



**Secretaría Nacional
de Ciencia y Tecnología**



CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA –CONCYT-
SECRETARIANACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA-SENACYT
FONDONACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA –FONACYT
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

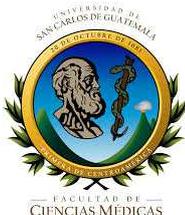
INFORME FINAL

“EVALUACIÓN CLÍNICA DEL TEST DE DOBLE TINCIÓN P16 Y Ki67 EN CITOLOGÍA
CERVICAL CON RESPECTO A COLPOSCOPIA E HISTOLOGÍA, SEGÚN EL TIPO DE
LESIÓN CERVICAL ”

PROYECTO FODECYT No. 75-2012

Dr. ALBERTO GARCÍA GONZÁLEZ
Investigador Principal

GUATEMALA, FEBRERO 2014.



CLÍNICA
BARCELONA
Hospital Universitari

AGRADECIMIENTOS:

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, -FONACYT-, otorgado por La Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología - SENACYT- y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT-.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC, en especial al Sr. Decano Dr. Jesús Arnulfo Oliva Leal, por su confianza y apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC. En especial a la Dra. Carmen de Tercero, Dra. Elisa Hernández de Rodas y Elder Lay por permitir realizar el procesamiento de las muestras.

Al Instituto Nacional de Cancerología INCAN, en especial a los doctores Dr. Enrique López Sánchez, Dr. Hesler Morales, Dr. Miguel A. Echeverría, Jorge Álvarez y Dr. Guillermo Alfredo Lima, por apoyarme en la obtención y procesamiento de muestras.

Al departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clinic de Barcelona España, en especial al Dr. Jaume Ordi, por su apoyo y tutoría en la evaluación de muestras.

A los Patólogos evaluadores de Guatemala, en especial Dr. Erick Soch y Dr. Orlando Rodas

RESUMEN

Existe una prueba que tiñe a las proteínas P16 y Ki67 en células transformadas. Aumenta la especificidad de la citología cervical al detectar lesiones Escamosas Intra Epiteliales y cáncer invasivo.

El objetivo principal del estudio fue evaluar clínicamente la correlación entre los resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67, impresión Colposcópica se Histología; en los diferentes tipos de lesiones cervicales de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología.

Estudio descriptivo; previamente a la colposcopia se recolectó muestras de exfoliado y después biopsia del cérvix de 200 pacientes, las cuales fueron procesadas con inmunohistoquímica según instrucciones del fabricante. Fueron excluidas 24 muestras por mala calidad. Tres patólogos independientes evaluaron las muestras; La sensibilidad y especificidad de la citología de exfoliado cervical (CEC) con doble tinción fue de 76.64 % IC 95% (68.15 85.12) y 94.20 % IC 95% (87.96 100.0) respectivamente; el Valor Predictivo Positivo y Negativo fue de 95.35 % y 72.22 % respectivamente. Los índices de Correlación Tau b de Kendall entre CEC con doble tinción y Colposcopia fue de 0.489 y entre CEC con doble tinción e Histología final de biopsia ó cono cervical fue de 0.684 con $p < 0.001$.

Los índices de especificidad y de correlación Tau b Kendall de CEC con doble tinción fueron mayores que la citología convencional. El Valor Predictivo disminuyó los Falsos Positivos. La aplicación de esta prueba podría evaluarse en serie mayores de pacientes que sean sometidas a Conización por disociación de Citología respecto a Histología.

SUMMARY

There is a test staining to P16 and Ki67 proteins in transformed cells. Increases the specificity of cervical cytology to detect squamous epithelial lesions and invasive cancer.

The main objective of the study was to clinically evaluate the correlation between the results of Cytology double staining P16 and Ki67, colposcopic impression and Histology; in different types of cervical lesions of patients from the National Cancer Institute..

Descriptive study; prior to colposcopy samples of exfoliated cervical biopsy and after 200 patients, which were processed by immunohistochemistry according to manufacturer's instructions were collected. 24 samples were excluded for poor quality. Three independent pathologists evaluated the samples; The sensitivity and specificity of exfoliated cervical cytology (ECC) double staining was 95% 76.64% (68.15 85.12) and 94.20% (95% CI 87.96 100.0) respectively; Positive and negative predictive value was 95.35% and 72.22% respectively. Correlation indices between Kendall Tau b ECC double staining and Colposcopy was between 0.489 and ECC double staining and final histology or cervical cone biopsy was 0.684 with $p < 0.001$.

The rates of specificity and correlation Kendall Tau b double staining were higher than cytology conventional. The predictive value decreased false positives. Applying this test could be evaluated in larger series of patients who are undergoing conization by dissociation between Cytology and Histology.

INDICE

| | |
|---|----|
| PARTE I | 1 |
| I.1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| I.2 Planteamiento del Problema | 3 |
| 1.2.2. Justificación..... | 7 |
| I.3 OBJETIVOS E HIPOTESIS | 8 |
| I.3.1 Objetivos | 8 |
| I.3.1.1 General..... | 8 |
| I.3.1.2 Específicos | 8 |
| I.3.2 Hipótesis..... | 8 |
| I.4 METODOLOGÍA..... | 9 |
| I.4.1 Tipo de estudio..... | 9 |
| I.4.2 Variables: | 9 |
| I.4.3 Estrategia Metodológica | 9 |
| I.4.4 Técnica estadística | 12 |
| I.4.5 Hipótesis Estadísticas..... | 12 |
| PARTE II | 14 |
| MARCO TEÓRICO (CONCEPTUAL) | 14 |
| II.1 Epidemiología del cáncer del cérvix en países en vía de desarrollo..... | 14 |
| II.2 Epidemiología del cáncer del Cérvix en latino América..... | 15 |
| II.4 Biología Molecular del Virus del Papiloma Humano (VPH) | 17 |
| II.5 Citología | 19 |
| II.6 Prueba de inmunohistoquímica P16 y Ki67 | 22 |
| II. 7 Comparación de prueba P16 con respecto a la prueba doble tinción P16 y Ki67en citología cervical..... | 22 |

| | |
|---|----|
| II. 8 Comparación de Prueba de doble tinción P16 y Ki67 respecto a la prueba de ADN del HPV de alto Riesgo..... | 22 |
| II. 9 Interpretación de la prueba P16 y Ki67 | 23 |
| II.10 Histología de biopsia cervical..... | 25 |
| II. 11 Diagnostico Colposcopico | 27 |
| II. 12 Tratamiento ó diagnóstico de lesiones cervicales..... | 27 |
| II. 13 Correlación citológica –colposcopia e histología | 29 |
| PARTE III | 30 |
| RESULTADOS..... | 30 |
| PARTE IV | 37 |
| IV.1 CONCLUSIONES | 37 |
| IV.2 RECOMENDACIONES | 38 |
| IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| IV.4 ANEXOS..... | 45 |
| PARTE V | 72 |
| V.1 INFORME FINANCIERO..... | 72 |

TABLAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 1 | Objetivo y sus variables, definición, definición operacional escala de medición Unidad de medida. | 10 |
| Tabla 2 | Valores ponderados de Citología, impresión Colposcópica e Histología | 12 |
| Tabla 3. | Datos generales de las pacientes que aceptaron participar en la unidad de colposcopia INCAN. | 31 |
| Tabla 4. | Resultados de estudios convencionales de citología de exfoliado, biopsia y cono cervical en pacientes que aceptaron participar. Unidad de colposcopia INCAN. | 32 |
| Tabla 5. | Impresión colposcópica de las pacientes que aceptaron participar en el estudio, unidad de colposcopia INCAN. | 33 |
| Tabla 6 | Resultados de Citología con tinción convencional según diagnóstico final de Histología H y E. | 33 |
| Tabla 7 | Resultados de Citología con doble Tinción según diagnóstico final de Histología con Tinción P16 | 34 |
| Tabla 8 | Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo según interpretación de Prueba de Citología Tinción Convencional y con doble Tinción. | 34 |
| Tabla 9 | Índice de correlación interobservador según tipo de muestra interpretada. | 35 |
| Tabla 10 | Índices de Correlación entre los tipos de citología con respecto a Histología e impresión Colposcópica según tipo de lesiones cervicales. | 35 |

FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Flujograma de actividades efectuadas..... | 13 |
| FIGURA 2. Estimación de casos con cáncer en hombres y mujeres , a nivel mundial, según Tipo de ciudad desarrollada ó no..... | 14 |
| FIGURA 3. Prueba de doble tinción P16 y Ki67 en citología de exfoliados Cervicales..... | 20 |
| FIGURA 4. Test dual P16/Ki67 en citología cervical..... | 25 |
| FIGURA 5. Muestras Histológicas del cérvix con la prueba P16INK4a..... | 26 |

GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| GRÁFICA 1. Incidencia y Mortalidad de Cáncer del Cérnix según Regiones del mundo. | 15 |
| GRÁFICA 2. Incidencia del Cáncer del Cérnix representado en tasa por 100,000 en países de Latino América. | 16 |
| GRÁFICA 3. Registro Hospitalario del INCAN de Guatemala, localizaciones más frecuentes en mujeres. | 16 |

DEDICATORIA

A Dios omnisciente, creador del mundo, por su amor y sabiduría.

A Mi esposa Brenda e Hijos Brenda Abigail y Alberto Carlos, por ser mi fuente de inspiración, fortaleza y amor.

A Mi mamá, Rosa María de García por su ejemplo y amor incondicional.

A Mi Papá, Dr. Mauro Antonio García Figueroa. Por su amor y ejemplo de superación.

A Mis suegros Carlos y Vilma de Ramírez, por su apoyo y amor.

A Mis Hermanos Mauro, Flor de María, Karola y cuñados Víctor Hugo, Mauricio, Erick, Karen, Julio y Carlos

PARTE I

I.1 INTRODUCCIÓN

En Guatemala se ha reportado la tasa de incidencia del cáncer del cérvix es de 39.6 por 100,000 habitantes y la mortalidad de 16.8 por 100,000 muertes reportadas.(Arrossi, Sankaranarayanan, & Parkin, 2003)

Las lesiones preinvasivas del cérvix tienen el potencial de producir cáncer Invasivo, siendo la tasa de progresión del 1 % para Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado LEIBG y de 34% para Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado LEIAG. (Andersson et al., 2005)

Los esfuerzos de Salud Pública para disminuir los índices tanto de incidencia como mortalidad en los respectivos países, ha realizado jornadas y campañas para ofrecer la Citología exfoliativa del cérvix conocido como papanicolaou. Siendo esta una prueba de tamizaje con una sensibilidad del 70 % y especificidad del 60%.(Nikolaos P. Polyzos MD, Antonis Valachis MD, Davide Mauri MD, 2011)

Para la detección de las lesiones preinvasivas del cérvix se utiliza la citología convencional como primer escalón; al tener resultados anormales se confirma ó descarta el diagnóstico con el estudio de Histología de biopsia, obtenida bajo visión colposcópica.(Larios, 2006)

Se ha reportado discrepancia entre resultado de citología e histología; de los cuales el 67 % es por error en la interpretación; siendo el 27% por error en interpretación de la citología. (Clary et al., 2002)

Se han utilizado biomarcadores que identifican células que estén transformándose ó sea que estén en proceso de neoplasia. Las células transformadas están afectadas por Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo VPH AR, detectando con mayor sensibilidad y especificidad a LIEBG y LEIAG. El Test dual P16 Ki67 en la citología tiene Sensibilidad del95,1%y especificidad de 82%. (Petry et al., 2011)

La interpretación de la citología de los exfoliados cervicales, puede estar afectado por la observación de imágenes celulares dudosas. La especificidad de la citología tradicional en algunos casos no permite identificar ó discriminar los casos verdaderos sanos. La discrepancia o falta de correlación entre la citología convencional con respecto a la colposcopia y/ó histología obliga al clínico a realizar conizaciones

cervicales que a veces son innecesarias; debido a que los resultados finales en pieza final ó cono cervical son negativos ó sea que no se evidenció lesiones cervicales.

El presente estudio evaluó La sensibilidad , especificidad e índice de concordancia Kappa ponderado de la interpretación de las citologías cervicales e histologías por los tres patólogos independientes con programa de Epidat 3. Se tomó como prueba de Gold estándar a la Histología de biopsia del cérvix ó en algunos casos pieza de cono cervical. Así mismo se midió el índice de Correlación entre los resultados de Citología con el test dual de tinción P16 y Ki67 con la impresión Colposcópica y resultados de Histología aplicando la prueba de Tau b de Kendall, se utilizó el paquete estadístico de SPSS 20.

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

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

Palabras claves

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

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer del cérvix es un problema de salud pública en países en vía de desarrollo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 casos nuevos en el mundo. Es responsable de 190,000 muertes anuales, de los cuales el 78 % ocurre en países en vía de desarrollo. En Guatemala se ha reportado que la tasa de incidencia del cáncer del cérvix es de 39,6 por 100,000 habitantes y la mortalidad es de 16.8 por 100,000 muertes reportadas. (Arrossi et al., 2003)

Los estudios sobre la epidemiología del cáncer del cérvix han demostrado que esta enfermedad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo tales como tabaquismo, edad temprana en el inicio de relaciones sexuales, número de parejas, infecciones bacterianas, etc. Sin embargo en múltiples estudios han concluido que el factor definitivo en la etiología del cáncer del cérvix es debido a la infección del cérvix por diversos tipos de virus del papiloma humano, denominados de Alto Riesgo u oncogénicos; HPV Hr- por sus siglas en inglés. (zur Hausen, 2002)

El Virus de Papiloma Humano VPH puede infectar epitelios y mucosas del ser humano y se clasifican de acuerdo con homologías en su material genético, en la actualidad se reconocen más de 100 tipos diferentes. Estudios reportan que la presencia del material genético del virus (ADN) se encuentra entre el 95% al 99.7% de los casos de cáncer del cérvix. (Carrillo et al., 2004)

La historia natural del cáncer del cérvix establece que algunas lesiones previas a cáncer del cérvix, conocidas como preinvasivas, evolucionan hasta cáncer invasivo; de las cuales las Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado LEIBG ó conocidas como CIN 1 y Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado LEIAG ó CIN 2, CIN 3 tienen la tasa de progresión hasta llegar a cáncer de 1 % y 34 % respectivamente. (Andersson et al., 2005)

Para la detección de las lesiones preinvasivas del cérvix se utiliza la citología convencional como primer escalón; al tener resultados anormales se confirma ó descarta el diagnóstico con el estudio de Histología de biopsia, obtenida bajo visión colposcópica. (Larios, 2006)

La citología es una prueba de tamizaje para la detección de lesiones cervicales, cuya sensibilidad y especificidad para lesiones cervicales LEIAG es del 70 y 60% respectivamente. (Nikolaos P. Polyzos MD, Antonis Valachis MD, Davide Mauri MD, 2011) El procedimiento de prueba de Citología con la técnica de Papanicolaou tiene algunas limitaciones, siendo la tasa de falsos negativos de las lesiones premalignas y el cáncer

cervical de 15 y 50% respectivamente, mientras que el 30% son falsos positivos para ambos grupo de lesiones. (Jacobs et al., 1999)

El ó los criterios secundarios subjetivos en la interpretación de las pruebas de Citología con tinción papanicolaou están sujetos a una marcada variabilidad inter e intraobservador, así como tiene una relativa baja sensibilidad para la neoplasia de cuello uterino, en una sola muestra; tan bajo como 66% de sensibilidad, confirmada con biopsia, las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. (Agoff et al., 2003).

