DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO

Morelva Toro de Méndez[1], Antonio Ferrández Izquierdo[2], Antonio LLombart Bosch[3].
[1]Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela,
[2] Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia y de la Sección de Citopatología. Valencia, España.
[3]Departamento de Patología. Universidad de Valencia, España.
Recibido para publicación abril 2013. Aprobado para publicación junio 2013.

RESUMEN:

La infección persistente por ciertos tipos de alto riesgo oncogénico de virus papiloma humano (VPHAR) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras. Los VPHAR inducen alteraciones moleculares durante todo el proceso de carcinogénesis cervical, que provocan la acumulación de errores genéticos, con la consecuente inestabilidad genética y transformación maligna. Estas alteraciones son producidas por la acción directa de las oncoproteínas virales E6 y E7 sobre las principales proteínas celulares supresoras de tumor, p53 y pRb, respectivamente, y pueden ser monitoreadas durante el surgimiento de la lesión neoplásica, mediante el uso de biomarcadores. En este artículo se revisan las últimas tendencias sobre el uso del estudio inmunocitoquímico, como una prueba complementaria a la citología y a la detección y tipificación de VPHAR en la evaluación de la expresión de biomarcadores como la proteína inhibidora de la proliferación celular p16INK4a, marcador único o combinada con otros biomarcadores, que puedan contribuir eficazmente en la detección de las pacientes con mayor riesgo a desarrollar neoplasia del cuello uterino asociada a la infección por VPHAR, durante la pesquisa de cáncer de cuello uterino de rutina y en el manejo clínico adecuado y oportuno.

Palabras Clave: cuello uterino, neoplasia, virus papiloma humano oncogénico, biomarcadores, inmunocitoquímica, p16INK4a/Ki-67.

EARLY DIAGNOSIS OF CERVICAL CANCER ASSOCIATED TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS

SUMMARY

Persistent infection with certain types of high oncogenic risk human papillomavirus (HR-HPV) is the main risk factor for developing cervical cancer and its precursor lesions. HR-HPV induces molecular changes during cervical carcinogenesis, causing the accumulation of genetic anomalies, with subsequent genetic instability and malignant transformation. These alterations are produced by the direct action of the E6 and E7 viral oncoproteins on principal tumor cell suppressor proteins, p53 and pRb, respectively, and can be monitored during growth of the neoplastic lesion using biomarkers. In this paper we review the latest trends on the use of immunocytochemistry as a complementary test to cytology and HR-HPV detection and typing in evaluating expression of biomarkers such as the p16INK4a cell proliferation inhibitor protein, as a single marker or combined with other biomarkers, which can contribute effectively to the detection of patients with increased risk of developing cervical neoplasia associated with HR-HPV infection during routine screening for cervical cancer and in appropriate clinical management .

Key words: uterine cervix, neoplasia, hight risk-HPV, biomarkers, immunocytochemical, p16INK4a/Ki-67.

Introducción

El cáncer de cuello uterino es la neoplasia maligna más común en las mujeres de los países subdesarrollados, el cual ocasiona alrededor de 280.000 muertes cada año, según el Centro de Información sobre HPV y cáncer cervical de la Organización Mundial de la Salud y el Instituto Catalán de Oncología (1).

La infección persistente por ciertos tipos de virus papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico (VPHAR) es considerada actualmente el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras (2-5). También se ha sugerido una relación causal entre el VPHAR y otros cánceres anogenitales (vulva, vagina, pene), así como de un grupo de neoplasias malignas de cabeza y cuello (6-9).

El VPHAR es capaz de inducir el desarrollo de un fenotipo celular maligno mediante diferentes mecanismos interrelacionados entre sí (10).

Solicitar copia a: Morelva Toro de Méndez (e-mail tmorelva@ula.ve.)

Debido a que las interacciones moleculares son mediadas por proteínas, tanto celulares como virales, una estrategia adecuada para evaluar estas vías moleculares complejas podría ser el estudio de la actividad de estas proteínas, mediante el uso de las técnicas de inmunoquímica, aplicadas a muestras celulares o tisulares. Esta metodología ofrece la posibilidad de analizar las proteínas de interés utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales, las cuales se encuentran alteradas durante el proceso de carcinogénesis del cuello uterino asociado a infección por VPHAR. Con la aplicación de las técnicas inmunohisto-citoquímica se ha logrado descubrir y estudiar una variedad de biomarcadores que podrían ser de gran utilidad clínica como predictores de enfermedad, durante el largo proceso de desarrollo de las lesiones neoplásicas del cuello uterino inducidas por una infección persistente por el VPHAR (11-15).

La detección inmunocitoquímica de alteraciones moleculares inducidas por los VPHAR en las células del cuello uterino infectadas podría ser usada como un análisis adjunto al estudio morfológico de las células o Citología, en la pesquisa de rutina del cáncer de cuello uterino, para la detección eficaz de las lesiones premalignas, conocidas en la actualidad con el término citológico de Lesión Intraepitelial Escamosa (siglas en inglés: SIL) propuesto por el Sistema Bethesda 2001(16) y tradicionalmente, como displasias o neoplasia intraepitelial cervical (siglas en inglés: CIN) de diferentes grados de severidad (CIN 1, 2 y 3 ó carcinoma in situ), basado en su aspecto histopatológico (17). La técnica inmunocitoquímica ofrece la ventaja que puede ser aplicada indistintamente sobre muestras citológicas del cuello uterino obtenidas de forma convencional, en muestras celulares en base líquida y en bloques celulares incluidos en parafina (18-20).

En este artículo se revisan las últimas tendencias sobre la aplicación del estudio inmunocitoquímico, como una prueba complementaria a la citología y a la detección y tipificación de VPHAR, en la evaluación de la expresión de biomarcadores como la proteína inhibidora de la proliferación celular p16INK4a, bien único o combinado con otros biomarcadores, que puedan contribuir eficazmente en la detección de las pacientes con mayor riesgo a desarrollar neoplasia del cuello uterino asociada a la infección por VPHAR.

