitorias por VPH y tienen un bajo riesgo de malignidad, las LIEAG se asocian con una infección persistente y un mayor riesgo de progresión a cáncer invasivo. (7)

La Inmunohistoquímica (IHQ) desempeña un rol importante para el diagnóstico de VPH y las lesiones intraepiteliales del cérvix. Se han evaluado para su utilidad los marcadores L1, Ki 67 y P16. El p16 es el marcador que demuestra mayor utilidad para el diagnóstico, sobre todo en el diagnóstico de Lesión Intraepitelial de alto Grado (LIEAG). Así mismo, se sabe que la inmunotinción de Ki-67 es inferior a p16, y la expresión de la cápside L1 no muestra mayor utilidad. Además, la sobreexpresión de la proteína p16 indica la presencia del VPH activo, por lo que la identificación del p16 es importante para el diagnóstico certero, el pronóstico y el tratamiento oportuno (8).

Con respecto a la interpretación Inmunohistoquímica, la tinción con p16 (Marcador inmunohistoquímico asociado a VPH y gravedad de lesión escamosa), se interpreta como positiva cuando se observa una tinción en bloque (compromiso nuclear o nuclear y citoplasmática), fuerte y difusa, comenzando principalmente desde la capa de células basales del epitelio hacia la capa parabasal y de manera variable en capa intermedia o superficial. Por el contrario, se considera que la tinción nuclear focal o en parche, con células únicas citoplásmicas, tenues, en forma de gota, encharcadas, dispersas y/o una ausencia completa de tinción no específica son indicativas de una tinción negativa para p16. Por otro lado, la expresión de Ki-67 (Marcador inmunohistoquímico asociado a proliferación celular y mitosis), se clasifica en cuatro grupos según la distribución y las proporciones de células con tinción nuclear positiva y se realiza de la siguiente manera: puntuación 0, <10% de las células, pero restringidas mayormente a las capas de células parabasales; puntuación 1, 10–29% de las células, pero restringidas al tercio inferior del epitelio; puntuación 2, 30-69% de las células, las cuales alcanzan el tercio superior del epitelio; puntuación 3, $\geq 70\%$ de células epiteliales, las cuales corresponden a la expresión Ki-67 en el espesor total de epitelio escamoso(9)

Por otro lado, se sabe que existe variabilidad en la interpretación diagnóstica cuando se realiza una evaluación mediante tinción convencional de H/E. Esta variabilidad que puede ser inter y/o intra observador, ha sido estudiada desde hace algunas décadas y refleja la existencia de una alta o baja concordancia entre los reportes diagnósticos. En las biopsias de cérvix, la mayor cantidad de discordancia entre los diagnósticos radica en 2 grupos principales; por un lado, entre las proliferaciones escamosas reactivas y a las neoplasias intraepiteliales de bajo grado, y por otro lado entre las lesiones intraepiteliales de alto grado (principalmente NIC II) y las neoplasias intraepiteliales de bajo grado. (10)

Es así que, estudios como los de Solomon y col, mencionan que las tinciones convencionales por H/E en lesiones premalignas de cérvix muestran una concordancia intraobservador de 67.9% con un valor kappa de 0.55. Sin embargo, utilizando Inmunohistoquímica, la concordancia intraobservador de p16 fue del 92% con un valor de índice kappa de 0.85. Además, para Ki-67 fue 96.4% con un valor kappa de 0.85. Por tanto, la concordancia intraobservador es notablemente mayor cuando se usa Inmunohistoquímica. (11)

En una revisión sistemática elaborada por Caldas y col, se observó que la sobreexpresión de marcadores Inmunohistoquímicos como p16 y ki67, están asociadas a mayor

severidad y progresión de las neoplasias cervicales. Por otro lado, el marcador p53, asociado en algunos estudios a mayor severidad, en esta revisión sistemática se demostró que realmente no es un buen marcador de severidad. (12)