De las discrepancias entre citología e histología, el 67% y el 33% se debieron a errores de interpretación y error en toma de muestras, respectivamente. De las discrepancias de interpretación, el 73% fueron resultado de un error histológico y el 27% resultado de un error citológico. De los errores en la interpretación de muestras histológicas, el 88% se debieron a sobre estimación en la biopsia . La mayoría de las biopsias clasificados como sobre estimadas (86%) fueron interpretados originalmente como negativo y reclasificado como Lesión Escamosa de grado bajo en la revisión, el 13% fueron interpretados originalmente como negativo o Lesión Escamosa de bajo grado.(Clary et al., 2002)

La Colposcopia es un método complementario de apreciación, en el cual se utiliza un colposcopio que amplifica la imagen del cérvix y se toma una ó más biopsias en las áreas que sean sospechosas. Las biopsias son procesadas para el estudio histológico; al tener el resultado de Histología éste se compara con el resultado de la citología y se determina si hay ó no correlación en el diagnóstico de lesión cervical.(Allard, Rodriguez, Rocca, & Parker, 2005)

La colposcopia, en estudios de concordancia inter observador, tiene una sensibilidad y especificidad del 61.1% y 94.4% respectivamente para diferenciar entre Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Riesgo (CIN1 y/ó condiloma) de las Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Riesgo. Tiene un índice de Kappa de 0.843 en las Lesiones escamosas intraepiteliales de Alto Riesgo. (Hammes et al., 2007)

En un estudio realizado en 84,244 pacientes de Columbia Británica, evaluó la correlación diagnóstica de la citología convencional, colposcopia y la histología de biopsia cervical. La correlación de la impresión ó apreciación colposcópica con citología fue en más del 90% de los casos; se sobreestimó en el 8.3%. La correlación del resultado de Citología con el de Histología fue del 82%; concluye el estudio que tanto la citología como colposcopia tienen alta sensibilidad pero baja a moderada especificidad.(Benedet, 2004)

En otro estudio realizado en los años 2004 al 2006, en el Hospital Universitario de North Staffordshire evidenció que hubo discrepancia ó no correlación de Citología con Colposcopia en 10% y discrepancia de la Citología e Histología en 35%.(Moss et al., 2009)

En la Unidad de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología INCAN de Guatemala, se atendieron pacientes con disociación, discrepancia ó no correlación, entre los resultados de Citología respecto a histología en un 27%, de todos los resultados. La disociación ó discrepancia del informe de La citología convencional indica que hay LEIAG y el resultado de histología de la biopsia dirigida por colposcopia es Negativa ó cervicitis. El informe de las pieza final de conización reportó que el 30% fueron “Negativas”, es decir que no se encontraron lesiones preinvasivas. Fuente libro de registro Colposcopia INCAN- Guatemala.

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

Recientemente en el 2010, se creó una prueba de inmunohistoquímica, que se aplica a las muestras de exfoliados cervicales ó citologías, utilizando dos diferentes marcadores al mismo tiempo conocido como Test de doble tinción con marcadores P16 y Ki 67; Identificando a las células transformadas y afectadas por el Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo. (Donà et al., 2012)

La P16 identifica la proteína P16 sobre expresada en citoplasma en casos en que la célula ha sido alterada su ciclo celular por el Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo; dicha alteración se debe al bloqueo de un vigilante anti tumoral denominado Retinoblastoma Rb. El otro marcador es el Ki67 que identifica los núcleos de células transformadas que están alteradas la proliferación por HPV de Alto Riesgo. La ventaja con respecto a la captura híbrida y otras pruebas de detección del ADN del HPV, es que estas últimas identifican la presencia del HPV de Alto ó Bajo riesgo, sin evidenciar a las células que están transformadas, como lo puede detectar la doble tinción P16 y Ki67. Además tiene mayor especificidad en las lesiones preinvasivas del cérvix que las pruebas de detección del ADN del HPV. (Schmidt, Bergeron, Denton, & Ridder, 2011)

Estos biomarcadores identifican células que estén transformándose ó sea que estén en proceso de neoplasia, detectando con mayor sensibilidad y especificidad LIEBG y LEIAG. El Test dual P16 Ki67 en la citología tiene Sensibilidad del 95,1% y especificidad de 82%. (Petry et al., 2011)

Preguntas del Estudio

1. ¿Habrá correlación Clínica del Test de doble Tinción P16 y Ki 67 en citología cervical con respecto a la impresión colposcópicas y resultados Histológicos.

2. ¿Podrá esta prueba de doble Tinción P16 y Ki67 ser más sensible y específica para detectar lesiones anormales del cérvix que la citología convencional?.

La búsqueda de pruebas diagnósticas, menos invasivas y más precisas para la detección de lesiones del cérvix permitirá disminuir los casos de falta de correlación ó discrepancia, entre la citología convencional, impresión colposcópica e Histología.

La citología del exfoliado del cérvix es una prueba de tamizaje de lesiones previas ó precursoras de cáncer cervical que tiene una sensibilidad y especificidad para lesiones cervicales LIEAG de 70 y 60% respectivamente (Farley, McBroom, & Zahn, 2005)

La Citología es una prueba de tamizaje para detectar lesiones del cérvix, la cual puede aumentar sensibilidad , especificidad y la correlación interobservador utilizando el Test doble tinción P16 y Ki67 . El Test dual P16 Ki67 en la citología tiene Sensibilidad del 95,1% , especificidad de 82% con índice de concordancia por Kappa . (Petry et al., 2011)

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

1.2.2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se reporta en el INCAN de Guatemala el 30 % de las pacientes a quienes se les realizó conización del cérvix, al examinar por histología la pieza del cono cervical se diagnóstica finalmente que es negativo ó sea sin lesión preinvasiva para las lesiones del cérvix; lo cual demuestra que casi un tercio de los procedimientos de conización fueron realizados sin haber precisión en el diagnóstico inicial. Esto es debido a que el diagnóstico previo a la realización de las conizaciones eran precisos, provocando falta de correlación ó disociación Citología Histológico.

Esta prueba podría ayudar a detectar mejor las lesiones escamosas Intraepiteliales de Bajo ó CIN 1 y Alto Grado ó CIN 2, 3 Carcinoma epidermoide In Situ ; discriminándolas de las negativas. Utilizándola como prueba diagnóstica complementaria a los estudios en pacientes con disociación de citología, colposcopia e Histología.

En Guatemala y en el área de Centro América no hay estudios reportados acerca de este tema.

I.3 OBJETIVOS E HIPOTESIS

I.3.1 OBJETIVOS

I.3.1.1 GENERAL

Evaluar la correlación Clínica entre los resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67, impresión Colposcópica y los resultados de Histología; según los diferentes tipos de lesiones cervicales (LEIBG, LEIAG y Carcinoma invasivo), en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología durante los años 2013 y 2014.

I.3.1.2 ESPECÍFICOS

I.3.1.2.1 Estimar la sensibilidad y especificidad del Test con doble tinción P16 y Ki67 en la citología cervical según el tipo de lesión cervical diagnosticado por Histología.

I.3.1.2.2 Valorar la correlación de los resultados del Test con doble tinción P16 y Ki67 en la citología cervical con respecto a la impresión colposcópica.

I.3.1.2.3 Comparar la correlación de los resultados del Test con doble tinción P16 y Ki67 en la citología cervical y los resultados de la citología convencional con respecto a los resultados de Histología.

I.3.2 HIPÓTESIS

I.3.2.1 La sensibilidad y especificidad de la Citología con test doble tinción P16 y Ki67 es mayor que la Citología convencional según las lesiones cervicales

I.3.1.2. Existe correlación clínica entre los resultados de la Citología con test doble tinción P16 y Ki 67 , la impresión Colposcópica y resultado Histopatológico, según el tipo de lesión cervical

I.4 METODOLOGÍA

I.4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio es descriptivo transversal

Instituciones Participantes

- a) Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Laboratorio Biomédica. Centro Metropolitano Universitario –CUM- zona 11 ciudad de Guatemala.
- b) Unidad de Colposcopia y Patología del Instituto Nacional de Cancerología-INCAN- Zona 11 Ciudad de Guatemala.
- c) Facultad de Medicina departamento de Patología Hospital Clinic- Universidad de Barcelona- España.

Ver cartas de colaboración y entendimiento , Anexo 3 página 49

I.4.2 Variables:

Cualitativas Ordinales:

Resultados Citologías: ASCUS, ASC-H, LIEBG (Condiloma) , LIEAG, Cáncer invasivo epidermoideó Cáncer invasivo Adenocarcinoma.

Impresión colposcópica: Negativa, Poco significativa, Significativa y Muy Significativa

Resultados por Histología en Biopsia ó Cono cervical: Normal ó Cervicitis, LIEBG (CIN ó Condiloma) , LIEAG, Cáncer invasivo epidermoide, Cáncer invasivo Adenocarcinoma ó mixto.

Ver tabla No1 de las variables

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión: Paciente que consultó a colposcopia con resultado de citología convencional de: ASCUS, LIEBG (Condiloma) , LIEAG, Cáncer invasivo epidermoide ó Cáncer invasivo Adenocarcinoma.

Criterios de exclusión: Paciente embarazada, Colposcopia insatisfactoria ó posterior a tratamiento de: histerectomía, conización cervical, quimioterapia ó radioterapia. Los casos serán excluidos del estudio si los frotos de exfoliado cervical no cumplen con los criterios mínimos de celularidad escamosas como se especifica en el Bethesda 2001 citología cervical Clasificación del sistema para informar la citología del cérvix.

I.4.3 ESTRATEGIA METODOLÓGICA

Captación de casos, muestras clínicas y Colposcopia con Biopsia cervical

La muestra estimada fue de 165 pacientes 95% CI en la Clínica de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología INCAN- de Guatemala, referidas por citología convencional con resultado anormal, desde Células Escamosas con Atípia de Significado no determinado por sus siglas en inglés ASCUS, Células Glandulares de Significado no Determinado por sus siglas en inglés AGUS, Lesión Escamosa Intraepitelialde Bajo Grado LEIBG. Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado LEIAG y Cáncer Invasivo. Por cada

paciente se obtuvo 2 a 3 muestras: una para citología, otra para Histología que incluyo biopsia cervical y en algunos casos tejido de Conización cervical. Al final fueron 176 casos

En la primera consulta, las pacientes leyeron ó se les leyó y al estar de acuerdo firmaron ó colocaron su huella digital en el consentimiento informado, para poder participar en el estudio. Ver anexos 1 y 2 páginas 46 y 48 respectivamente.

Tabla 1Objetivo y sus variables, definición, definición operacional escala de medición Unidad de medida.

| OBJETIVOS | VARIABLE | Definición | Definición Operativa | Escala de medición/Unidad de Medida |
|--|---|--|---|--|
| <p>Evaluar la correlación Clínica entre los resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67, impresión Colposcópica y los resultados de Histología; según los diferentes tipos de lesiones cervicales (LEIBG, LEIAG y Carcinoma invasivo), en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología durante los años 2012 y 2013.</p> | <p>Resultado Citología con doble Tinción P16 y Ki67</p> | <p>Exfoliaco del cérvix teñidos por medio de la técnica de Inmunohistoquímica con dos biomarcadores P16 y Ki67. Los cuales detectan células cervicales transformadas ó neoplásicas</p> | <p>Toma de exfoliaco del cérvix por medio de espátula de Ayre para exocérvix y capillo para endocérvix. Dicho frcte se coloca en laminilla acetilada y es fijada con CitoFix. Se preserva a temperatura ambiente y posteriormente se procede a realizar la Inmunohistoquímica con reactivos test Dual siguiendo las recomendaciones del fabricante. Serán examinadas a través de un microscopio de luz con aumentos de 10 y 45 X. Interpretado el estudio por Médico s patólogos. Deberá marcar en la boleta la opción ó resultado que considere correcta</p> | <p>ORDINAL (Politémico) 1. Negativo ó cambios inflamatorios 2. ASCUS ó AGUS 3. NIC 1 ó Condiloma= LIEBG 4. NIC 2 ó NIC 3= LEIAG 5. Cáncer Invasivo epidermoide, adenocarcinoma ó mixto.</p> |
| | <p>Impresión colposcópica</p> | <p>Observación del cérvix a través de un colposcopio; que aumenta ó amplifica la imagen del cérvix pudiendo evidenciar y detectar halazgos que orienten al especialista a sospechar lesiones preinvasivas e invasivas del cérvix</p> | <p>La impresión colposcópica se establece según los signos ó halazgos observados a través del colposcopio por El médico especialista. Se coloca previamente espéculo vaginal, ácido acético al 5% . Según su apreciación Negativa cuando no hay neoplasia Poco significativa cuando sospecha de NIC 1 , Condiloma ó LIEBG.</p> | <p>ORDINAL 1. Negativo (Normal ó cervicitis) 2. Poco Significativo(NIC 1/condiloma ó LIEBG 3. Significativo (NIC 2-3 ó LEIAG) 4. Muy significativo (cáncer</p> |

Inicialmente se tomó un frote cervical y cepillado endocervical, con paleta Ayré y citobrush respectivamente, para realizar Citología tinción dual (P16y Ki 67) en extendidos del cérvix. Ver anexo 4 página 53.

Posteriormente se procedió a realizar la colposcopia, según las recomendaciones de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia. Se tomó una ó más biopsias del cérvix según los hallazgos, así como Legrado Endocervical si se sospechó de lesión endocervical. Cada paciente tiene un archivo de imágenes y almacenamiento de datos de los hallazgos y de la Impresión Colposcópica. Así mismo se llenó en el respectivo expediente los hallazgos e impresión colposcópica. Las impresiones colposcópicas fueron consensuadas por el grupo de médicos de la Unidad de Colposcopia del INCAN observando las imágenes archivadas de cada colposcopia. Ver anexo 5 página 54.

Los resultados histológicos de las biopsias ó conos cervicales procesados con inmunohistoquímica P16 en el corte histológico, fueron consideradas como la prueba Gold Estándar ó prueba de oro.

Las muestras fueron entregadas y almacenadas en el laboratorio de Patología Anatómica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. En dicho laboratorio se realizaron bajo las recomendaciones, del laboratorio del Hospital Clinic Universidad de Barcelona con el Dr. Jaume Ordi, la tinción de frotos del exfoliado cervical de según instrucciones del fabricante de CINtec-PLUS ver anexo 6 página 55.