Principales eventos moleculares de la carcinogénesis del cuello uterino.

El cáncer de cuello uterino surge a partir de la transformación de las células epiteliales infectadas por VPHAR, que conforman los epitelios de revestimiento de la mucosa cervical y especialmente de la zona de transformación o epitelio metaplásico (21). Esta neoplasia viene precedida por un espectro morfológico de lesiones intraepiteliales escamosas clasificadas como de bajo grado (siglas en inglés: LSIL) que incluye a la infección por VPH y a CIN 1 y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (siglas en inglés: HSIL) que abarcan a CIN 2 y 3 ó carcinoma in situ (16).

La neoplasia maligna de cuello uterino es una enfermedad genética y el proceso de su desarrollo o carcinogénesis es complejo, multifactorial e incluye básicamente las siguientes fases: infección del epitelio cervical por VPHAR, persistencia viral, progresión a lesión premaligna e invasión. La persistencia de la infección por VPHAR representa el evento clave e inicial de la transformación celular y origen del cáncer cervical (4,10,22-24).

Existe entonces una relación causal bien establecida entre la infección por VPHAR y cáncer de cuello uterino, sin embargo, esta infección es necesaria pero insuficiente, ya que la mayoría de estas infecciones de transmisión sexual en mujeres jóvenes son transitorias y no producen lesión premaligna (25). Se requiere de la cooperación de otra serie de cofactores ambientales, virales y de la célula infectada, que al combinarse incrementan el riesgo de progresión de una infección por VPHAR a un estado neoplásico (26-28).

El VPH es un virus ADN que pertenece a la familia Papillomaviridae. Su genoma está compuesto por una serie de genes, que dependiendo del momento del ciclo vital del virus en que estos se expresen, se denominan E /early expression (E1-E7) y L / late expression (L1 y L2). Estos genes virales se encuentran controlados en las infecciones activas, sin embargo, cuando el ADN viral se integra al genoma celular, después de un largo período de persistencia, estos oncogenes virales comienzan a expresarse de manera descontrolada, con el propósito de modificar las funciones naturales de las proteínas celulares para inducir la transformación celular maligna (4,29-32).

Actualmente se han caracterizado más de 150 tipos

específicos de VPH, de los cuales aproximadamente 15 tipos virales se encuentran asociados a las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino. Estos virus han sido clasificados de acuerdo a su potencial oncogénico en 2 grupos: de bajo (BR) y alto riesgo (AR) oncogénico. Entre los VPHBR más frecuentes se encuentran los tipos 6 y 11, asociados a lesiones benignas como los condilomas (verrugas) genitales, mientras que los VPHAR más comunes incluyen a los tipos 16, 18, 31, 33, 45, entre otros, cuyo ADN ha sido aislado tanto de las HSIL como del cáncer invasor e igualmente hallados con frecuencia en pacientes con citología normal, sobre todo el tipo VPH 16 (33-37).

Cuando las células inmaduras del estrato profundo del epitelio cervical escamoso y/o metaplásico, que se encuentran en división y diferenciación, son infectadas por un VPH, el ADN viral puede encontrarse en el núcleo en estado físico episomal, extracromosomal o formando parte integral del ADN celular. En las LSIL, el ADN viral se encuentra como un episoma y los niveles de expresión de los oncogenes E6 y E7 son bajos, debido al control cuidadoso que ejercen sobre estos, los genes virales E1 y E2. En las HSIL y en el cáncer invasor, el ADN de los papilomavirus está integrado al genoma de la célula infectada, en la que ha dado lugar a la transformación celular y surgimiento del tejido displásico (10,38-40).

La persistencia de la infección por VPHAR es el verdadero factor viral de riesgo para que suceda la progresión maligna. Durante ésta fase de la carcinogénesis ocurren 3 eventos moleculares de interés: la integración, la expresión sin represión de los oncogenes virales E6 y E7 y la interacción de las oncoproteínas virales E6 y E7 con las principales proteínas celulares supresoras de tumor: la proteína p53 y la proteína Retinoblastoma (pRb). Estas proteínas celulares se encargan de una variedad de funciones que regulan, directa o indirectamente, a los procesos vitales como la diferenciación celular, replicación del ADN, apoptosis, quinescencia y angiogénesis, entre otros (39,41-44).

Como consecuencia de esta interacción entre proteínas virales y celulares ocurre la alteración de los mecanismos reguladores del crecimiento celular, mediante la expresión elevada y permanente de los oncogenes virales E6 y E7, permitiendo de esta manera que la célula se divida constantemente, de forma descontrolada. Además, las oncoproteínas virales E6 y E7 interfieren con otros múltiples mecanismos de regulación celular, que conllevan a la producción de alteraciones genéticas acumulativas y epigenéticas, con la consecuente inestabilidad genómica y finalmente, al surgimiento de un clon celular maligno que dará origen a la formación tumoral (45,46).

Las oncoproteínas E6 y E7 son factores esenciales para promover la transformación e inmortalización celular durante la carcinogénesis del cuello uterino. Se expresan permanentemente en las HSIL y el cáncer invasor, de forma combinada y su expresión sostenida es un requisito para producir y mantener el fenotipo celular maligno (21,24,40,47,48).