En otro estudio, Mandal y col refieren que la combinación de p16 positivo y expresión anormal de ki-67 por encima del tercio inferior del epitelio fue observado en 0% para histológicas normales/ NIC1(LIEBG) y 60.5% (40/66) para NIC3 (LIEAG). Así mismo, la evaluación del virus del papiloma Humano mediante HR-PCR mostró una positividad de hasta 76.3% (58/76) en mujeres con NIC2/NIC3(LIEAG) y solo 8.9% (4/45) en mujeres con histopatología normal / NIC1(LIEBG). (13)

Por su parte, Aslani y col encontraron que de 22 biopsias de tipo sacabocado de cérvix positivas para lesión intraepitelial de alto grado y cuyos conos respectivos resultaron negativos, 11 de estas muestras no lograron ser confirmadas para lesión intraepitelial luego de la Inmunohistoquímica con ki67 y p16, siendo finalmente reportadas como metaplasia y cervicitis. Así mismo, luego de la Inmunohistoquímica, 5 muestras pasaron de alto grado a bajo grado, confirmándose lesión intraepitelial de alto grado solo en 6 de las muestras. Adicionalmente, este estudio menciona que, en algunos casos la biopsia cervical puede llevar a un diagnóstico erróneo de lesión intraepitelial cervical y lo cual puede generar una conización innecesaria en el paciente. Esto sugiere que el estudio complementario con marcadores Inmunohistoquímicas permitiría lograr una mayor precisión diagnóstica. (14)

Finalmente, en este estudio, se determinará la concordancia Intra-observador e Inter-observador en el diagnóstico histopatológico de biopsias de cérvix, midiendo así la confiabilidad existente entre la evaluación de una muestra de cérvix con tinción única de H&E y la evaluación de la misma muestra, pero complementada con tinción Inmunohistoquímica (IHQ) con KI67 y P16. Así mismo, estudios como el nuestro, podrían reforzar los protocolos de tamizaje y los algoritmos de diagnóstico para lesiones premalignas de cuello uterino. Adicionalmente, estos estudios también permiten mejorar el entrenamiento, habilidades y competencias de los médicos Anatomopatólogos para alcanzar un diagnóstico cada vez más certero en neoplasias malignas de cuello uterino.

4.-OBJETIVOS:

GENERAL:

- Evaluar la confiabilidad diagnóstica intraobservador e interobservador antes y después de la intervención de tinción Inmunohistoquímica (p16 y ki67) en biopsias de cérvix teñidas solo con Hematoxilina /Eosina.

ESPECÍFICOS:

1. Determinar la concordancia diagnóstica intraobservador mediante índice kappa en el diagnóstico histopatológico, antes y después de la intervención de tinción Inmunohistoquímica (p16 y ki67) en biopsias de cérvix.
2. Determinar la concordancia diagnóstica inter-observador mediante índice kappa, sin uso de Inmunohistoquímica (p16 y ki67) en biopsias de cérvix.
3. Determinar la concordancia diagnóstica inter-observador mediante índice kappa, con uso de Inmunohistoquímica (p16 y ki67) en biopsias de cérvix.

5.-MATERIALES Y MÉTODOS:

a) **Diseño del estudio:**

Se realizará un estudio de confiabilidad, midiendo la concordancia diagnóstica intraobservador e interobservador en 100 muestras de biopsias de cérvix.

b) **Población:** Todas las biopsias de cérvix con diagnóstico de Neoplasia intraepitelial cervical o carcinoma de cérvix obtenidas de un instituto de referencia en Anatomía Patológica (Laboratorios UNILABS) desde el año 2016 al 2021.

c) **Muestra:** 100 biopsias de cérvix con diagnóstico de neoplasia intraepitelial o carcinoma de cérvix recolectados dentro de los años 2016 a 2021, y que tengan disponibles tinciones de Hematoxilina y Eosina (H/E), P16 y Ki67.