En Guatemala hubo dos patólogos que interpretaron las muestras del exfoliado cervical, procesadas con la doble tinción de P16y Ki67, denominados patólogo **A** y patólogo **B** de Guatemala y patólogo **C** de Barcelona España (considerándolos como el experto). Cada Muestra de exfoliado cervical y de Histología fue identificado con un código ó registro especial sin información que inclinó al sesgo en la interpretación de cada laminilla. Al obtener los resultados de ambos grupos se realizó la concordancia inter observador frente al experto. Cada Patólogo llenó una boleta de informe de citología así como de histología ver anexos No 7 y No 8 páginas 63 y 64 respectivamente, Ver figura 1.

Con respecto a los datos de las colposcopias e informes de anatomía patológica, cada paciente tiene un expediente con las imágenes y descripción de los hallazgos tanto en forma escrita como datos de Excel . Ver anexo 9 página 65.

Las imágenes de las muestras de citología , Histología fueron archivadas, se ejemplifica un atlas de las diferentes tipos de diagnósticos. Ver Anexo 10 página 66.

I.4.4 TÉCNICA ESTADÍSTICA

La validez de la Pruebas de Citologías con tinción convencional y con tinción dual fue medida por medio de la sensibilidad y especificidad. tablas cruzadas de 2 x 2 con IC 95% .El gold estándar fue la histología concluyente final por biopsia ó cono cervical con Tinción de Hematoxilina y Eosina para citología convencional y con Tinción P16 para la citología con tinción dual.

La concordancia en la interpretación de la prueba de citología con tinción dual P16 y Ki67 ,Impresión colposcópica e histología por medio del coeficiente Kappa Ponderado. Se utilizó programa Epidat versión 3.

Se utilizó el Test de Correlaciones para variables dependientes e independientes con Test de Tau b de Kendall con el programa SPSS versión 20. Para la correlación Colposcopia con Citología con tinción doble P16 y Ki67, correlación de la citología con el test de doble tinción con la histología así como la correlación de la citología convencional con respecto a la histología. Aceptando ó descartando las hipótesis estadísticas con un valor de significancia $p < 0.05$ y CI 95%.

A fin de evaluar la correlación entre los métodos que ayudan al diagnóstico de lesiones del cérvix, se ponderó cada uno de ellos, para hacer la equivalencia.

Tabla 2Valores ponderados de Citología, impresión Colposcópica e Histología

| VALOR PONDERADO y Categorizado | RESULTADO DE CITOLOGÍA CONVENCIONAL | RESULTADO DE CITOLOGÍA CON TEST DUAL P16 KI67 | IMPRESIÓN COLPOSCÓPICA/ COOPLESÓN | RESULTADO DE HISTOLOGÍA |
|--------------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| 1 | Cambios Inflamatorios, (ligero-severo) | Cambios Inflamatorios, (ligero-severo) | Negativa | Normal,Cervicitis Sin anormalidades |
| 2 | LEIBG (NIC I, Condiloma) ASCUS ó ASC-H | LEIBG (NIC I, Condiloma) ASCUS ó ASC-H | Poco Significativa | LEIBG (NIC I, Condiloma) |
| 3 | LEIAG (NIC 2,3, CA Insitu) | LEIAG (NIC 2,3, CA Insitu) | Significativa | LEIAG (NIC 2,3, CA Insitu) |
| 4 | Cáncer invasivo de tipo escamoso, mixto, adenocarcinoma, otros | Cáncer invasivo de tipo escamoso, mixto, adenocarcinoma, otros | Muy Significativa | Cáncer Microinvasivoó Invasivo (Escamoso,Mixto, adenocarcinoma, otros) |

I.4.5 Hipótesis Estadísticas

HO1 No existe Correlación entre resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67, y los resultados de Histología; según los diferentes tipos de lesiones cervicales.

HA1 Existe Correlación entre resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67 y los resultados de Histología; según los diferentes tipos de lesiones cervicales.

HO2 No existe Correlación entre resultados Citología con doble tinción P16 y Ki67 y la impresión Colposcópica; según los diferentes tipos de lesiones cervicales.

HA2 Existe Correlación entre resultados Citología con doble tinción P16 y Ki67 y la impresión Colposcópica; según los diferentes tipos de lesiones cervicales.

Para rechazar la Hipótesis nula se deberá tener el resultado de $P < 0.05$

FIGURA 1. Flujograma de actividades efectuadas.

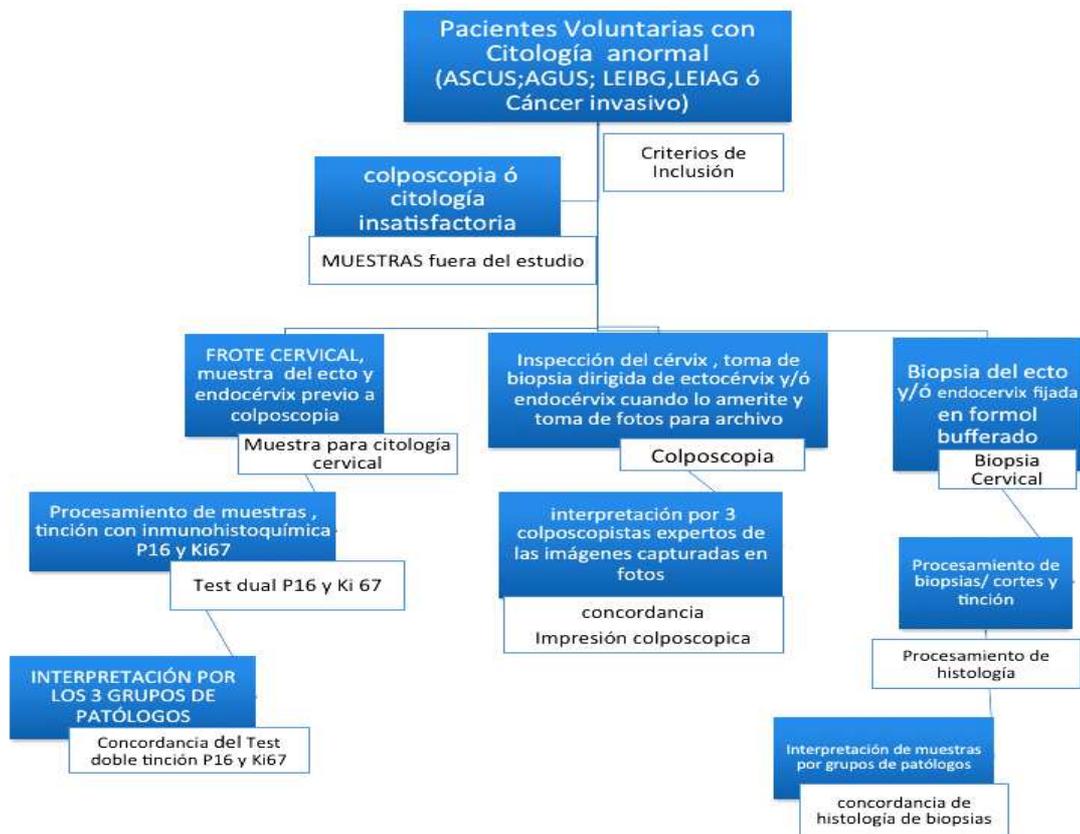


Figura 1 Flujograma de actividades según la metodología efectuada , Inició con la selección de pacientes voluntarias que llenaron los criterios de inclusión, algunos casos fueron sacados del estudios debido a colposcopia ó citología insatisfactoria. La paciente al ser atendida en la Unidad de Colposcopia se le tomó muestra de citología de exfoliado cervical, se efectuó la colposcopia y biopsia del cérvix para estudio de histología. Se evaluó los índices de concordancia para la prueba de doble tinción P16 y Ki67, Impresión colposcópica y la interpretación de la Histología.

PARTE II

MARCO TEÓRICO (CONCEPTUAL)

II.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DEL CÉRVIX EN PAÍSES EN VÍA DE DESARROLLO

En Países en desarrollo el cáncer de cérvix es el segundo diagnóstico más frecuente y segunda causa de muerte por enfermedad de cáncer en las mujeres .ver figura 2

En términos generales, es mucho más común en los países en desarrollo, donde ocurre el 85% del total de casos de muertes por cáncer cervical. El cáncer cervical ocurre en el 15% del total de cánceres en la mujer, con un riesgo, antes de los 65 años, del 1.5% en los países desarrollados.

En la Gráfica No 1 se observa que América Central ocupa la octava región, siendo la incidencia de 22.2 y mortalidad de 11.1 por 100,000 habitantes con diagnóstico de Cáncer del cérvix. (Jemal Ahmedin, Bray Freddie, Center Melissa, Ferlay, Ward Elizabeth, 2011)

En los países en desarrollo, el cáncer de cuello uterino ha cedido su lugar como el principal tipo de cáncer, al cáncer de mama que ahora es el cáncer más frecuente en la mujer; sólo en el África subsahariana, América Central, southcentral Asia, Melanesi sigue actualmente siendo el principal cáncer que afectan a las mujeres.(Muñoz et al., 2003)

FIGURA 2. Estimación de casos con cáncer en hombres y mujeres , a nivel mundial, según Tipo de ciudad desarrollada ó no.

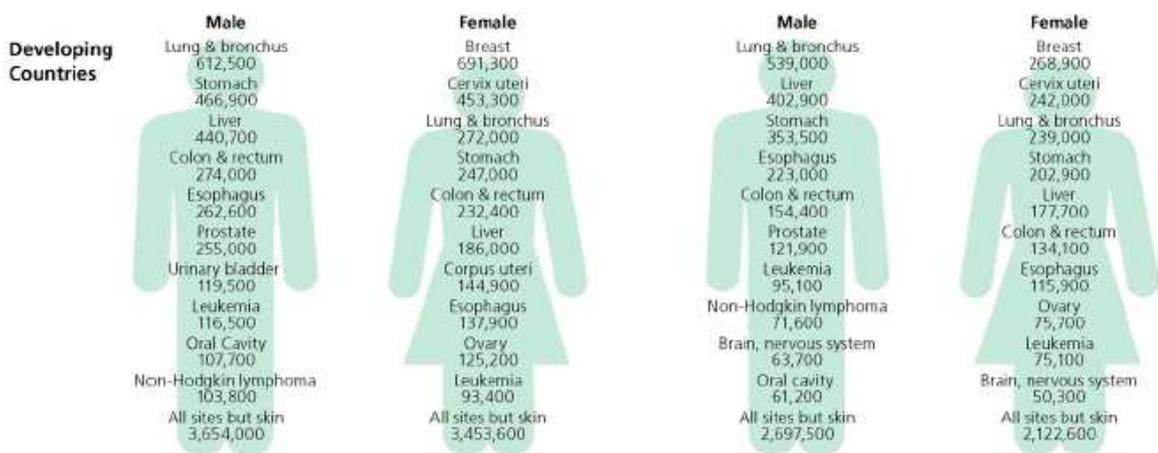
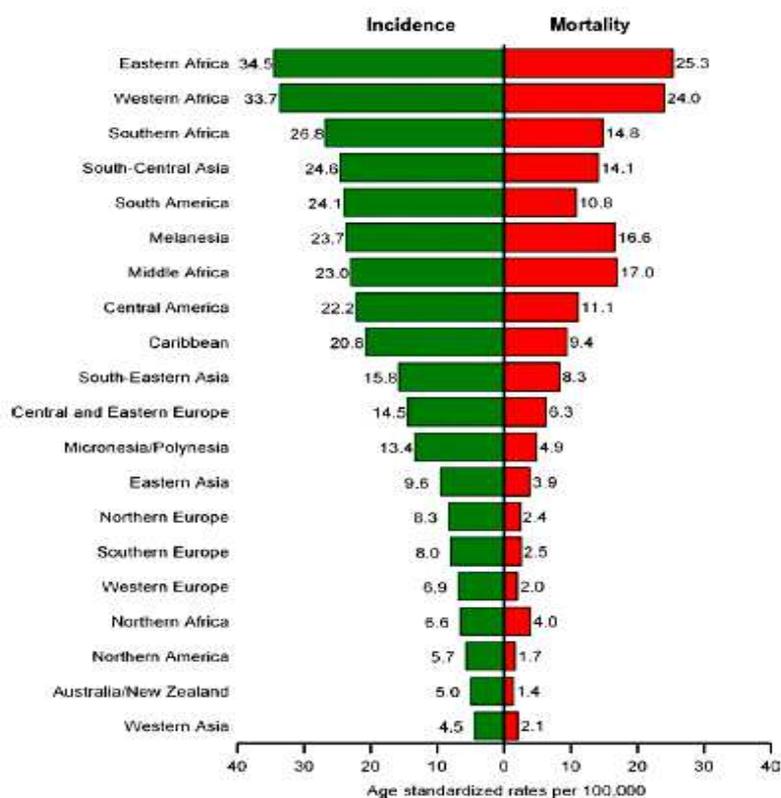


Figura: 2 Estimación de nuevos casos en el mundo, según lugar del cáncer, en países en desarrollo, 2008. Fuente: Globocan.. CA: A CancerjournalforClinicians.

II.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DEL CÉRVIX EN LATINO AMÉRICA

La alta incidencia de Cáncer del cérvix en la región de Latino América se observa en las estadísticas mundiales. Así mismo las tendencias en los países en desarrollo no han modificado su incidencia a lo largo de los años. (Restrepo, 1993)



GRÁFICA 1. Incidencia y Mortalidad de Cáncer del Cérvix según Regiones del mundo.

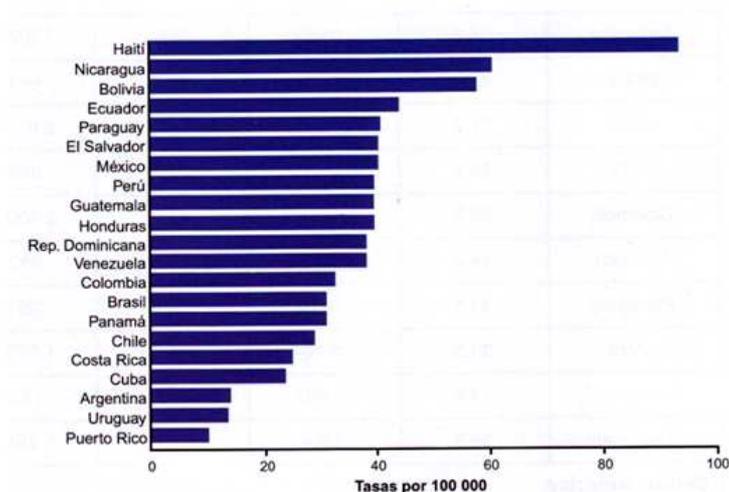
Fuente Globocan 2008

Se reconoce la dificultad en recaudar los datos epidemiológicos de esta enfermedad debido a que el control y registro de algunos países es deficiente. (Alonso Patricia de Ruiz, et al. 2005).