En las células normales, el proceso de división celular se encuentra controlado por mecanismos bioquímicos estrictos compuesto por proteínas interactivas que inducen y coordinan eventos básicos de la duplicación y división. En particular, la proliferación celular está regulada por la proteína pRb, miembro que integra la vía reguladora p16INK4a/CDK-ciclina/pRb. La proteína pRb es una fosfoproteína nuclear que ejerce su función reguladora mediante el secuestro reversible de los factores de transcripción de la familia E2F, durante la fase inicial G1. En estado hipofosforilado, la pRb se une al factor E2F y reprime la transcripción de genes cuyos productos están involucrados y son necesarios para la síntesis de ADN y progresión del ciclo celular. El complejo pRb-E2F inhibe el ciclo celular cumpliendo una función de regulador negativo de la propagación celular, lo que conduce a la ausencia de transcripción genética cuyos productos son necesarios para el avance hacia la fase S. Cuando la pRb se encuentra fosforilada por la acción del complejo CDK4- ciclina D1, ocurre la liberación y acumulación del factor E2F, conduciendo la progresión del ciclo celular a la fase S. Este proceso de fosforilación de la proteína pRb está controlado por las proteínas quinasas dependientes de ciclina (siglas en inglés: CDK) de la fase G1. A su vez, la activación o inactivación del complejo CDK4-ciclina D1 está regulada por la acción de inhibidores de CDK dependientes de ciclina, entre los que se encuentra la proteína p16INK4a. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a las CDK 4 ó 6 e inhibir la actividad catalítica del complejo CDK-ciclina, regulando de esta forma el proceso de fosforilación de pRb y de forma indirecta, la proliferación celular (49). Normalmente, la proteína p16INK4a se encuentra

en muy bajos niveles, sin embargo, cuando la pRb se halla inactivada funcionalmente, la p16INK4a se sobrexpresa y se acumula tanto en núcleo como en citoplasma, como respuesta a los elevados niveles libres de E2F50.

La inactivación de la pRb por E7-VPHAR puede ser identificada por una expresión alterada de la actividad de su inhibidor p16INK4a, ya que su expresión es regulada a su vez, por un mecanismo de feed-back negativo dependiente de pRb, resultando en niveles incrementados de p16INK4a, que se detectan a nivel nuclear y citoplasmático de las células que se descaman de las neoplasias intraepiteliales cervicales y del cáncer invasor (51-53). La proteína p16INK4a es considerada actualmente un excelente marcador tumoral (54) y de displasia cervical asociada al VPH (53,55) .

En las células epiteliales del cuello uterino infectadas por un VPHAR, la inactivación funcional de las proteínas supresoras de tumor debido a la formación de complejos E6-p53 y E7-pRb, representa la esencia del proceso de carcinogénesis del cuello uterino, que conduce al descontrol del ciclo celular y la manifestación de este ocurre mediante la expresión anormal de numerosas proteínas asociadas al ciclo celular, como la proteína p16INK4a55.

Basándonos en estas consideraciones de patogénesis molecular, es posible identificar biomarcadores que reflejen los eventos moleculares implicados en todas las fases de la carcinogénesis del cuello uterino asociados a la infección por VPHAR, tanto aquellos dependientes de la expresión sin restricciones de los oncogenes virales E6 y E7, como los que indican descontrol del ciclo celular por inducción viral, con la finalidad de que sean usados para contribuir en el manejo clínico adecuado y oportuno. De esta manera, las alteraciones moleculares inducidas por el VPHAR podrían estudiarse a través de estos biomarcadores durante la pesquisa de rutina del cáncer de cuello uterino, lo cual representaría una herramienta de considerable valor diagnóstico y de pronóstico de las lesiones del cuello uterino en pacientes con infección viral persistente.

Biomarcadores para la pesquisa de las lesiones neoplásicas del cuello uterino.

En la era moderna de la citopatología ginecológica, las nuevas generaciones de pruebas de pesquisa para el cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras están orientadas a identificar marcadores moleculares que, utilizados en forma combinada, puedan contribuir en la discriminación entre las infecciones que poseen un gran potencial para progresar a displasia y luego a cáncer invasor, de aquellas infecciones que son temporales y que nunca inducirán el desarrollo de una lesión clínicamente significativa (13). Entre los numerosos biomarcadores estudiados, la detección de la expresión de ARNm de los oncogenes E6 y E7 de VPHAR y de la proteína p16INK4a son considerados marcadores que manifiestan la alteración del ciclo celular derivada de la sumatoria de todos los mecanismos que se desencadenan durante el surgimiento del cáncer de cuello uterino, para detectar efectivamente las células epiteliales en estado de transformación y progresión neoplásica, representando una excelente alternativa en el estudio y diagnóstico precoz de las lesiones cervicales (12,56-60).

Las pruebas moleculares para la detección de ADN de VPHAR serían las aplicadas inicialmente en la evaluación de rutina de las pacientes. Además del tipo específico de VPH presente, estas pruebas podrían incluir la carga viral, la persistencia e integración del ADN-VPH, así como la expresión y transcripción (ARNm) de los oncogenes E6 y E7. Las pruebas moleculares existentes son altamente sensibles y detectan cualquier tipo de infección por VPH, aunque se encuentre en una carga viral baja (61-63), sin embargo no son lo suficientemente específicas para identificar aquellas infecciones de carácter transformante, contrario a la citología, que permite reconocer específicamente a las células con características de discariosis y de malignidad. Por lo tanto, la utilidad clínica de los ensayos de detección de VPH se debaten entre la sensibilidad analítica para detectar la infección y la especificidad clínica para predecir la existencia de lesión en cuello uterino inducida por un VPHAR (55).

Debido a la relación causal entre el VPHAR persistente y la neoplasia de cuello uterino, las medidas actuales de prevención de este cáncer se basan en el resultado de las pruebas de detección de VPH. En muchos países de Europa y en Estados Unidos, el uso de la citología en base líquida combinada con la prueba de VPH ha ido remplazando a la citología convencional en los programas de pesquisa de rutina para el cáncer de cuello uterino, sobre todo en pacientes mayores de

30 años (64,65).