d) Tabla de Operacionalización de variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Unidad de medida	Escala	Instrumento
Diagnóstico Histopatológico final (Cualitativa-Nominal)	Evaluación microscópica de lámina de biopsia de cérvix y emisión de reporte histopatológico	Diagnóstico de Lesiones Premalignas y Malignas de Cérvix	Diagnostico sin Inmunohistoquímica	Diagnóstico Final	No tiene	No tiene	Ficha de Recolección de Datos
			Diagnóstico con Inmunohistoquímica	Diagnóstico Final	No tiene	No tiene	Ficha de Recolección de Datos
Índice de Concordancia intraobservador (Cuantitativa discreta)	Medida del grado de acuerdo o concordancia entre 2 métodos u observadores diferentes	Medida de la concordancia diagnóstica entre un mismo observador bajo 2 métodos diferentes.	-	Índice Kappa	No tiene	0 - 1	Software Estadístico
Índice de Concordancia interobservador (Cuantitativa discreta)	Medida del grado de acuerdo o concordancia entre 2 métodos u observadores diferentes	Médida de la concordancia diagnóstica entre diferentes observadores bajo el mismo método.	-	Índice Kappa	No tiene	0 - 1	Software Estadístico

e) Procedimientos y técnicas:**Materiales**

- Archivo de láminas de Laboratorio Clínico UNILABS.
- Microscopio óptico.
- Laptop.
- Hojas bond en tamaño A4.

Instrumentos

- Software estadístico SPSS 25
- Ficha de recolección de datos.

Metodología

Se realizará la recolección de fichas de datos (Anexo 1) de las pacientes con sus respectivas láminas teñidas; por histoquímica con H/E y por Inmunohistoquímica con p16 y ki67. A continuación, con la colaboración de 2 patólogos especialistas expertos (más de 10 años de experiencia), se procederá a revisar las láminas teñidas con H/E (total 1 lámina x paciente) y cada uno de los patólogos elaborará un primer diagnóstico.

Luego de 2 semanas, los mismos patólogos revisarán las mismas láminas teñidas con H/E pero junto a sus láminas correspondientes teñidas con p16 y ki-67 (total:3 láminas por paciente), para finalmente volver a dar un segundo diagnóstico. Finalmente, los datos obtenidos pasarán a una ficha de recolección de datos.

f) Aspectos Éticos del estudio:

Debido a que se trabajarán con láminas ya teñidas durante el proceso de diagnóstico inicial de las pacientes y se realizarán lecturas adicionales para el propósito del estudio, se solicitará la autorización al comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y de la Institución Privada de Laboratorio Clínico UNILABS. Por otro lado, para garantizar la confidencialidad de la información de las historias clínicas se asignarán códigos.

g) Plan de análisis

La concordancia diagnóstica intraobservador en el diagnóstico de 100 biopsias cervicales, leídas por un mismo patólogo antes y después del uso de Inmunohistoquímica, se realizará aplicando la medida estadística del coeficiente Kappa de Cohen.

La concordancia diagnóstica interobservador entre patólogos diferentes, tanto para biopsias cervicales sin Inmunohistoquímica y para biopsias que cuenten con apoyo de Inmunohistoquímica, también se realizará aplicando la medida estadística del coeficiente Kappa de Cohen.

Todos los análisis estadísticos se desarrollarán con el programa SPSS 25.

6.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- 1.- Globocan 2018. Cáncer today. Consultado el 9 Setiembre 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
- 2.- Ramos W, Guerrero N, Medina J. Análisis de la Situación de Cáncer en el Perú, 2018. Lima; Ministerio de Salud. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades; 1 ed.; oct. 2020. 161 p. ilus.
- 3.- Magkana I M, Mentzelopoulou P, Magkana E. The p16/ki-67 assay is a safe, effective and rapid approach to triage women with mild cervical lesions. PLoS ONE, 2021, 16(6).
- 4.- Rubeša R, Vrdoljak D, Dinter M. Diagnostic Three Slides Pap Test Compared to Punch Biopsy and Endocervical Curettage in Confirmed HSIL+ Diagnosis. Diagnostics 2021, 11, 942.
- 5.- Crum C, Nucci M, Brooke E. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. 2018 Cap 13 p 298-274.
- 6.- Teresa M. Darragh, MD;1 Terence J. Colgan, MD;2 J. Thomas Cox. 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. Arch Pathol Lab Med (2012) 136 (10): 1266–129.
- 7.- Khieu M, Butler SL. High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. In: Stat Pearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 January.