Según los datos obtenidos y publicados por GLOBOCAN 2,000 se observa que los países como Haití, Nicaragua y Bolivia tienen las más altas tasas de incidencia en Latino América. Guatemala tiene una incidencia similar a México, Honduras, El Salvador y Perú, con una tasa aproximada es de 39 por 100,000. (Drain, Holmes, Hughes, & Koutsky, 2002). Ver Gráfica 2.

II.3 INFORME EPIDEMIOLÓGICO DEL CÁNCER DEL CÉRVIX EN GUATEMALA

Según los datos presentados por el Instituto Nacional de Cancerología INCAN de Guatemala, del año 2,008. Se establece que la mayor frecuencia de tumores en las mujeres, según localización, es el cáncer Invasivo del cérvix en un 34.2 %. Seguida por el Cáncer In-situ del cérvix, un estadio previo al cáncer invasivo, con 4.9%. Ver Gráfica No 3.



GRÁFICA 2. Incidencia del Cáncer del Cérvix representado en tasa por 100,000 en países de Latino América.

Fuente Globocan 2000.



GRÁFICA 3. Registro Hospitalario del INCAN de Guatemala, localizaciones más frecuentes en mujeres.

Fuente: registros de cáncer INCAN 2008

Se observa que la suma de los casos de cáncer invasivo e In-situ del cérvix da el 39.1% del total de los tumores según localización del cuerpo en las mujeres que asistieron al INCAN de Guatemala. (Instituto Nacional de Cancerología “Bernardo del Valle” de Guatemala, 2,008)

II.4 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Los Virus del Papiloma Humano (VPH), son muy diversos, y probablemente se producen en la mayoría de los mamíferos y aves. Cientos de tipos VPH se han detectado en los seres humanos. Han pasado más de tres décadas de investigación, un gran número de especialistas y se han obtenido las secuencias de miles de VPH aislados; para establecer una base de datos que nos permite proponer un sistema de clasificación que probablemente será más estable, mientras que se encuentran más tipos de VPH. Se realizó una revisión de esta base de datos y su interpretación por criterios filogenéticos que llevó a niveles taxonómica "familia", "género", "especie" y "tipos".(de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004)

Los tres genes poseen capacidad de la estimulación de proliferación son:E5, E6 y E7 .el gen E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección. Estimula a la célula en el crecimiento mediante la formación de un complejo con el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. (DiMaio, 2007)

También se demostró que E5 ayuda a prevenirla apoptosis después del daño deADN .Sin embargo, en células Infechadas por el VPH en lesiones que progresan a cáncer cervical, el ADN viral en estado episomal, con frecuencia al integrarse en la célula huésped de ADN la codificación de la secuencia del E5 es delecionada .(Schwarz Elizabeth, 1985)

Por lo tanto, la proteína E5 no es obligatoria para desencadenar la carcinogénesis mediada por el VPH. Un papel más significativo para la transformación maligna de la célula son las proteínas y sus genes E6 y E7 .Son siempre expresadas en tejidos ó tumores malignos, ya que son capaces de inmortalizar a las células humanas transformadas es decir no son obligadas a entrar a apoptosis (Phelps, Bubb, Howley, & Schlegel, 1989).

Varias funciones se han descrito para las proteínas de los genes del VPH E6 y E7 Las primeras observaciones revelaron que E6 interactúa con p53 y E7 interactúa con RB para bloquear la actividad de estos supresores de tumores. De hecho, algunas de las funciones importantes de la proteína E6 se originan a partir de su interacción con la P53 para posteriormente degradarla así como a la proteína BAK denominada proapoptótica lo que se

traduce en la resistencia a la apoptosis y el aumento de la inestabilidad cromosómica. (Jones, Alani, & Mu, 1997)

Además, la activación de telomerasa y el postulado de inhibición de la degradación de las quinasas de la familia SRC por medio de la oncoproteína E6 parecen cumplir funciones importantes en la estimulación del crecimiento. Se ha especulado que la estabilización de las formas activadas de miembros específicos de la familia de las cinasas SRC podría contribuir a la transformación del VPH. (Oda, Kumar, & Howley, 1999)

La cinasa INK4A dependiente de ciclina inhibidora conocida como p16 parece contrarrestar estas funciones. Sin embargo la E7 interactúa y degrada la RB, liberando posteriormente el factor de transcripción E2F de RB e inhibe al gen INK4A. (Agoff et al., 2003)

La alta actividad de E2F podría conducir a la apoptosis en células que expresen el E7. Sin embargo la E7 puede estimular la fase S cuando a su vez estimula los genes de ciclina A y ciclina E. (Zerfass, 1995) y parece bloquear la función de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina WAF1 (también conocido como CIP1 y p21) y KIP1 (también conocido como p27). (Jones et al., 1997)

La E6 parece verse afectada por INK4A, mientras que E7 no está afectada por esta inhibición de la activación directa de las ciclinas A y E. La E6, a su vez, evita que la apoptosis inducida por E7 al degradar la inducción de apoptosis de las proteínas p53 y BAK. (Zerfass, 1995).

Actualmente no se ha observado un papel en la conversión de la célula a maligna con respecto a las proteínas tempranas del VPH (como son E1, E2 y E4). Las L1 y L2 son dos proteínas estructurales, que conforman la cápside viral, que no se expresan en las células precancerosas ni malignas, aunque han sido importantes para el desarrollo de vacunas. El sistema inmune es importante en el control de Infecciones de HPV. (Stanley, 2010)

Hay pruebas de la participación de la inmunidad celular por medio de linfocitos T-ayudadores así como de la inmunidad Humoral en las células en regresión de las lesiones premalignas. (Song et al., 2008)

El escape a la vigilancia inmunológica surge como un paso importante en la progresión de los tumores vinculados al VPH. Además hay otros dos modos de control en la proliferación de células que están infectadas por el VPH para protegerlos en contra de la transformación maligna: una consiste en la inhibición de la función oncogénica viral, y el otro consiste en control de la transcripción de los genes virales. (zur Hausen, 2002)

La proteína E 6 compuesta por 150 aminoácidos y por dos dedos de Zinc que representan motivos esenciales para su función. La proteína E6 afecta las células epiteliales en el humano, actúa junto con el factor activado Ras transformando a las células. Así mismo es capaz de afectar diversas proteínas tales como supresores tumorales entre ellas la de mayor relevancia P53, transductores de señalización, crecimiento de la célula y de las Ubiquitin ligasas, la cual es responsable de la degradación de proteínas por medio de las proteasoma. La actividad más relevante de la proteína E6 es la degradación de p53 a través de la unión de la ubiquitin ligasa, dejando a la célula a merced del daño del ADN. Otra actividad relevante es su función como factor de transcripción que estimula a la telomerosa, factor estimulador del endotelio vascular, fibronectina y del oncogen c-Myc. (Mantovani & Banks, 2001)

La proteína E7 afecta la regulación de la proliferación celular, interactuando con proteínas reguladoras, especialmente en el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S. Además se asocia con las desacetilasas de histonas, factores de transcripción del tipo AP1, la proteína de interacción con la caja TATA, diferentes ciclinas y con cinasas dependientes de ciclinas conocidas como CDK. La proteína E7 al igual que la proteína E6 es expresado durante el proceso de transformación maligna de la célula. (Münger, Baldwin, & Edwards, 2004)

En las líneas celulares que han sido transfectadas por el ADN de E6 del HPV, el gen CDKN2A que codifica al INK4A es normalmente inactivada por metilación, la mutación o eliminación. INK4A inactiva a los complejos de la ciclina D1-CDK4 ó a la ciclina D1-CDK6, lo que impide la expresión de ciclina E y por tanto la progresión a través del celular ciclo. La interrupción constante del gen CDKN2A función en las células E6-inmortalizado indica que INK4A funcionalmente pueden interferir con la actividad de transformación de E6. (Reznikoff, 1994)

La expresión del gen E7 puede estimular directamente a las ciclinas A y E a través de su interacción con la pRb. En las células que se immortalizan por E6 y E7, el gen CDKN2A se mantiene intacta. (Klaes, y otros, 2001)

II.5 CITOLOGÍA

El objetivo principal del tamizaje con la citología cervical es prevenir la morbilidad y mortalidad del cáncer cervical. (Saslow et al., 2012)

La incidencia de cáncer cervical en muchos países ha disminuido cuando hay acceso a centros de asistencia en salud y se les practica el frote cervical para estudio citológico ó conocido como Papanicolaou, para detectar lesiones precursoras de cáncer cervical. Sin embargo en Estados Unidos de América y Europa aún es la segunda causa de cáncer en mujeres entre los 22 y 44 años de edad. El 7% de resultados de citología son anormales, los

cuales requieren de la referencia a colposcopia para realizar la biopsia dirigida. (Cai et al., 2007)

La prueba del Papanicolaou ó llamada citología exfoliativa ha sido un método económico y accesible para la detección especialmente de lesiones preinvasivas del cérvix. El uso de esta técnica ha disminuido la mortalidad y morbilidad del cáncer del cérvix, siendo en países desarrollados una frecuencia del 4.4%. Las tasas de Falso Negativo y Falso Positivo son del 20% y 30% respectivamente; esto podría ser por la subjetividad y la discrepancia entre patólogos.(Murphy et al., 2003)

El procedimiento de prueba de Citología ó llamada Papanicolaou tiene algunas limitaciones. La tasa de falsos negativos de las lesiones premalignas del cuello uterino y cervical el cáncer se encuentra entre 15 y 50% mientras que el 30% son falsos positivos.(Rijkaart et al., 2010)

Se ha valorado la sensibilidad, especificidad y Valor predictivo negativo de la citología cervical y prueba de ADN VPH, en Lesión intraepitelial de Alto Grado; siendo los siguientes resultados: La sensibilidad es 64% y 97% para Citología y Prueba de ADN VPH respectivamente, La especificidad es 89.1 % y 92.4% para Citología y Prueba de ADN VPH respectivamente y por último el Valor Predictivo Negativo es 99.75 y 99.98 para Citología y Prueba de VPH respectivamente. (Bigras & Marval, 2005)



FIGURA 3. Prueba de doble tinción P16 y Ki67 en citología de exfoliados Cervicales.

Núcleo celular color rojo Ki67 positiva y citoplasma Color café marrón P16 positivo. Fuente: Petry 2011

Así mismo se ha intentado mejorar la sensibilidad de la detección sistemática por medio de la citología con base líquida, como por ejemplo ThinPrep.Sin embargo se comprobó en un estudio que la citología convencional tuvo ligeramente mayor sensibilidad y especificidad que el ThinPrep.(Coste et al., 2003) representatibilidad celular y

disminución de artefactos.(Mattosinho de Castro Ferraz et al., 2004)(Trial, 2008)(Lee et al., 1997)(Arbyn et al., 2008)

Se efectuó un estudio para evaluar la concordancia en 4948 Citologías de Base Líquida en la interpretación de ASCUS y LEIBG; el Índice de concordancia Kappa ponderado fue de 0.59 con IC 95% (0.57-0.61) $p < 0.001$.(Stoler & Schiffman, 2001a)

Las células del cérvix ante la infección de los VPHAR que alteran el ciclo celular, proliferando lesiones escamosas intraepiteliales de Bajo a Alto Grado (LEIBG y LEIAG respectivamente) hasta llegar a Cáncer Invasivo.(Melnikow, Nuovo, Willan, Chan, & Howell, 1998)(Holowaty, Anthony, Rohan, & To, 1999)(Tindle, 2002)(zur Hausen, 2002)

Las lesiones del cérvix progresan hasta cáncer invasivo; de las cuales las LEIBG ó conocidas como CIN 1 y LEIAG ó CIN 2, CIN 3 tienen la tasa de progresión hasta llegar a cáncer de 1 % y 34 % respectivamente.(Andersson et al., 2005)(Saslow et al., 2012)

Una de las limitaciones de la citología es que tiene una tasa de falsos negativos de las lesiones premalignas y del cáncer cervical del 15 y 50% respectivamente, mientras que el 30% son falsos positivos para ambos grupo de lesiones; así como la subjetividad en la interpretación interobservador.(Jacobs et al., 1999)

Las LEIAG tienen una mayor reproductibilidad interobservador al interpretar muestras de exfoliado cervical, siendo CIN 3 entre 30 a 50% de concordancia.(Stoler & Schiffman, 2001b)

La citología tiene 97 % de especificidad frente a 94%de las pruebas de ADN VPH, para detectar LEIAG en mujeres mayores de 30 años.(Hanley, Ph, Ferenczy, Ratnam, & Coutlée, 2007)

Se comparó la sensibilidad y especificidad del ThinPrep respecto a Citología convencional teniendo el primero 75.3.% y 84.4% respectivamente, y 81.8% y 85.2% respectivamente para Citología Convencional.(Mattosinho de Castro Ferraz et al., 2004) Estadísticamente no hay significancia importante entre ambos tipos de citología; sin embargo hay ventajas en la citología ThinPrep como el tiempo de lectura,

Algunos estudios han complementado la citología con otras pruebas para detectar las lesiones cervicales. Una de ellas es el uso de un biomarcador que tiñe células transformadas denominada La prueba de Inmunohistoquímica P16^{INK4a}, la cual se aplica en citología, ver foto 1; en un estudio se comparó la sensibilidad y especificidad de la prueba en citología con respecto a HPV ADN por captura Híbrida y PCR, en lesiones cervicales NIC 2 y 3, teniendo la prueba de Inmunohistoquímica P16^{INK4a} mayor porcentaje de especificidad 67 a 69%.(Szarewski et al., 2008)

El uso de la citología y carga viral de los virus de papiloma humano de alto riesgo por medio de la Captura híbrida en combinación provee sensibilidad en 100%, Valor predictivo

Negativo 100% y una especificidad de 76.6% en casos de pacientes con enfermedad residual del cérvix tratados con conización. (Alonso et al., 2006)

En un estudio realizado en Tailandia fue asociado la citología con la prueba de Inmunohistoquímica p16 y con el Test de ADN del VPH por medio de la captura Híbrida obteniendo la sensibilidad del 100% en lesiones de Alto Riesgo NIC 2 y NIC 3. (Ekalaksananan et al., 2006)

II.6 PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA P16 Y KI67

Estos biomarcadores identifican a las células que están alteradas la vía de la proteína Retinoblastoma E2F1a cual es un factor de transcripción que ayuda a inducir a una célula se divida; pero está inactiva cuando se une a la proteína retinoblastoma (Rb). Cuando el oncogen E7 de VPH de alto riesgo se une a la célula huésped con Rb epitelial, a continuación, se libera E2F liberando ó produciendo p16 como un intento para frenar y equilibrar el ciclo celular, ya que también es activado por E2F libre. En el epitelio escamoso no infectada, p16 es normalmente sólo en raras ocasiones detectables mediante técnicas de inmunohistoquímica en las células basales. En contraste, hay un aumento paradójico en p16 en displasia de alto grado, que también se puede detectar con inmunohistoquímica. (Atkins, 2011)