Los nuevos biomarcadores específicos de los distintos estadios de desarrollo de la enfermedad neoplásica del cuello uterino están orientados y son significativos para decidir, de acuerdo al riesgo específico de enfermedad neoplásica, la conducta clínica a seguir en las pacientes con infección por VPHAR que requieren de un seguimiento riguroso (24,57). Se ha propuesto que el biomarcador ideal que permita detectar una fase específica de la carcinogénesis cervical sería el que posea una efectividad superior al 90%, para el diagnóstico de lesiones de alto grado (15).

Debido a los excelentes resultados de las pruebas inmunohistoquímicas obtenidos en las muestras tisulares de cuello uterino, tanto de tejido epitelial sano como en el neoplásico (3,66-70), se han llevado a cabo numerosas investigaciones, basadas en la técnica inmunocitoquímica, en muestras celulares tanto convencionales como en el material residual de la citología en base líquida (18,51,71-79), con la finalidad de mejorar la efectividad del diagnóstico precoz de las lesiones del cuello uterino.

La inactivación funcional de la proteína pRb por la oncoproteína E7-VPHAR provoca la sobrexpresión de la proteína p16INK4a y su acumulación, tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. La p16INK4a es considerada, por tanto, como un biomarcador de inhibición de la vía reguladora p16INK4a/CDK4-ciclinaD1/pRb y el ciclo celular no controlado, reflejando así la transformación celular inducida por el VPHAR y posible existencia de neoplasia intraepitelial. Ello puede ser de gran ayuda en la clasificación de pacientes con hallazgos citológicos anormales pre-invasivos que incluyen ASC-US, ASC-H, LSIL y HSIL que requieren un control con evaluación clínica y tratamiento inmediato (18,51,80,81).

Se ha tratado de demostrar la utilidad de la proteína p16INK4a y otros biomarcadores en muestras clínicas, para mejorar el triaje de pacientes con riesgo a desarrollar una lesión intraepitelial de alto grado o cáncer invasor. Entre estos biomarcadores, estudiados de forma aislada o combinados, se incluye a la proteína p16INK4a, la cual continúa siendo objeto de investigación, debido a que ha demostrado buena efectividad para identificar a las células transformadas por VPHAR (18,78,79,82,83). Se han desarrollado protocolos para la detección inmunocitoquímica de la proteína p16INK4a, como una prueba adjunta complementaría a la evaluación de las pacientes con resultados citológicos compatibles con anormalidades en células epiteliales, tanto de origen escamoso como glandular (84,85). La proteína p16INK4a es un biomarcador sensible y específico para detectar pacientes con CIN 2 ó 3 y adenocarcinoma in situ, pudiendo ser utilizada en la pesquisa primaria del cáncer de cuello uterino, en conjunto con la citología y las pruebas moleculares de detección y tipificación del VPH (18,78,86).

La inmunodetección de p16INK4a podría contribuir en la discriminación de cambios celulares atípicos no asociados a infección por VPH, de aquellos que sí son inducidos por el VPH sobre todo oncogénico (87). El patrón de expresión de p16INK4a es diferente en los casos de infección por un VPH de bajo riesgo oncogénico, lo cual permitiría la diferenciación entre las lesiones que estos producen (67,68) y por tanto el riesgo de padecer una lesión potencialmente maligna. En el caso particular de la CIN 1 con inmunoexpresión difusa de p16INK4a es más probable que progrese a una neoplasia intraepitelial de mayor grado de severidad, que las CIN que no expresan esta proteína o con expresión focal, las cuales serían alteraciones que regresarían espontáneamente. Por ello se considera que p16INK4a posee un elevado valor predictivo positivo para CIN (76,88-93).

El uso de la inmunodetección de p16INK4a ha mejorado significativamente los siguientes problemas de la interpretación citológica: 1) La variabilidad interobservador para detectar anormalidades tisulares y celulares, sobre todo en casos con discrepancia citohistológica, así como la exactitud diagnóstica para la detección de CIN 2 o más (92,94,95). 2) La interpretación de la expresión de esta proteína en las NIC1, que al ser p16INK4a-inmunopositivas indican persistencia viral y podrían tener una mayor probabilidad de progresar a una lesión de mayor grado de severidad (CIN 2 ó 3) en comparación con aquellos casos de CIN 1 inmunonegativos (88,96). 3) La clasificación de los casos con ASC-US/LSIL que representan una lesión oculta CIN2 o más, para una atención clínica inmediata (72,74,78,97). 4) La pesquisa del cáncer de cuello uterino de rutina, como biomarcador complementario en el triaje de pacientes de riesgo con una prueba positiva para

VPHAR (18,70).

En resumen, los datos obtenidos a partir de los innumerables estudios evidencian que la detección inmunocitoquímica de p16INK4a posee un elevado potencial para ser usado como un biomarcador eficaz en la pesquisa de cáncer y lesiones premalignas del cuello uterino de rutina, en superposición con la citología, lo cual le aporta un valor clínico para la evaluación de pacientes con infección por VPHAR. Además, por lo anteriormente expuesto, parece que el uso combinado de las pruebas de laboratorio existentes sería la mejor estrategia para detectar efectivamente a las pacientes de riesgo elevado para enfermedad en cuello uterino.

Tendencias actuales de la aplicación de la inmunocitoquímica en la detección precoz del cáncer de cuello uterino.

Las nuevas estrategias de pesquisa del cáncer de cuello uterino y sus precursores deben ser cuidadosamente diseñadas, a fin de obtener un mejor entendimiento de la carcionogénesis del cuello uterino inducida por infección por VPHAR y posterior tratamiento de estas infecciones y de las lesiones que produce. La prevención del cáncer de cuello uterino ha tomado otra dirección con el desarrollo de las vacunas contra el papilomavirus, asociado al uso de biomarcadores virales y celulares aplicables en los laboratorios de rutina, inclusive con detección automatizada. Ante la especificidad no satisfactoria de las pruebas moleculares para detectar infección por VPH, debido a la alta frecuencia de éstas en mujeres jóvenes, sin evolucionar a lesión neoplásica y la sensibilidad insuficiente del estudio citológico para detectar las infecciones por VPHAR transformantes, antes de que produzcan lesión, la incorporación de biomarcadores a la pesquisa de rutina debería complementar las limitaciones de las pruebas tradicionales para detectar lesiones premalignas y malignas (15,98).