- 8.- Farzanehpour M, Muhammadnejad A, Akhavan S. P16INK4A Immunohistochemistry as a Gold Standard for Cervical Cancer and Precursor Lesions Screening. Iran J Public Health. 2020 Feb;49(2):312-322.
- 9.- Lim S, Lee M, Cho J. Efficacy of p16 and Ki-67 immunostaining in the detection of squamous intraepithelial lesions in a high-risk HPV group. Oncology Letters 11.2, 2016, Pages 1447-1452.
- 10.- Farzanehpour M, Muhammadnejad A, Akhavan S. P16INK4A Immunohistochemistry as a Gold Standard for Cervical Cancer and Precursor Lesions Screening. Iran J Public Health. 2020 Feb;49(2):312-322.
- 11.- Solomona C, Louwa M, Van Aardtb M. p16 and Ki-67 immunohistochemical staining reduces inter- and intra-observer variability in the grading of cervical squamous intraepithelial lesions of South African women. Southern African Journal of Gynaecological Oncology 2017; 9(2):25–29.
- 12.- Caldas D, Gonçalves A, Ney R. Immunohistochemical expression of p16, ki67 and p53 in cervical lesions - A Systematic Review. Pathology - Research and Practice (2017)
- 13.- Mandal R, Ghosh I, Banerjee D. Correlation Between p16/Ki-67 Expression and the Grade of Cervical Intraepithelial Neoplasias. Int J Gynecol Pathol Vol. 00, No. 00, 2019.
- 14.- Sari F, Zolmajdi N, Akbarzadeh-Jahromi M. Re-evaluation of Negative Cone Biopsy Results with Ki-67 and p16 Immunostaining following Positive Cervical Biopsy. Iran J Med Sci. 2020 Nov;45(6):469-476.

7.-PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

PRESUPUESTO:

INSUMOS	PRESENTACIÓN	COSTO UNITARIO	CANTIDAD	COSTO TOTAL EN SOLES
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	MILLAR	12 SOLES	4	48
LAPICEROS	CAJA	10 SOLES	1	10
FOLDERS	PAQUETE	25 SOLES	1	1
PERFORADOR	UNIDAD	5 SOLES	1	1
ENGRAPADOR METALICO	UNIDAD	20	1	20
EQUIPOS				
MICROSCOPIO	UNIDAD	YA SE TIENE	YA SE TIENE	0
COMPUTADOR	UNIDAD	YA SE TIENE	YA SE TIENE	0
IMPRESORA	UNIDAD	YA SE TIENE	YA SE TIENE	0
SERVICIOS				
LÁMINAS TEÑIDAS CON H/E	UNIDAD	YA SE TIENE	YA SE TIENE	0
LÁMINAS TEÑIDAS CON INMUNOHISTOQUÍMICA	UNIDAD	YA SE TIENE	YA SE TIENE	0
LECTURA DE LÁMINAS POR PATÓLOGOS EXPERTOS	REALIZADA POR PATÓLOGOS	YA SE TIENE	YA SE TIENE	0
COSTO TOTAL	-	-	-	100

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SETIEMBRE
	2021	2021	2021	2021
Elaboración de protocolos	X	X		
Ejecución de protocolos			X	
Recolección de datos, Reporte de Resultados e informe final			X	
Elaboración del Paper y trámites de publicación				X

8.-ANEXOS:

ANEXO 1

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS				
CÓDIGO DE BX	DIAGNÓSTICO DE PATÓLOGO 1		DIAGNÓSTICO DEL PATÓLOGO 2	
	H/E :	H/E+INMUNOHISTOQUÍMICA:	H/E :	H/E+INMUNOHISTOQUÍMICA :
	LIEBG(NIC1) LIEAG(NIC2) LIEAG(NIC3) LIEAG(CA IN SITU)	LIEBG(NIC 1) LIEAG(NIC 2) LIEAG(NIC 3) LIEAG(CA IN SITU)	LIEBG(NIC1) LIEAG(NIC2) LIEAG(NIC3) LIEAG(CA IN SITU)	LIEBG(NIC1) LIEAG(NIC2) LIEAG(NIC3) LIEAG(CA IN SITU)
EJ: 20-17890	EJ: LIEAG(NIC 2)	EJ: LIEBG (NIC 1)	EJ: LIEBG (NIC 1)	EJ: LIEBG(NIC 1)