Los virus de papiloma humano de alto riesgo aumentan el Ki-67 el cual es un antígeno nuclear y un marcador de proliferación celular, expresada en todas las fases del ciclo celular, excepto en fase G0. El anticuerpo monoclonal MIB-1, que está dirigido contra Ki-67, es utilizado rutinariamente por los patólogos como un método para determinar la actividad proliferativa de las células en muestras de histología, Así mismo se ha utilizado en la evaluación de lesiones cervicales dudosas y pruebas de Papanicolaou para aumentar especificidad. (Singh et al., 2011)

II. 7 COMPARACIÓN DE PRUEBA P16 CON RESPECTO A LA PRUEBA DOBLE TINCIÓN P16 Y KI67 EN CITOLOGÍA CERVICAL.

La especificidad de la Prueba P16 y Ki67 está aumentada con respecto a la prueba P16. La sensibilidad para ASCUS es de 92.2% (95%CI) para ambas pruebas; la especificidad para ASCUS es de 80.6 y 63.4% (95% CI) para prueba de doble tinción P16 / Ki67 y P16 respectivamente. Con respecto a LEIBG la especificidad es de 94.2 y 92 % respectivamente; finalmente la especificidad fue del 68 y 47%. (Schmidt et al., 2011)

II. 8 COMPARACIÓN DE PRUEBA DE DOBLE TINCIÓN P16 Y KI67 RESPECTO A LA PRUEBA DE ADN DEL HPV DE ALTO RIESGO

La persistencia de los virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo VPH AR son la causa del cáncer del cérvix, especialmente 16 y 18 involucrados en el 70% de los casos. (Pyne, Law, Hillyard, & Schlaberg, 2014) Según La Sociedad Americana del Cáncer, La sociedad Americana de Colposcopia y patología cervical y La Sociedad Americana de Patología

Clínica recomiendan el uso de la Prueba del ADN del VPH AR en pacientes arriba de 30 años hasta 65 años cada 5 años. (Force & Practice, 2013)

Las pruebas de ADN del HPV AR han sido desarrolladas para aumentar a sensibilidad en la búsqueda de pacientes con lesiones cervicales. Las pruebas encontradas al momento de la investigación son: Captura Híbrida 2 (HC 2), Linnear Array, Cobas, Seeplex HPV4A, Aptima HPV, Pre Tect HPV Proofer, Real Time Abbott, PCR Amplificor.

El (Gen-Probe) Aptima HPV se basa en la captura y amplificación mediada por transcripción, y la protección de la hibridación para la detección de la expresión del ARNm del gen viral E7 de 14 tipos de VPH AR. El ensayo PreTect VPH Proofer (Norchip) se realizó por TDL. Es un PCR multiplex de amplificación basada en la secuencia en tiempo real del gen viral E6/E7 mRNA expresadas por cinco tipos de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, y 45) utilizando conjuntos de cebadores específicos. El Real Time Abbott HPV HR assay (Abbott) es una prueba de PCR multiplex de tipo cualitativo en tiempo real, que también identifica específicamente el VPH 16 y VPH 18, mientras que al mismo tiempo detecta el resto de los tipos de VPH AR : 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. (Szarewski et al., 2012)

La Prueba de genotipado del VPH Linear Array. Diseñada por (Roche Diagnostics) utiliza cebadores biotinilizados para detectar una secuencia de nucleótidos dentro de la región L1 polimórfica del genoma de VPH que es de aproximadamente 450 pb longitud, contiene grupos de cebadores específicos para los genotipos siguientes: 6, 11, 16, 26, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 70, 73 y 82. Se efectúa manualmente e interpreta cualitativamente. (Comar et al., 2012)

La prueba de Tiempo Real y cuantificación por PCRq, implica la preparación automatizada de muestras y extracción de ADN combinado con PCR en tiempo real. Esta tecnología detecta y cuantifica 17 diferentes tipos de VPH, incluyendo los tipos de que se consideran tipos de alto riesgo en HC 2, y los de bajo Riesgo, es decir tipos 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67 y 68, descrito por Micalessi et al. (Depuydt et al., 2012)

Se ha comparado la sensibilidad y especificidad de la prueba de doble tinción P16 y Ki67 en Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado LEIAG con respecto a prueba de ADN de VPH de Alto Riesgo. Se reporta que la sensibilidad es similar aunque la especificidad es mayor en la Prueba de doble tinción (62 a 72%) que la de Prueba de ADN de HPV de Alto Riesgo (37.8%). Por lo cual es una prueba que detecta mejor las pacientes realmente sanas. (Atkins, 2011)

II. 9 INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA P16 Y KI67

La inmunquímica fue desarrollada desde 1930; Actualmente se ha utilizando anticuerpos contra biomoléculas específicas, se han relacionado a dos proteínas en células que están transformadas denominadas P16 y Ki67. la P16 asociada a inhibidor de ciclinas dependientes de la cinasas y la Ki67 está asociada a la replicación del ADN. (Perez & Perry, 20016)

En algunos casos, el control que regula la multiplicación celular se altera, empiezan a crecer y a dividirse SIN CONTROL, aunque el organismo no necesite de ellas. Cuando las células descendientes de dicha célula a su vez se multiplica sin responder a regulación, el resultado es una clona de células que puede alcanzar un tamaño considerable. Esta masa de célula es llamada Tumor y está formada por una clona no deseada. Algunos tumores tienen efectos devastadores en los animales; ya que dependen de la severidad de estos producen metástasis a diferentes órganos.

En los puntos de control en el ciclo celular, uno de ellos está en la transición de la etapa **G1** a la **S**. Hay una proteína del retinoblastoma (Rb) la cual interviene en esta transición. A su vez existe otra proteína denominada P16 la cual inhibe la quinasa dependiente de la ciclina p16INK4a que desempeña un papel fundamental en el control mediado por la proteína del retinoblastoma.(Brown et al., 2012)

En condiciones normales, la pRB se une al factor de transcripción E2F. Esto produce el efecto de bloquear la transcripción de los genes que estimulan la progresión del ciclo celular y su proliferación, pero también, la codificación del gen para el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, p16INK4a. De esta manera, en condiciones normales, la unión del factor de transcripción E2F por el pRB es uno de los mecanismos de control fundamentales para prevenir la replicación y proliferación continuas de las células.(Bulten et al., 2006)

Cuando el E2F se separa del pRB, el efecto bloqueante en la transcripción del gen p16INK4a se pierde, lo que provoca la producción de la proteína funcional p16INK4a dentro de la célula. A cambio, ahora la proteína p16INK4a("INK4a", que se origina a partir del "inhibidor de la quinasa 4") inhibe la actividad fosforilante de cdk4/6, complejo de ciclina D. Por lo tanto, cambia el balance del pRB fosforilado (inactivo; incapaz de unirse a E2F) de nuevo a un pRB no fosforilado (funcional; capaz de unirse a E2F). Este complejo control de retroalimentación representa uno de los mecanismos clave sobre cómo las células establecen de manera efectiva el equilibrio correcto entre la progresión/proliferación de la célula y la detención del ciclo celular.

Al cabo de cierto tiempo, la infección crónica con Virus de Papiloma Humano VPH oncogénico puede dar lugar a un trastorno del complejo proteínico funcional pRB-E2F. Una de las proteínas expresadas por el virus dentro de la célula es la proteína oncogénica E7. La actividad oncogénica primordial de E7 es inhibir la función de la proteína pRB. De esta manera, el pRB evita unirse al factor de transcripción E2F, lo que produce la transcripción de los genes que promueven la proliferación de la célula. Sólo en las infecciones de VPH en las que han comenzado procesos de transformación oncogénica, los niveles de la proteína E7 (oncoproteína del VPH) se suelen elevar en las células

competentes para proliferarse. Por esta razón, p16INK4a es un elemento de predicción más preciso para el cáncer cervical que la presencia de VPH- oncogénico.(Carozzi et al., 2006)

Para la interpretación de la prueba de doble tinción p16/Ki-67 en citología. La presencia de una o más células epiteliales del cuello uterino (s) que muestra dentro de la misma célula un citoplasma color marrón y una tinción color rojo nuclear indica expresión de p16 y la expresión de Ki-67, respectivamente, que se define un resultado positivo, independientemente de la interpretación de mortalidad anormalidades figura 4 Los casos sin ningún tipo de células inmunorreactivas doble de acuerdo con la revisión del patólogo se llama negativo para p16/Ki-67 doble tinción de citología. (Schmidt et al., 2011)



FIGURA 4. Test dual P16/Ki67 en citología cervical.

Las células transformadas caracterizadas por un citoplasma café marrón debido a la sobreexpresión de la Proteína 16 y núcleo celular color rojo por la expresión Ki67. La doble tinción se interpreta positivo, tanto el núcleo color rojo como citoplasma color marrón: en la figura (A) se observa células con Atipia Escamosa de significancia indeterminada por sus siglas en inglés ASC-US. (B) Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado LEIBG y (C) Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado LEIAG. Fuente Cancer Cytopathology 2011.

II.10 HISTOLOGÍA DE BIOPSIA CERVICAL

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

En un estudio realizado con un panel de 4 patólogos de diferentes partes de Hospitales de Estados Unidos y Canadá evidenció la correlación de los resultados de muestras de histología con diferentes lesiones precursoras del cáncer cervical de NIC 1, NIC 2 y NIC 3 con tinción de hematoxilina eosina. Utilizando el análisis estadístico de concordancia de Kappas (K) no ponderado comparando entre parejas de patólogos diagnósticos dicotomizados como NIC positivo versus NIC negativo (incluyendo normal, insatisfactorio y metaplasia) ó NIC 2/3 positivo versus NIC 2/3 negativo (incluyendo normal, insatisfactorio, metaplasia y NIC 1). La concordancia interobservador para cada panelista fue $K= 0.756$ a 0.865 . (Cai et al., 2007)

La concordancia entre los diagnósticos de citología e histología (Biopsia dirigida por colposcopia del cérvix) es satisfactoria en 82% ; la citología subestima lesiones en el 2.3% y sobreestima la enfermedad cervical en el 16.1%. (Miroshnichenko, Parva, Holtz, Klemens, & Dunton, 2009)

Las lesiones de displasia leve ó conocidas como Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (NIC 1) progresan hasta displasia severa en sólo 1%por año, mientras que de las lesiones moderadas(NIC 2) a la displasia severa (NIC 3)es de 16% en 2 años y de un 25% en5 años. No obstante, la detección temprana y tratamiento del HPV en las lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión hasta cáncer.(Saslow et al., 2012)

En los últimos años, la inmunohistoquímica ha tenido un gran impacto en el campo de la patología cervical, como en otras áreas de diagnóstico de la patología ginecológica. La Inmunohistoquímica siempre se debe utilizar como complemento del examen morfológico y los resultados no deben ser interpretados en forma aislada. En general, especialmente cuando se trata con los tumores malignos. Ningún marcadores totalmente específico sensible para cualquier lesión determinada, es probable que en los próximos años que la inmunohistoquímica, junto con las investigación es moleculares, jugará un papel cada vez más importante en el campo de diagnóstico patología cervical. También se espera que estos métodos sean considerados como factor pronóstico predicción en diversas neoplasias de cuello uterino.(McCluggage, 2007)

La prueba de inmunohistoquímica P 16^{INK4a} en cortes de biopsias tiñe las células afectadas por el VPH de Alto Riesgo, siendo más evidente cuando las lesiones son de Alto Grado ó de cáncer invasivo. Ver figura 5

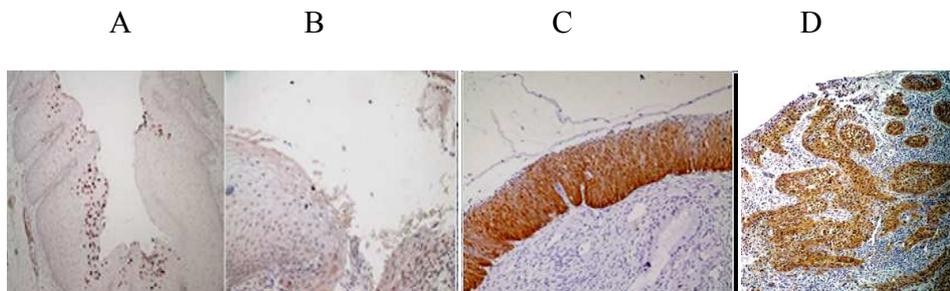


FIGURA 5. Muestras Histológicas del cérvix con la prueba P16INK4a.

Representando los diferentes tipos de lesiones, en la imagen A y B muestran lesión de bajo grado; en el imagen C Lesión de Alto Grado y en D lesión de cáncer invasiva del cérvix. Fuente:

En un estudio se midió el índice de concordancia ponderado para interpretar biopsias del cérvix con tinción por inmunohistoquímica P16, el cual fue de 0.80 con IC 95% 0.66 a 0.89.(Dijkstra et al., 2010)

II. 11 DIAGNOSTICO COLPOSCOPICO

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

La colposcopia permite examinar y evaluar el cérvix, detectando lesiones benignas ó sospechosas de malignidad. El principal objetivo de la colposcopia es detectar lesiones premalignas. El frote cervical advierte la sospecha de lesiones por lo que la prueba de citología al estar anormal debiera estar acompañada del examen colposcópico y posteriormente de una biopsia dirigida. La Colposcopia es interpretativa, subjetiva y falible.(Jeronimo & Schiffman, 2006)

Es importante que el que practique la colposcopia determine el sitio más apropiado para la toma de biopsia ya que de ello depende el diagnóstico histológico, el cual también está sujeto de interpretación.(Hopman H. Ellen., Voorhorst, 1994)

El aspecto fundamental para el diagnóstico certero final es la Correlación de la Citología, la Histología y la Impresión colposcópica. (Jeronimo & Schiffman, 2006)

La Federación Internacional para la Patología Cervical y Colposcopia por sus siglas en inglés (IFCPC) propuso en el año 2002 una terminología fácil, reproducible, con una excelente correlación interobservador para predecir los hallazgos Histológicos del cérvix. Teniendo una sensibilidad de 86% y especificidad del 30.3% en distinguir un cuello sano versus Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)/ Carcinoma.(Hammes et al., 2007)

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

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

II. 12 TRATAMIENTO Ó DIAGNÓSTICO DE LESIONES CERVICALES

Muchos Clínicos han tratado las lesiones escamosas Intraepiteliales de alto grado con conización cervical preservando la anatomía y función del cérvix. En 1965 Anderson

demonstró que la conización terapéutica ofrece protección contra el cáncer cervical como alternativa a histerectomía.(Bennett, Stone, Anderson, & Wilkinson, 1996)

Los índices de curación con mínima morbilidad en lesiones preinvasivos del cérvix fueron reportados al utilizar criocirugía, electrocauterio con asa diatérmica y láser CO₂ .(Ueda et al., 2006),

En 1990 el uso de el asa electroquirúrgica conocida como LEEP por sus siglas en inglés Loop Electrosurgical Excision Procedure ganó popularidad, el procedimiento consta de la remoción de la zona de transformación similar al de conización con bisturí.