Se han introducido metodologías de laboratorio en las cuales se combina la detección simultánea de biomarcadores, que tienen como única finalidad incrementar la exactitud de la detección citológica de HSIL o de las pacientes de riesgo a desarrollarla. Recientemente, en Europa y Reino Unido se han desarrollado estudios que muestran el uso de una tinción inmunocitoquímica que incluye a dos biomarcadores para expresión compartida, utilizados rutinariamente de forma aislada. Se trata de la inmunotinción dual para p16INK4a/Ki-67, la cual evalúa la sobrexpresión simultánea de estos dos marcadores en una misma célula, en estado de proliferación y con ciclo celular alterado, independientemente de su morfología, lo que le otorga un buen grado de objetividad a la interpretación de los resultados. Se ha sugerido que la presencia de una o más células inmunoreactivas para p16INK4a/Ki-67 podría ser un indicador confiable de CIN oculta, especialmente de alto grado (CIN 2+), en pacientes con citologías compatibles con ASC-US / LSIL (99).

Una tinción dual inmunocitoquímica para de p16INK4a/Ki-67 está ahora disponible (CINtec PLUS®), para facilitar la identificación de células epiteliales escamosas o glandulares transformadas, en muestras citológicas e histológicas del cuello uterino, ampliando la detección de pacientes de riesgo, con elevada sensibilidad y especificidad (60,93,100-107). La doble tinción se aprecia en el núcleo (rojo) que indica reactividad para el antígeno Ki-67 y el resto de la célula marrón para p16INK4a (Toro y cols 2013, en vía de publicación), como se aprecia en la Figura 1.

La sobrexpresión simultánea de los antígenos p16INK4a y Ki-67 en la misma célula epitelial del cuello uterino puede considerarse como un indicador de la alteración de los mecanismos de regulación que controlan la división celular y que fueron inducidos por la acción de los oncogenes virales E6 y E7. En estado fisiológico, estos dos biomarcadores se expresarían de manera antagónica, mientras que en las lesiones del cuello uterino de diferente severidad, con células que muestran una elevada actividad proliferativa, la inmunosobrexpresión de p16INK4a/Ki-67 representaría el estado de transformación por el que atraviesa esa célula epitelial, ofreciendo elevados niveles de sensibilidad y especificidad para la detección precoz del cáncer de cuello uterino y sus lesiones premalignas. Por lo tanto, las células epiteliales que sobrexpresen simultáneamente estos dos biomarcadores son indicativas de la existencia de lesión neoplásica.

Parece ser que la principal utilidad de la doble tinción para p16INK4a/Ki-67 sería en el triaje de pacientes con ASC-US/LSIL que pudieran presentar una lesión neoplásica de alto grado subyacente, ya que la inmunoreactividad positiva

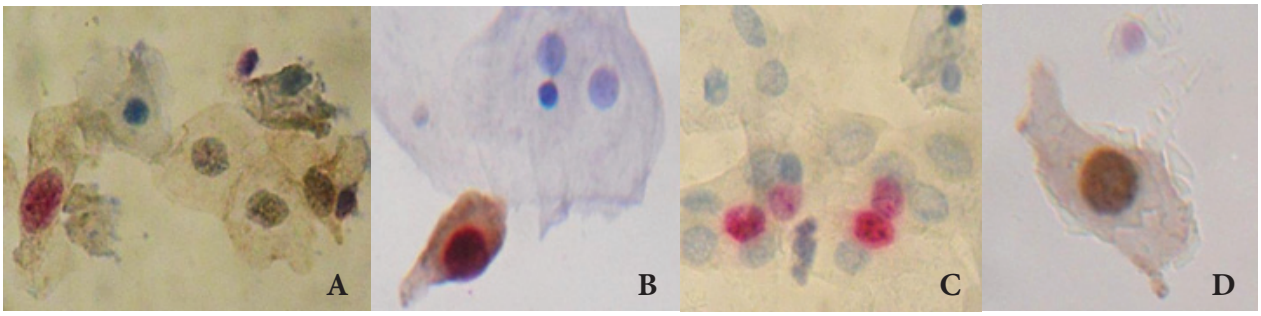


Figura 1. Ejemplos de muestras citológicas en base líquida del cuello uterino teñidas con la tinción dual inmunocitoquímica para p16INK4a/Ki-67. Contratinción con Hematoxilina de Harris. Un resultado positivo está representado por una o más células epiteliales con doble inmunoreactividad: en el citoplasma (marrón) que indica sobrexpresión de la proteína p16INK4a y en el núcleo (rojo) con expresión del antígeno de proliferación celular Ki-67, independientemente de la interpretación morfológica (A: célula intermedia atípica (ASC-US); B: celulas metaplásica inmadura atípica (ASC-H). 40X. C: Células intermedias atípicas (ASC-US) con expresión única del antígeno de proliferación celular Ki-67 (núcleos rojos). 40X. D: célula intermedia atípica (ASC-US), la cual es sólo reactiva para el anticuerpo contra p16INK4a (célula marrón) 40X. Laboratorio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico de Valencia. Departamento de Patología. Universidad de Valencia. España. Toro y cols 2013, en vía de publicación.

está fuertemente asociada a la presencia de CIN 2 o más (105,108). Además, tiene beneficio en la evaluación de grupos especiales de pacientes como las que presentan citologías negativas para lesión intraepitelial o malignidad pero con una prueba de VPHAR positiva. También podría tener valor práctico cuando se evalúa a grupos de pacientes especiales como postmenopáusicas y adolescentes con infección por VPHAR, independientemente de la edad (76,77,95,109).