La Conización cervical con asa electroquirúrgica conocida por sus siglas en inglés LEEP ha sido aceptado su utilidad en el tratamiento y diagnóstico final de Lesiones intraepiteliales de Alto Grado cervicales. La conización es diagnóstica cuando: hay sospecha de lesión en el canal endocervical, discrepancia ó No correlación entre resultado de citología e Histología, Sospecha de lesión microinvasiva del cérvix(del Pino et al., 2009)

La conización con asa de diatermia conocida en Europa como LLETZ (*large loop excision transformation zone*) y en los Estados Unidos como LEEP, fue creada por Cartier y sus colaboradores en 1984 y descrito su empleo en 1989 por Prendiville.(Young, 2010)

La conización tipo LLetz tiene varias ventajas: menos costo, fácil técnica y buen éxito en la resolución de los casos tratados por lesiones preinvasivas, especialmente en el ectocérvix.(Giacalone et al., 1999)

La conización tipo LLETZ tiene un rango más alto de escisión incompleta de las lesiones cervicales 37% con respecto a la conización con bisturí el cual es 28.9%. (Huang & Hwang, 1999)

La conización realizada por medio de LLETZ ó LEEP parece ser una alternativa aceptable a la conización con bisturí, en mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y colposcopia insatisfactoria. Hay una tendencia a tener recurrencia en los casos con lesiones escamosas intraepiteliales después de realizar LLETZ (16.4%) en comparación con Conización con bisturí (12.4%). Según datos de estudios anteriores , la conización con bisturí se asoció más con trabajo de parto prematuro. La conización tipo LLETZ tuvo menos costo y complicaciones de hemorragia.(El-Nashar, Hopkins, Cliby, & Famuyide, 2011)

La conización tipo LLETZ tiene un riesgo de sangrado del 7%, en comparación con las otras técnicas de conización como las realizadas con bisturí en frío, laser y CO₂ no hay diferencias significativas. Así mismo las otras complicaciones asociadas con la conización cervical como infección, estenosis cervical no hay diferencias entre los tipos de conización mencionados; aunque se reporta que a la inspección histológica del canal endocervical los

bordes quirúrgicos no preservan la estructura debido a la quemadura ocasionada por la electrocirugía.(Lewis, 1994)

II. 13 CORRELACIÓN CITOLÓGICA –COLPOSCOPIA E HISTOLOGÍA

La discrepancia ó no correlación es definido como la diferencia de 2 grados entre citología y resultado de histología como por ejemplo LEIAG por citología y Cervicitis por histología.En el Hospital Universitario de North Staffordshire evaluaron La correlación multidisciplinaria clínico patológico, revisaron los casos en donde hubo discrepancia o no correlación, durante 3 años, detectando 35% de los casos con discrepancia entre la Citología con respecto a Histología y 10% con discrepancia entre Citología y colposcopia. (Moss et al., 2009)

En Columbia Británica ,Estados Unidos, se estudiaron por 4 años a 84, 244 pacientes evaluando la correlación de los resultados de citología del cérvix , Histología e impresión colposcópica. Los resultados fueron: la correlación de impresión colposcópica con respecto a la citología fue del 90%, la correlación de la Citología con respecto a la histología fue 82% , sobreestimando en 16.1% . El 77% de los casos con resultado en citología de, LEIAG fueron confirmados con histología. Concluye el estudio que la sensibilidad de citología y colposcopia fueron altos pero la especificidad de bajo a moderado. La asociación entre citología y colposcopia fue altamente significativa ($P < 0.001$). (Benedet, 2004)

PARTE III

RESULTADOS

Las pacientes que aceptaron participar en el estudio fueron 200, de las cuales 24 fueron sacadas del mismo; debido a que las muestras del cérvix ya sea de citología ó histología no cumplían los estándares de calidad para su interpretación. En su mayoría por escaso material.

En la tabla 3 se presentan los datos generales de las 176 pacientes participantes. El mayor rango de edad fue entre 31 a 40 años con 31.98%, cuya mediana fue 41 años. Según las Gestas 43 pacientes (24%) tienen 3 hijos siguiendo 33 pacientes (18.75%) con 1 sólo hijo y 32 pacientes (18.18%) con más de 6 hijos. A la pregunta del uso de métodos Anticonceptivos utilizados 116 pacientes (65.9%) refieren no haber utilizado alguno, el método más empleado fue Ligadura, pomeyó anillos 36 pacientes (20.4%).

Las pruebas de citología de exfoliado con tinción convencional por la que fue el motivo de consulta a la Unidad de Colposcopia fueron en su mayor número Lesiones de Escamosas de Alto Grado 66 (37.50%) , Bajo Grado 55 (31.26%) por sus siglas LEIAG y LEIBG respectivamente, y así como Carcinoma Invasivo del cérvix epidermoide 24 (13.64%). Ver tabla 4

A cada paciente se le efectuó biopsia cervical bajo visión colposcópica, las cuales fueron procesadas y teñidas con Hematoxilina y Eosina por sus siglas H y E. A la interpretación los resultados fueron de mayor relevancia clínica: LEIAG 62 (35.23%) y Carcinoma Invasivo 30 (17.04%) de estos últimos el tipo Epidermoide fue el más frecuente 20 casos. Ver tabla 4

De las 176 pacientes se les efectuó a 38 Conización con asa del cérvix, ya sea por tratamiento ó por diagnóstico. De los cuales 27 casos (71.1%) se diagnosticó LEIAG, 3 (7.9%) Carcinoma Microinvasivo y 2 (5.3%) Carcinoma Epidermoide Invasivo. El menor número fueron negativos y LEIBG 3 casos cada uno. Ver Tabla 4

Cada paciente fue evaluada por colposcopia a través de un juego de lentes que amplían la imagen del cérvix por medio de un aparato llamado colposcopio. Al observar lesiones en el cérvix se Interpretó las mismas y se informó “Negativa” 21 casos (11.9%) considerándolas lesiones benignas “Poco Significativa” 70 casos (39.8%) considerando las LEIBG, para los casos de mayor relevancia clínica “Significativa” 59 casos (33.5%) considerándolas LEIAG y para “Muy Significativa” 26 casos (14.8%) considerándolas para Lesiones de Carcinoma invasivo. Ver tabla 5

Tabla 3. Datos generales de las pacientes que aceptaron participar en la unidad de colposcopia INCAN.

| Rangos de edad | n (176) | X 41 ±14.2 | % |
|-----------------------|----------------|-------------------|----------|
| menor 20 | | 7 | 3.98 |
| 21 a 30 | | 38 | 21.59 |
| 31 a 40 | | 56 | 31.98 |
| 41 a 50 | | 36 | 20.45 |
| 51 a 60 | | 18 | 10.23 |
| mayor de 61 | | 21 | 11.93 |

| Gestas | X 3 | % |
|---------------|------------|----------|
| 0 | 6 | 3.41 |
| 1 | 33 | 18.75 |
| 2 | 27 | 15.34 |
| 3 | 43 | 24.43 |
| 4 | 23 | 13.07 |
| 5 | 12 | 6.82 |
| >6 | 32 | 18.18 |

| Métodos Anticonceptivos | n | % |
|--------------------------------|----------|----------|
| Ninguno | 116 | 65.9 |
| Ligadura, pomeroy ó anillos | 36 | 20.4 |
| orales | 12 | 6.86 |
| Trimestral | 7 | 4.00 |
| Jadell | 3 | 1.7 |
| DIU | 2 | 1.1 |

DIU Dispositivo Intra Uterino

FUENTE Papeletas de pacientes que aceptaron participar, Unidad de Colposcopia INCAN

Tabla 4. Resultados de estudios convencionales de citología de exfoliado, biopsia y cono cervical en pacientes que aceptaron participar. Unidad de colposcopia INCAN.

| Resultados de Citologías convencionales | n (176) | % |
|---|----------------|----------|
| AGUS | 3 | 1.70 |
| ASCUS | 22 | 12.50 |
| ASCH | 3 | 1.70 |
| LEIBG | 55 | 31.26 |
| LEIAG | 66 | 37.50 |
| Carcinoma Epidermoide Invasivo | 24 | 13.64 |
| Adenocarcinoma invasivo | 3 | 1.70 |
| Resultados de Histología biopsia H y E | n (176) | % |
| Negativo ó normal, cervicitis, metaplasia, Endocervicitis, pólipo | 51 | 28.98 |
| LEIBG (NIC 1, Coilocitosisó Condiloma) | 33 | 18.75 |
| LEIAG (NIC 2 ó 3) | 62 | 35.23 |
| Carcinoma Invasivo (Según tipo) | 30 | 17.04 |
| Carcinoma Microinvasivo sospecha | 6 | 3.41 |
| Adenoescamoso Invasivo | 1 | 0.57 |
| Carcinoma Epidermoide Invasivo | 20 | 11.36 |
| Adenocarcinoma Invasivo | 2 | 1.14 |
| Adenocarcinoma Mucinoso | 1 | 0.57 |
| Resultados de Histología Cono H&E | n (38) | % |
| Normal Lesiones Benignas pólipo cervical. | 3 | 7.9 |
| LEIBG (NIC 1, Coilocitosisó Condiloma) | 3 | 7.9 |
| LEIAG, (NIC 2 ó 3) | 27 | 71.1 |
| Carcinoma Microinvasivo | 3 | 7.9 |
| Carcinoma Epidermoide Invasivo | 2 | 5.3 |

NLB normal lesiones benignas, LEIBG Lesión escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, ASCUS por sus siglas en inglés Atípia Escamosa de Significado Indeterminado, ASCH por sus siglas en inglés Atípia Escamosa de Altamente sospecha, AGUS por sus siglas en inglés Atípia Escamosa Glandular de Significado Indeterminado, LEIAG Escamosa Intraepitelial de Alto Grado,

FUENTE: Papeletas de las pacientes que aceptaron participar, unidad de Colposcopia INCAN

Tabla 5. Impresión colposcópica de las pacientes que aceptaron participar en el estudio, unidad de colposcopia INCAN.

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

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

Se presentan los resultados de las citologías con tinción convencional respecto al resultado de Histologías H y E finales ya sea por biopsia ó cono cervical. Debido a que en algunos casos existió la discrepancia ente citología y biopsia específicamente los casos en que la citología informó LEIAG ó Cáncer Invasivo y en biopsia reportó Cervicitis ó LEIBG se efectuaron conos diagnósticos. Por lo tanto se consideró el diagnóstico final ó concluyente el resultado del cono cervical.

En la Tabla 6 se observa que de las 83 citologías con tinción convencional con lesiones LEIBG,ASCUS, ASCH y AGUS , se diagnosticó por Histología Final LEIAG 17 y Carcinoma Invasivo 30 casos; con respecto a las citologías con LEIAG que fueron 66 se diagnosticó por Histología LEIAG 38 y Carcinoma Invasivo 15 casos. Finalmente de los 27 resultados por citología con Carcinoma Invasivo se diagnosticó por Histología LEIAG 7 y Carcinoma Invasivo 13 casos.

Tabla 6 Resultados de Citología con tinción convencional según diagnóstico final de Histología H y E.

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

X^2 $p < 0.0001$ NLB normal lesiones benignas, LEIBG Lesión escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, ASCUS por sus siglas en inglés Atíпия Escamosa de Significado Indeterminado, ASCH por sus siglas en inglés Atíпия Escamosa de Alto Grado Lesión, AGUS por sus siglas en inglés Atíпия Escamosa Glandular de Significado Indeterminado, LEIAG Escamosa Intraepitelial de Alto Grado,

En la Tabla 7 se observa que de las 90 citologías con tinción dual con Cambios inflamatorios, LEIBG,ASCUS, ASCH y AGUS , se diagnosticó por Histología Final con tinción P16 LEIAG 23 y Carcinoma Invasivo 2 casos; con respecto a las 67citologías con LEIAG se diagnosticó por Histología LEIAG 48 y Carcinoma Invasivo 15 casos. Finalmente de los 27 resultados por citología con Carcinoma Invasivo se diagnosticó por Histología LEIAG 7 y Carcinoma Invasivo 13 casos.

Tabla 7 Resultados de Citología con doble Tinción según diagnóstico final de Histología con Tinción P16

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

Para detectar casos con \geq LEIAG se comparó la Citología con tinción convencional y con doble Tinción obteniéndose el índice de sensibilidad de 79.35% y 76.64% respectivamente, los cuales no son diferentes significativamente. Así mismo se observó valores mayores del índice de Especificidad siendo 76.16 y 94.20 respectivamente, el Valor predictivo positivo fue 78.49 y 95.35 respectivamente. Ver tabla 8

Tabla 8 Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo según interpretación de Prueba de Citología Tinción Convencional y con doble Tinción.

| Tipo de Citología según tinción | Sensibilidad | | Especificidad | | VPP | | VPN | |
|---------------------------------|--------------|-------------|---------------|-------------|--------|-------------|---------|-------------|
| | Valor % | IC 95% | Valor% | IC95% | Valor% | IC95% | Valor % | IC95% |
| Convencional | 79.35 | 70.53-88.16 | 76.16 | 66.49-85.89 | 78.49 | 69.61-87.38 | 77.11 | 67.47-86.75 |
| Doble Tinción | 76.64 | 68.15-85.12 | 94.20 | 87.96-100.0 | 95.35 | 90.32-100.0 | 72.22 | 62.41-82.03 |

VPP Valor Predictivo Positivo, VPN Valor Predictivo Negativo

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

Tabla 9 Índice de correlación interobservador según tipo de muestra interpretada.

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

***p <0.0001 ,**Kappas Globales** para citología con Test Dual 0.66; IC 95% (0.58 0.71). X² 4.08, Valor p de homogeneidad 0.12. Para Biopsia Kappa 0.84, IC 95%(0.80 0.87), X² 4.69 y Valor p de homogeneidad 0.1. Para Conos cervicales 0.84, IC 95% (0.73 0.95) X² 0.05 y Valor homogeneidad p 0.94

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

Tabla 10 Índices de Correlación entre los tipos de citología con respecto a Histología e impresión Colposcópica según tipo de lesiones cervicales.

| Indice de Correlación Tau b Kendall | Citología convencional | | Diagnostico final con H&E/ Impresión colposcópica | Citología doble tinción | | Diagnóstico final de Histología P16/ Impresión Colposcópica |
|-------------------------------------|---------------------------|------------------------|---|-------------------------------------|------------------------|---|
| | Diagnóstico final con H&E | Impresión colposcópica | | diagnóstico final de Histología P16 | Impresión colposcópica | |
| Valor | 0.481 | 0.584 | 0.681 | 0.684 | 0.489 | 0.571 |
| P significancia | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |

III.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. El índice de correlación entre la citología con Test de doble tinción P16 y Ki67 respecto a resultados finales de histología fue de 0.684 El índice de correlación de la impresión colposcópica respecto a resultados de lesiones cervicales por Histología fue 0.571. Ambos índices son considerados como Buenos.
2. Respecto a la sensibilidad, en nuestro estudio, no hubo diferencia significativa entre ambos tipos de citologías; sin embargo la citología con Test de doble tinción P16 y Ki67 fue mayor la especificidad siendo del 94.2 %; según la literatura consultada la citología con doble tinción tiene especificidad del 82% .(Petry et al.,2011).
3. La correlación de los resultados del Test con doble Tinción P16 y Ki67 en citología cervical con respecto a Impresión colposcópica es de 0.489; considerado de Regular. Se advierte que la correlación de las citologías convencionales fue mayor 0.584; no habiendo ventaja con el Test de doble Tinción P16 y Ki67.
4. Comparando la correlación de los resultados del Test con doble tinción P16 y Ki67 en la citología cervical y los resultados de la citología convencional con respecto a los resultados de Histología se observa que fue superior el índice de correlación con el Test con doble Tinción P16 y Ki67 siendo 0.684 el cual es de Bueno; el de la citología convencional fue de 0.481 considerado de Regular.
5. Derivado de lo anterior se calcula que la tasa de falsos Positivos de la citología con doble tinción y Tinción Convencional fue 4.6 % y 21.5% respectivamente. Según la literatura consultada la tasa de falsos positivos para citología convencional es de 30%.(Murphy et al.,2003)

PARTE IV

IV.1 CONCLUSIONES

1. Existe buena Correlación entre resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67 y los resultados de Histología, según los diferentes tipos de lesiones cervicales siendo 0.684. El índice de correlación de la colposcopia fue de 0.571. Existe buena correlación en ambos índices
2. El Test de doble tinción con P16 y Ki67 en citología cervical tiene mayor especificidad respecto a la citología convencional siendo 94.2 %.No hay diferencia significativa en la Sensibilidad respecto a la citología convencional.
3. El índice de Correlación es Regular entre los resultados de Citología con doble tinción P16 y Ki67 y la impresión Colposcópica, la cual es de 0.489.
4. La correlación del Test con doble tinción P16 y Ki67 en citología cervical con respecto a los resultados de Histología fue mayor, que en la citología convencional, siendo 0.684.
5. La tasa de Falsos Positivos es menor con la doble Tinción en citología disminuyendo así la discrepancia entre citología e histología.

IV.2 RECOMENDACIONES

1. Debido a la Buena Correlación y Alta Especificidad de citología con Test de doble tinción P16 y Ki67 respecto a los resultados finales de Histología. Se recomienda aplicar dicho Test en aquellos casos de pacientes que existan falsos positivos es decir las citología que sobre diagnostica las lesiones del cérvix ; dicha prueba se podría aplicar en los casos en los que haya discrepancia entre la citología cervical y la biopsia previo a realizar una Conización diagnóstica del cérvix. Comparar Tablas 6 y 7.
2. La prueba de doble tinción podría ser incluido en el protocolo de manejo de la Unidad de Colposcopia del INCAN, posterior a realizar estudios de mayor número de casos en que haya discrepancia ó no correlación entre pruebas de Citología de exfoliado cervical y Biopsia cervical; así tener mayor significancia y sustento su aplicabilidad.
3. Se prevee que la utilidad de la Tinción dual disminuiría el número de casos de innecesario de conizaciones cervicales; ofreciendo mejorar la eficiencia y certeza en los diagnósticos de lesiones del cérvix.
4. La prueba de doble Tinción se puede aplicar en citologías con exfoliados cervicales, ya que no hubo diferencia en especificidad con estudios donde se aplicaron en Citologías de capa fina.

IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agoff, S. N., Lin, P., Morihara, J., Mao, C., Kiviat, N. B., Koutsky, L. A., & Ph, D. (2003). p16 INK4a Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia : A Comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Pathology*, 0–8. doi:10.1097/01.MP.0000077518.78046.0C
2. Allard, J. E., Rodriguez, M., Rocca, M., & Parker, M. F. (2005). Biopsy Site Selection During Colposcopy and Distribution of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 9(1), 36–39.
3. Alonso, I., Torné, A., Puig-Tintoré, L. M., Esteve, R., Quinto, L., Campo, E., ... Ordi, J. (2006). Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecologic Oncology*, 103(2), 631–6. doi:10.1016/j.ygyno.2006.04.016
4. Andersson, S., Safari, H., Mints, M., Lewensohn-Fuchs, I., Gyllensten, U., & Johansson, B. (2005). Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British Journal of Cancer*, 92(12), 2195–200. doi:10.1038/sj.bjc.6602648
5. Arbyn, M., Bergeron, C., Klinkhamer, P. J. J. M., Martin-Hirsch, P., Siebers, A. G., & Bulten, J. (2008). Liquid compared with Liquid Compared With Conventional Cervical Cytology A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 111(1), 167–177. doi:10.1097/01.AOG.0000296488.85807.b3
6. Arrossi, S., Sankaranarayanan, R., & Parkin, D. M. (2003). Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Pública de México*, 45 Suppl 3(1), S306–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14746023>
7. Atkins, K. (2011). p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: p16/Ki-67 in cervical papanicolaou Tests. *Cancer Cytopathology*, 119(3), 145–7. doi:10.1002/cncy.20139
8. Benedet, J. (2004). An analysis of 84,244 patients from the British Columbia cytology–colposcopy program. *Gynecologic Oncology*, 92(1), 127–134. doi:10.1016/j.ygyno.2003.10.001
9. Bennett, B. B., Stone, I. K., Anderson, C. D., & Wilkinson, E. J. (1996). Gynecology Deep loop excision for pre hysterectomy endocervical evaluation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176, 82–86.
10. Bigras, G., & Marval, F. De. (2005). The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load : results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13 842 women. *British Journal of Cancer*, 93(5), 575–581. doi:10.1038/sj.bjc.6602728
11. Brown, C. a, Bogers, J., Sahebali, S., Depuydt, C. E., De Prins, F., & Malinowski, D. P. (2012). Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *Journal of Oncology*, 2012, 289315. doi:10.1155/2012/289315
12. Bulten, J., van der Avoort, I. a M., Melchers, W. J. G., Massuger, L. F. a G., Grefte, J. M. M., Hanselaar, A. G. J. M., & de Wilde, P. C. M. (2006). p14ARF and

- p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology*, 101(3), 487–94.
doi:10.1016/j.ygyno.2005.11.036
13. Cai, B., Ronnett, B. M., Stoler, M., Ferenczy, A., Kurman, R. J., Sadow, D., ... Liaw, K.-L. (2007). Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(12), 1854–60. doi:10.1097/PAS.0b013e318058a544
 14. Carozzi, F., Cecchini, S., Confortini, M., Becattini, V., Cariaggi, M. P., Pontenani, G., ... Ciatto, S. (2006). Role of P16(INK4a) expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer*, 108(2), 119–23. doi:10.1002/cncr.21713
 15. Carrillo, A., C, M., Mohar, A., Meneses, A., Carrillo, A., Mohar, A., & Meneses, A. (2004). Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública de México*, 46(1).
 16. Clary, K. M., Silverman, J. F., Liu, Y., Sturgis, C. D., Grzybicki, D. M., Mahood, L. K., & Raab, S. S. (2002). Cytohistologic discrepancies: a means to improve pathology practice and patient outcomes. *American Journal of Clinical Pathology*, 117(4), 567–73. doi:10.1309/0N45-CC0E-R802-D9NG
 17. Comar, M., Iannacone, M. R., Casalicchio, G., McKay-Chopin, S., Tommasino, M., & Gheit, T. (2012). Comparison of hybrid capture II, linear array, and a bead-based multiplex genotyping assay for detection of human papillomavirus in women with negative pap test results and atypical squamous cells of undetermined significance. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4041–4046. doi:10.1128/JCM.02105-12
 18. Coste, J., Cochand-priollet, B., Cremoux, P. De, Galès, C. Le, Cartier, I., Molinié, V., ... Society, F. (2003). testing for cervical cancer screening, 326(April), 1–5.
 19. De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27.
doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
 20. Del Pino, M., Garcia, S., Fusté, V., Alonso, I., Fusté, P., Torné, A., & Ordi, J. (2009). Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(5), 488.e1–7. doi:10.1016/j.ajog.2009.05.046
 21. Depuydt, C. E., Benoy, I. H., Beert, J. F. a, Criel, a. M., Bogers, J. J., & Arbyn, M. (2012). Clinical validation of a type-specific real-time quantitative human papillomavirus PCR against the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4073–4077.
doi:10.1128/JCM.01231-12
 22. Dijkstra, M. G., Heideman, D. a M., de Roy, S. C., Rozendaal, L., Berkhof, J., van Krimpen, K., ... van Kemenade, F. J. (2010). p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *Journal of Clinical Pathology*, 63(11), 972–7. doi:10.1136/jcp.2010.078634
 23. DiMaio, D. (2007). Papillomavirus E5 Proteins. *The Papillomaviruses*, 3(8), 82–96. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/p8148035q1552730.pdf>
 24. Donà, M. G., Vocaturo, A., Giuliani, M., Ronchetti, L., Rollo, F., Pescarmona, E., ... Benevolo, M. (2012). p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology:

- Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecologic Oncology*. doi:10.1016/j.ygyno.2012.05.004
25. Ekalaksananan, T., Pientong, C., Sriamporn, S., Kongyingyoes, B., Pengsa, P., Kleebkaow, P., ... Parkin, D. M. (2006). Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecologic Oncology*, *103*(1), 62–6. doi:10.1016/j.ygyno.2006.01.033
 26. El-Nashar, S., Hopkins, M., Cliby, W., & Famuyide, a. (2011). Can LEEP replace cold knife conization for the management of cervical intraepithelial neoplasia in women with unsatisfactory colposcopic examination? A systematic review and a meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, *120*(2011), S105–S105. doi:10.1016/j.ygyno.2010.12.250
 27. Farley, J., McBroom, J. W., & Zahn, C. M. (2005). Current techniques for the evaluation of abnormal cervical cytology. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, *48*(1), 133–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725866>
 28. Force, M. V. P. S. T., & Practice, P. (2013). Clinical Guideline. *Annals of Internal Medicine*, *156*(122), 880–892. doi:10.7326/M14-1333
 29. Giacalone, P. L., Laffargue, F., Aligier, N., Roger, P., Combecal, J., & Daures, J. P. (1999). Randomized study comparing two techniques of conization: cold knife versus loop excision. *Gynecologic Oncology*, *75*(3), 356–60. doi:10.1006/gyo.1999.5626
 30. Hammes, L. S., Naud, P., Passos, E. P., Matos, J., Brouwers, K., Rivoire, W., & Syrja, K. J. (2007). Value of the International Federation for Cervical Pathology Cervical Disease. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, *11*(3), 158–165.
 31. Hanley, J., Ph, D., Ferenczy, A., Ratnam, S., & Coutlée, F. (2007). Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer., 1579–1588.
 32. Holowaty, P., Anthony, B., Rohan, T., & To, T. (1999). Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *Journal of the National Cancer Institute*, *91*(3), 252–258.
 33. Hopman H. Ellen., Voorhorst, F. (1994). Colposcopia interp de imagenes observer Agreement.pdf.
 34. Huang, L. W., & Hwang, J. L. (1999). A comparison between loop electrosurgical excision procedure and cold knife conization for treatment of cervical dysplasia: residual disease in a subsequent hysterectomy specimen. *Gynecologic Oncology*, *73*(1), 12–5. doi:10.1006/gyo.1998.5300
 35. Jacobs, M. V, Snijders, P. J., Voorhorst, F. J., Dillner, J., Forslund, O., Johansson, B., ... Walboomers, J. M. (1999). Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *Journal of Clinical Pathology*, *52*(7), 498–503. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=501489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 36. Jemal Ahmedin, Bray Freddie, Center Melissa, Ferlay, Ward Elizabeth, F. D. (2011). Global cancer statistics. ... : *A Cancer Journal for Clinicians*, *61*(2), 69–90. doi:10.3322/caac.20107.Available

37. Jeronimo, J., & Schiffman, M. (2006). Colposcopy at a crossroads. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(2), 349–53.
doi:10.1016/j.ajog.2006.01.091
38. Jones, D. L., Alani, R. M., & Mu, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21 Cip1 -mediated inhibition of cdk2. *Genes & Development*, 2, 2101–2111.
39. Larios. (2006). Correlación citológica-colposcópica e histológica de lesiones de bajo y alto grado en cérvix. *Rev Hosp Gral Dr. M*, 7(2), 54–58. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/h-gea/gg-2006/gg062b.pdf>
40. Lee, K. R., Ashfaq, R., Birdsong, G. G., Corkill, M. E., McIntosh, K. M., & Inhorn, S. L. (1997). Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin-layer system for cervical cancer screening. *Obstetrics and Gynecology*, 90(97), 278–284. doi:10.1097/00128360-199801000-00019
41. Lewis, P. L. (1994). Electrosurgical Loop Conization in the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics & Gynecology*, 10, 229–234.
42. Mattosinho de Castro Ferraz, M. D. G., Nicolau, S. M., Stávale, J. N., Focchi, J., Castelo, A., Dôres, G. B., ... Rodrigues de Lima, G. (2004). Cervical biopsy-based comparison of a new liquid-based thin-layer preparation with conventional Pap smears. *Diagnostic Cytopathology*, 30(4), 220–6. doi:10.1002/dc.10409
43. McCluggage, W. G. (2007). Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology*, 39(1), 97–111. doi:10.1080/00313020601123961
44. Melnikow, J., Nuovo, J., Willan, a R., Chan, B. K., & Howell, L. P. (1998). Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 92(4 Pt 2), 727–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9764690>
45. Miroshnichenko, G. G., Parva, M., Holtz, D. O., Klemens, J. a, & Dunton, C. J. (2009). Interpretability of excisional biopsies of the cervix: cone biopsy and loop excision. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 13(1), 10–2.
doi:10.1097/LGT.0b013e31817ff940
46. Moss, E. L., Byrom, J., Owen, G., Pearmain, P., Douce, G., Todd, R., & Redman, C. W. E. (2009). Multidisciplinary Colposcopy Clinicopathology Correlation Meetings: An Activity Review. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 13(3), 169–173.
47. Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V, ... Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–27. doi:10.1056/NEJMoa021641
48. Murphy, N., Ring, M., Killalea, a G., Uhlmann, V., O'Donovan, M., Mulcahy, F., ... O'Leary, J. J. (2003). p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *Journal of Clinical Pathology*, 56(1), 56–63. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1769860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Nikolaos P. Polyzos MD, Antonis Valachis MD, Davide Mauri MD, J. P. A. I. M. (2011). Papanicolaou test. *Canadian Medical Association*, 183(6), 337–343.
doi:10.1503/cmaj.110384.Abstract