El diseño de algoritmos de manejo clínico deberá apoyarse en la interpretación combinada de los resultados de las pruebas morfológicas, moleculares e inmunohisto-citoquímicas de laboratorios, para contribuir en el pronóstico de la evolución de la enfermedad y su tratamiento, que permita minimizar la aplicación de procedimientos invasivos innecesarios. La Tabla 1 muestra una propuesta de posible riesgo de enfermedad, de acuerdo a la interpretación combinada de resultados de laboratorio. El hallazgo citológico definiría, junto con las pruebas de VPH y la inmunoreactividad para p16INK4a/Ki-67 el posible riesgo de desarrollo de enfermedad neoplásica en el cuello uterino. Así tenemos por ejemplo el caso de pacientes con citología atípica (ASCUS), VPH positivo e inmunoreactividad negativa, el riesgo sería bajo. Mientras que en un caso con ASC-H, VPH positivo e inmunoreactividad negativa, el riesgo sería moderado. Una paciente con citología compatible con LSIL (VPH) e inmunoreactividad negativa sería una paciente con infección común por VPH pero sin neoplasia. En resumen, a medida que la severidad de la lesión es mayor y las pruebas complementarias sean positivas, mayor será el riesgo de desarrollar neoplasia del cuello uterino.

Para ilustrar todo lo anteriormente descrito, se presentan imágenes citológicas (Figura 1), como ejemplo de los resultados de la aplicación de la técnica inmunocitoquímica para detectar simultáneamente biomarcadores como p16INK4a y Ki-67 en células epiteliales del cuello uterino con atipias.

Conclusiones

El cáncer es curable si se diagnostica a tiempo. Las medidas preventivas constituyen en la actualidad la principal herramienta para erradicar el cáncer de cuello uterino asociado a infección persistente por VPH de alto riesgo oncogénico. El uso de biomarcadores moleculares representa una alternativa eficaz en los conceptos modernos de pesquisa de cáncer de cuello uterino. Actualmente, las investigaciones se orientan a descubrir, caracterizar y validar estos y otros biomarcadores asociados a la carcinogénesis del cuello uterino inducida por VPHAR y su aplicación práctica en el manejo clínico efectivo de la paciente, en conjunto con la citología y pruebas moleculares para proporcionar el

Tabla 1. Algoritmo de manejo clínico combinando los resultados de las diferentes pruebas en la pesquisa de cáncer de cuello uterino.

Citología	Infección por VPHAR	Inmunoreactividad para p16INK4a/Ki-67	Riesgo de desarrollo de enfermedad neoplásica en cuello uterino *.
Negativa	Negativa	Inmunonegativa	Nulo
	Positiva	Inmunopositiva	Moderado/elevado
Positiva	Negativa	Inmunonegativa	Bajo
Positiva	Positiva	Inmunonegativa	Bajo/moderado
Positiva	Positiva	Inmunopositiva	Elevado/ muy elevado

Citología positiva incluye: atipias, lesión intraepitelial escamosa y cáncer invasor.
*Dependerá del grado de anormalidades citológicas (atipias en células inmaduras que no descartan una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (ASC-H) o lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL), del tipo VPH y de la intensidad de la inmunoreactividad.

mejor cuidado a la paciente con riesgo para displasia de cuello uterino. Aunque los presentes resultados son muy prometedores, antes de que dichas pruebas sean incorporadas a los laboratorios y programas de pesquisa primaria deberán validarse mediante nuevos ensayos clínicos, que aseguren la efectividad de los mismos, en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo. También debería determinarse el costo efectivo para la elección de los ensayos a realizar, orientados a la detección específica de lesiones intraepiteliales de alto grado.

Referencias

1. WHO / ICO. Information Centre on HPV and cervical cancer (HPV Information Centre). 2010. Human papillomavirus and related cancers. Summary report update. November 10, 2010. Availableat: http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf. Last accessed on 30 May 2013.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999;189:12-19.
3. Toro de Méndez M. Caracterización inmunofenotípica del cáncer de cuello uterino asociado a infección por virus papiloma humano (VPH). 2006. Tesis Doctoral. ISNN 978-84-370-6635-6 Dep. Legal: V-4917-2007.
4. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. Vaccine 2012;30 :F24-F33.
5. Ciesielska U, Nowińska K, Podhorska-Okołów M, Dziegiel P.The role of human papillomavirus in the malignant transformation of cervix epithelial cells and the importance of vaccination against this virus. Adv Clin Exp Med. 2012;21:235-244.
6. Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Stanley MA, Sterling JC, Goon PK.High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. BMC Cancer. 2011;11:473-478.
7. Hartwig S, Syrjänen S, Dominiak-Felden G, Brotons M, Castellsagué X. Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe: a review. BMC Cancer. 2012;12:30-46.
8. McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Munger K. Cancer associated human papillomaviruses. Curr Opin Virol. 2012;2:459-466.
9. Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klussmann JP. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg. 2012;11:Doc09.
10. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, et al. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. J Clin Virol. 2005;32 Suppl 1:S25-S33.
11. Rajkumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, Shirley S, Bose MV, Gopal G, Selvaluxmy G. Identification

and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. BMC Cancer. 2011;11:80-93.

12. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. Cytopathology. 2011;22:215-229.
13. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, et al. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. J Oncol. 2012:289315.
14. Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. J Oncol. 2012;2012:507286.
15. Pinto AP, Degen M, Villa LL, Cibas ES. Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal 'biomolecular Papanicolaou test'. Acta Cytol. 2012;56:109-121.
16. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002;287:2114-2119.
17. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Capítulo 22. Tracto genital femenino. Elsevier, Ed 7ª. 2005. Pags: 1079-1080.
18. Toro de Méndez M, Ferrández Izquierdo A. Detection of human papilloma virus (HPV) in liquid-based cervical samples. Correlation with protein p16INK4a expression. Invest Clin. 2011;52:3-14.
19. Shidham VB, Mehrotra R, Varsegi G, D'Amore KL, Hunt B, Narayan R. p16 immunocytochemistry on cell blocks as an adjunct to cervical cytology: Potential reflex testing on specially prepared cell blocks from residual liquid-based cytology specimens. Cytojournal. 2011;8:1.
20. Pinto AP, Crum CP, Hirsch MS. Molecular markers of early cervical neoplasia. Diagn Histopathol (Oxf). 2010;16:445-454.
21. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. 2012;30:F55-F70.
22. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2000;92:690-698.
23. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2007;370:890-907.
24. Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013;22:553-560.
25. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998;338:423-428.
26. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Vaccine. 2008;26:L16-L36.
27. Yetimalar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A, Soylu F. Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. Arch Gynecol Obstet., 2012;285:805-810.
28. Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. Arch Med Res. 2009;40:428-434.
29. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomavirus: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene 2003;22:5201-5207.
30. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomavirus. Virus Res., 2009;143:195-208.
31. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Rev Med Virol., 2009;19:97-113.
32. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. APMIS. 2010;118:471-493.
33. de Villiers E, Bernard H, Fauquet C, Broker T, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004;324:17– 27.
34. de Sanjosé S, Diaz 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;7:453-459.
35. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348:518-527.
36. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human

papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348:518-527.

37. Alemany L, Pérez C, Tous S, Llombart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, Guarch R, Andújar M, Pelayo A, Alejo M, Ordi J, Klaustermeier J, Velasco J, Guimerà N, Clavero O, Castellsagué X, Quint W, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S; Spanish study group RIS HPV TT. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. Gynecol Oncol. 2011;124:512-517.
38. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. J Med Virol. 2012;84:947-956.
39. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002;2:342-350.
40. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. Public Health Genomics. 2009;12:268-280.
41. Litjens RJ, Hopman AH, van de Vijver KK, Ramaekers FC, Kruitwagen RF, Kruse AJ. Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal. Expert Opin Med Diagn. 2013;7:365-377.
42. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, Franco EL, Poole C, Smith JS. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: A literature review and meta-analysis. Int J Cancer. 2013;133:1271-1285.
43. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol. 2004;78:11451-11460.
44. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Solomon D, Guillén D, Alfaro M, Morales J, Hutchinson M, Katki H, Cheung L, Wacholder S, Burk RD. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. J Natl Cancer Inst., 2010;102:315-324.
45. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. Trends Microbiol., 2011;19:33-39.
46. Chen JJ. Genomic instability induced by human papillomavirus oncogenes. NAJ Med Sci. 2010;3:43-47.
47. Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S.Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. Cancer Lett. 2011;305:113-122.
48. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene. 2001;20:7888-7898.
49. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene. 2001;20:7874-7887.
50. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Capítulo 7. Neoplasia. Elsevier, Ed 7ª. 2005. Pags: 273-346.
51. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. Experimental cell research 1997;237:7-13.
52. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M.Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer. 2001;92:276-284.
53. Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marck E, Bogers JJ. P16INK4a as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. Int J Cancer. 2004;108:871-876.
54. Rajčáni J, Adamkov M, Hybenova J, Jackuliak J, Benčat M. Diagnostic role of p16/INK4A protein in Human Papillomavirus (HPV) induced cervical displasia. Cent. Eur. J. Biol., 2010; 5: 554-571.
55. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16INK4a expression in tumors. Functional significance, clinical associations and future developments. Cell cycle, 2011;10:2497-2503.
56. von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16INK4a to highlight transforming HPV infections. Expert Rev Proteomics 2012;9:149-163.
57. Von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz C. Biomarkers in screening of cervical cancer in modern gynecological cytopathology. In Modern uterine cytopathology. Moving to the molecular smear. Meisels A, Morin C. ASCP Press. Chicago IL. 2007. Pags:237-242.
58. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution. Obstet Gynecol Clin North Am., 2007;34:739-760.
59. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer

Epidemiol Biomarkers Prev., 2008;17:2536-2545.

60. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Gómez-Cerón C, García-Suastegui WA, Fierros-Zárate Gdel S, Jacobo-Herrera NJ. HPV-Based Screening, Triage, Treatment, and Followup Strategies in the Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia. Obstet Gynecol Int. 2013:912780.
61. Waldstrom M, Christensen RK, Ornskov D. Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual stain comparison with an mRNAhuman papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. Cancer Cytopathology, 2013;121:136-145.
62. Toro de Méndez M, Llombart Bosch A. Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA Using Polymerase Chain Reaction Short PCR Fragment 10–Line Probe Assay in Abnormal Papanicolaou-Stained Cervicovaginal Smears. Acta Cytologica 2009;53:540-547.
63. Castle PE, Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. Lancet Oncol., 2011;12:880-890.
64. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Wright C, Lyons D, Szarewski A. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. Br J Cancer. 2013 Mar 5;108(4):908-913.
65. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int J Cancer. 2009;124:516-520.
66. Masasad LS, Einsten MH, Huh WK, Katki HA, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW. 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 update consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening test and cancer precursors. J Low Tract Dis., 2013;17:S1-S27.
67. 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 a;48:580-585.
68. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol. 1998 b;153:1741-1748.
69. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz Mp16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol. 2002;26:1389-1399.
70. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M.Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 2004;13:1355-1360.
71. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R; European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol., 2010;133:395-406.
72. Samama B, Schaeffer C, Boehm N. P16 expression in relation to human papillomavirus in liquid-based cervical smears. Gynecol Oncol., 2008;109:285-290.
73. Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al. Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. Gynecol Oncol. 2005;97:35-40.
74. Sahebali S, Depuydt CE, Boulet GA, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marck EA, Bogers Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. Int J Cancer. 2006;118:1254-1260.
75. Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Chaiwongkot A, Yuenyao P, Kleebkaow P, Kritpetcharat O, Evans MF. Combined p16INK4a and human papillomavirus testing improves the prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN II-III) in Thai patients with low-grade cytological abnormalities. Asian Pac J Cancer Prev., 2011;12:1777-1783.
76. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, Torné A. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. Int J Gynecol Pathol., 2009;28:90-97.
77. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology

vs. HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASCUS and LSIL Pap cytology results. Am J Clin Pathol. 2010;134:12-21.

78. Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. Indian J Pathol Microbiol., 2010;53:7-11.
79. Izaaks CD, Truter EJ, Khan S. Prevalence of human papilloma virus in cytological abnormalities: Association of risk factors and cytomorphological findings. Cytojournal. 2012;9:19.
80. Amaro-Filho SM, Golub JE, Nuovo GJ, Cunha CB, Levi JE, Villa LL, Andrade CV, Russomano FB, Tristão A, Pires A, Nicol AF. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort. PLoS One. 2013;8:e57810.
81. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. Am J Surg Pathol. 2001;25:884-891.
82. Guo M, Warriage I, Mutyala B, Patel S, Lin E, Gong Y, Sneige N. Evaluation of p16 immunostaining to predict high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with Pap results of atypical squamous cells of undetermined significance. Diagn Cytopathol., 2011;39:482-488.
83. Halloush RA, Akpolat I, Jim Zhai Q, Schwartz MR, Mody DR. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: a pilot study. Cancer. 2008;114:474-480.
84. Grapsa D, Frangou-Plemenou M, Kondi-Pafiti A, Stergiou E, Nicolopoulou-Stamati P, Patsouris E, Chelidonis G, Athanassiadou P. Immunocytochemical expression of P53, PTEN, FAS (CD95), P16INK4A and HPV L1 major capsid proteins in ThinPrep cervical samples with squamous intraepithelial lesions. Diagn Cytopathol. 2013 Jun 1. doi: 10.1002/dc.23003.
85. Riethdorf L, Riethdorf S, Lee K, Cviko A, Löning T, Crum C. Human papillomavirus, expression of p16INK4a, and early endocervical glandular neoplasia. Hum Pathol., 2002;33:899-904.
86. Murphy N, Heffron CCBB, King B, Ganuguapati UG, Ring M, McGuinness E, Shiels O, O'Leary JJ. P16INK4a positivityin bening, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. Virchows Arch., 2004;445:610-615.
87. Mulvany NJ, DG, Sharyn, Wilson M. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. Pathology 2008;40:335–344.
88. Redmann R, Rufforny I, Liu C, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16INK4a in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. Arch Pathol Lab Med., 2008;132:795-799.
89. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, Egarter-Vigl E. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Virchows Arch., 2004;445:616-620.
90. Lee S, Kim H, Kim H, Kim C, Kim I. The Utility of p16INK4a and Ki-67 as a Conjunctive Tool in Uterine Cervical Lesions. Korean J Pathol., 2012;46:253-260.
91. Samarawardana P, Dehn DL, Singh M, Franquemont D, Thompson C, Gaido L, Torkko KC, Homer P, Burke S, Titmus MA, Nayi V, Shroyer KR. p16(INK4a) is superior to high-risk human papillomavirus testing in cervical cytology for the prediction of underlying high-grade dysplasia. Cancer Cytopathol., 2010;118:146-156.
92. Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, Butera D, Palmieri EA, Bulletti S, Carlani A, Staiano M, D'Amico MR, D'Angelo V, Di Dato E, Martinelli N, Malaspina M, Spita N, Tintori B, Fulciniti F. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. Acta Cytol., 2012;56:506-514.
93. Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Kommoss F, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. Int J Cancer., 2012;130:388-394.
94. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA,Brix WK,Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. Am J Surg Pathol., 2010;34:1077-1087.
95. Killeen JL, Dye T, Grace C, Hiraoka M. Improved Abnormal Pap Smear Triage Using Cervical Cancer Biomarkers. J Low Genit Tract Dis., 2013 Jun 11.
96. del Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A, Ordi J. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. Am J Obstet Gynecol., 2009;201:488.e1-7.
97. Holladay EB, Logan S, Arnold J, Knesel B, Smith GDA comparison of the clinical utility

of p16(INK4a) immunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/ neoplasia. Cancer. 2006;108:451-461.

98. Meisels A, Morín C. Modern uterine cytopathology. Moving to the molecular smear. Chapter 7. A new era in molecular and serologic diagnosis of HPV infections: Technical considerations. ASCP Press, Chicago, IL. 2007, Pag:305-358.
99. Atkins K. p16INK4a/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL Papanicolaou cytology. Cancer Cytopathol., 2011;119:145-147.
100. Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR. Dual stain immunohistochemical localization of p16INK4A and ki-67: a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2011;19:514-518.
101. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. Cancer Cytopathology 2011;119:158-166.
102. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecol Oncol. 2011;121:505-509.
103. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, et al. Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. Acta Cytol. 2011;55:413-420.
104. ingh M, Mockler D, Akalin A, et al. Immunocytochemical colocalization of P16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/ adenocarcinoma. Cancer Cytopathol. 2012;120:26-34.
105. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, 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;126:198-202.
106. Loghavi S, Walts AE, Bose S. CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. Diagn Cytopathol. 2013;41:582-587.
107. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res 2012;18:4154-4162.
108. Rokita W, Kedzia W, Pruski D, Friebe Z, Nowak-Markwitz E, Spaczyński R, Karowicz-Bilińska A, Spaczyński M. Comparison of the effectiveness of cytodiagnostics, molecular identification of HPV HR and CINtecPLUS test to identify LG SIL and HG SIL. Ginekol Pol., 2012;83:894-898.
109. Longatto Filho A, Utagawa ML, Shirata NK, et al. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. Int J Gynecol Pathol. 2005;24:118-124.