50. Oda, H., Kumar, S., & Howley, P. M. (1999). Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9557–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123627>
51. Perez, C. a., & Perry, W. (20016). Immunochemistry and immunology of the Cervix : In S. A. Jordan, Joseph a (Ed.), *The Cervix: Second Edition* (2nd ed., pp. 49–61). Blackwell publishing.
52. Petry, K. U., Schmidt, D., Scherbring, S., Luyten, A., Reinecke-Lüthge, A., Bergeron, C., ... Ridder, R. (2011). Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 505–9. doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.033
53. Pyne, M. T., Law, C., Hillyard, D. R., & Schlaberg, R. (2014). Testing and Genotyping of High-Risk Human Papillomavirus by the cobas HPV Test and the Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test Using Cervical and Vaginal Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1720–1723. doi:10.1128/JCM.03308-13
54. Rijkaart, D. C., Coupe, V. M. H., van Kemenade, F. J., Heideman, D. a M., Hesselink, a T., Verweij, W., ... Meijer, C. J. L. M. (2010). Comparison of Hybrid capture 2 testing at different thresholds with cytology as primary cervical screening test. *British Journal of Cancer*, 103(7), 939–46. doi:10.1038/sj.bjc.6605869
55. Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., ... Myers, E. R. (2012). American cancer society, american society for colposcopy and cervical pathology, and american society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 137(4), 516–42. doi:10.1309/AJCPTGD94EVRSJCG
56. Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathology*, 119(3), 158–66. doi:10.1002/cncy.20140
57. Schwarz Elizabeth, K. U. (1985). *Nature*. *Nature*, 314(7), 111–114.
58. Singh, M., Mockler, D., Akalin, A., Burke, S., Shroyer, a L., & Shroyer, K. R. (2011). Immunocytochemical colocalization of p16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma: Pilot Studies. *Cancer Cytopathology*, (November 2010), 1–9. doi:10.1002/cncy.20188
59. Song, S., Lee, J., Lee, N., Saw, H., Kang, J., & Lee, K. (2008). Interferon- γ (IFN- γ): A possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecologic Oncology*, 108, 543–548. doi:10.1016/j.ygyno.2007.11.006
60. Stanley, M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*, 117(2 Suppl), S5–10. doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.024
61. Stoler, M. H., & Schiffman, M. (2001a). Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 285(11), 1500–1505. doi:10.1001/jama.285.11.1500
62. Stoler, M. H., & Schiffman, M. (2001b). Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 285(11), 1500–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255427>

63. Szarewski, A., Ambroisine, L., Cadman, L., Austin, J., Ho, L., Terry, G., ... Cuzick, J. (2008). Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(11), 3033–42. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0508
64. Szarewski, A., Mesher, D., Cadman, L., Austin, J., Ashdown-Barr, L., Ho, L., ... Cuzick, J. (2012). Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: The predictors 2 study. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 1867–1873. doi:10.1128/JCM.00181-12
65. Tindle, R. W. (2002). cervical cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(January), 1–7.
66. Trial, a R. C. (2008). Cytologic Detection of Cervical Abnormalities Using Liquid-Based. *Obstetrics & Gynecology*, 112(6), 1327–1334.
67. Ueda, M., Ueki, K., Kanemura, M., Izuma, S., Yamaguchi, H., Nishiyama, K., ... Ueki, M. (2006). Diagnostic and therapeutic laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology*, 101(1), 143–6. doi:10.1016/j.ygyno.2005.10.001
68. Young, N. R. (2010). The effect of loop electrosurgical excision procedure on the subsequent risk of preterm delivery Nicole Rae Young The University of Toledo 2010.
69. Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 342–50. doi:10.1038/nrc798

IV.4 ANEXOS

Índice de anexos

| | | |
|----------|--|----|
| ANEXO 1 | Boleta de información a la paciente..... | 46 |
| ANEXO 2 | Consentimiento informado..... | 48 |
| ANEXO 3 | Cartas de colaboración..... | 49 |
| ANEXO 4 | Instrucciones de la toma de muestra del Cérvix para citología. | 53 |
| ANEXO 5 | Ficha de recolección de datos de colposcopia y estudios..... | 54 |
| ANEXO 6 | Instrucciones del kit cintec plus..... | 55 |
| ANEXO 7 | Informe por paciente del estudio de citología exfoliativa. | 63 |
| ANEXO 8 | Informe de Histología..... | 64 |
| ANEXO 9 | Base de datos de pacientes en Excel | 65 |
| ANEXO 10 | Atlas de tinciones con inmunohistoquímica de exfoliados y biopsias cervicales..... | 66 |

ANEXO 1 Boleta de información a la paciente

BOLETA

Objetivo de la Investigación

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

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

El estudio es coordinado por el Dr. Alberto García González. Profesor e investigador de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Propósito

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

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

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

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

Procedimiento

- 1) Se extraerá una sola muestra de exfoliado cervical, la cual se realizará con material descartable y desinfectado (estéril). Esta muestra se obtiene al iniciar la colposcopia, estudio por el que usted consultó a esta clínica. La muestra es similar a la de un papanicolaou donde más adelante se observaran células coloreadas con reactivos

- especiales; por lo tanto las molestias son similares a la toma de un papanicolaou, siendo el dolor temporal el más frecuente.
- 2) Con éstas muestras se realizarán las pruebas de coloración , las cuales se llevarán a cabo en el laboratorio de Biomédica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de Patología de Universidad Clinic de Barcelona España, lo que avala la calidad de las mismas.
 - 3) Esta muestra será enviada a los laboratorios mencionados y en 6 meses se tendrá su resultado .

Riesgos e incomodidades

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

Quienes pueden participar

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

Beneficios potenciales

Los beneficios por participar en este estudio pueden ser:

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

Alternativas

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

Costos financieros

No hay gastos para usted por participar en este estudio.

Dudas pueden realizarla con el investigador ALBERTO GARCÍA GONZÁLEZ

Tel. 57152257

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

ANEXO 2 Consentimiento informado

Nombre de la paciente _____

Fecha _____ No de registro Médico _____

Institución a que pertenece _____

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

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

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

Firma o huella de la paciente

Testigo/ enfermera(o) ò médico

ANEXO 3 Cartas de colaboración

de: la facultad de medicina de Barcelona hospital clinic- dr. Jaume ordi. Facultad de ciencias médicas usac (laboratorio de investigaciones biomédicas) y unidades de colposcopia y patología del incan.

| | | |
|---|--|---|
|  UNIVERSITAT DE BARCELONA | Facultat de Medicina Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia Casanova, 143 08036 BARCELONA |  Dr. Jaume Ordi Tel. +34 93 227 5450 Fax. +34 93 227 5717 jordi@clinic.ub.es |
|---|--|---|

Dr. Alberto García González
Universidad San Carlos de Guatemala

Querido Dr . García,

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



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



LIGA NACIONAL CONTRA EL CÁNCER
INSTITUTO DE CANCEROLOGIA Y HOSPITAL DR. BERNARDO DEL VALLE S.
6a. Avenida 6-58, Zona 11, Guatemala, C.A.

PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 www.ligacancergruata.org



Guatemala, 5 de Julio 2012.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hacemos constar nuestra aceptación y colaboración para el trabajo de investigación del **DR. ALBERTO GARCIA GONZALEZ**, Titulado: *"CORRELACION CLINICA DEL TEST DE DOBLE TINCION P16 Y K167 EN CITOLOGIA CERVICAL CON RESPECTO A COLPOSCOPIA, E HISTOLOGIA, SEGUN EL TIPO DE LESION CERVICAL"*.

Dicha investigación será de gran valor, que beneficiara directamente a las pacientes, que asisten a la Unidad de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología. Para lo cual daremos el apoyo correspondiente en la ejecución del mismo.

La Supervisión directa de la ejecución del trabajo estará bajo mi cargo, velando por que se realicen los objetivos del proyecto y respetando los aspectos bioeticos de las pacientes.

Sin otro particular, se suscribe atentamente

DR. CARLOS ENRIQUE LOPEZ SANCHEZ
JEFE DE LA UNIDAD DE COLPOSCOPIA Y PATOLOGIA CERVICAL
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA - INCAN

EL CÁNCER SE PUEDE PREVENIR, NO LE TEMA... ¡COMBATALO!

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
GUATEMALA, CENTRO AMÉRICA

Guatemala, 8 de agosto del 2012.

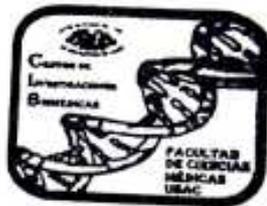
A quién Corresponda

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

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

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


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




Dr. Orlando Rodas Pernillo
Médico Patólogo
Docente de posgrado patología



LIGA NACIONAL CONTRA EL CANCER
INSTITUTO DE CANCEROLOGIA,
Y HOSPITAL DR. BERNARDO DEL VALLE S.
ca. Avenida 6-58, Zona 11, Guatemala, C. A.



PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 www.ligacancerguate.org
Guatemala 22 de agosto del 2012

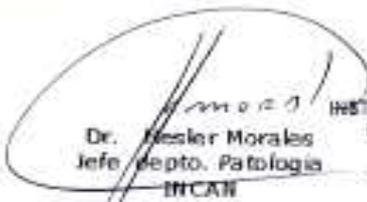
Dr. Alberto García González
Ginecología y Obstetricia
Presente:

Estimado Dr. García:

Por medio de la presente le comunico que será de gran placer apoyarle en la elaboración del proyecto del Test Dual P-16 Y KI 67, en Frotis Citológicos, mediante el procesamiento de las muestras y su interpretación en el laboratorio.

Esto nos servirá para proyectar en un futuro el uso de esta técnica en nuestro laboratorio.

Sin otro particular, atentamente.


Dr. Heiler Morales
Jefe Depto. Patología
INCCAN

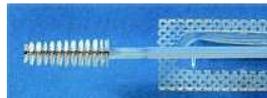
INSTITUTO DE CANCEROLOGIA
Dr. Heiler Morales
Médico Patólogo
Colegiado No. 2782



EL CANCER SE PUEDE PREVENIR, NO LE TEMA...¡COMBATALO!

ANEXO 4 Instrucciones de la toma de muestra del Cérvix para citología.

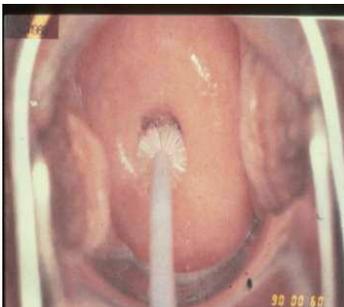
- Equipo para la toma: *Espéculo de plástico descartable
- * Cepillo endocervical descartable
 - * Frasco con solución de PBS
 - * Guantes descartables
 - * Solución salina normal al 0.9 %



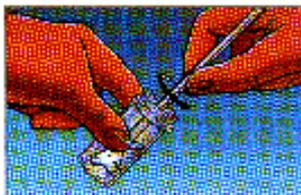
Condiciones de la Paciente: Sin menstruación, no embarazada y estar 72 horas sin relaciones sexuales, ni haber tenido tratamientos Vaginales (gel, cremas ni óvulos)

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

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



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



La muestra se coloca en el frasco en solución de PBS, cortar el mango de la escobilla, justo por debajo del tapón ó cierre del frasco. Etiquetar el frasco con el Nombre, fecha y registro médico. El recipiente puede quedar a temperatura ambiente.

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

ANEXO 5 Ficha de recolección de datos de colposcopia y estudios

Registro de Colposcopia _____

Fecha: _____

Nombre de la Paciente: _____ Edad: _____

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

Anticonceptivo: _____

Nombre del examinador: _____

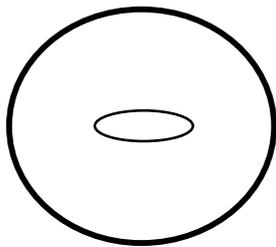
Indicación de la Colposcopia: (Resultado de citología) _____

Estudios Previos

Resultado de Citología Exfoliativa: _____ y/ó

Biopsia: _____

Hallazgos Colposcópicos:



Leucoplaquia Epitelio Acético Positivo Ectopía

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

Unión escamo columnar Visible No visible

Otros _____

Observaciones _____

No de Biopsias en cérvix: _____ Legrado Endocervical

Impresión Colposcópica : _____

Resultado Histología / Hematoxilina Eosina No Registro de patología: _____

ANEXO 6 Instrucciones del kit cintec plus

I. Nombre del producto

CINtec® PLUS Kit

II. Uso previsto

Para uso en diagnóstico in vitro.

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

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

III. Resumen y explicación del dispositivo

Base científica

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

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

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

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

IV. Reactivos

Material suministrado

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

1 **Peroxidase-Blocking Reagent**

Reactivo de bloqueo de la peroxidasa

11,5 mL, listo para su uso

Peróxido de hidrógeno al 3% que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN₃).

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

2 **Primary Antibodies Solution**

Solución de anticuerpos primarios

11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16^{INK4a}, clon E6H4 y anticuerpo monoclonal de conejo antihumano Ki-67, clon 274-11 AC3, suministrado en 50 mM de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L azida de sodio (NaN₃) y proteína estabilizante.

3 **Visualization Reagent HRP**

Reactivo de visualización HRP

11,5 mL, listo para su uso

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

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

4 **Visualization Reagent AP**

Reactivo de visualización AP

11,5 mL, listo para su uso

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

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

5 **DAB Buffered Substrate**

Sustrato tamponado DAB

16,0 mL

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

6 **DAB Chromogen**

Cromógeno DAB

0,85 mL

Solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina.

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

R40 Posibles efectos cancerígenos.

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

R68 Posibilidad de efectos irreversibles.

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

S36/37 Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

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

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

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

7 **Naphthol Phosphate Substrate**

Sustrato naftol fosfato

25,0 mL,

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

8 **Fast Red Chromogen**

Cromógeno Fast Red

1,33 mL, solución de cromógeno Fast Red.

9 **Epitope Retrieval Solution 10x**

Solución de recuperación del epítipo 10x

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

10

CINtec® PLUS Mount

Montaje CINtec® PLUS

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

Preparación de las muestras citológicas

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

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

Notas:

1. Preparación de las muestras ThinPrep®:

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

2. Preparación de las muestras BD SurePath™:

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

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

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

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

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

A continuación se adjunta el resumen de la programación:

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

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

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

VIII. Interpretación de los resultados

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

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

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

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

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

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

ANEXO 7 Informe por paciente del estudio de citología exfoliativa.

| INTERPRETACIÓN CITOLOGIA TEST DUAL | | | |
|------------------------------------|------|--------|----------------|
| código | EDAD | Gestas | Anticoncepción |
| | | | |

Informe de estudio Citología exfoliativa

Código de la muestra: _____

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

TINCIÓN POSITIVA__

Descripción de la calidad de la muestra

TINCIÓN NEGATIVA__

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

Microorganismo observados

- Cándida
- Tricomonas
- Gardnerella
- Flora Bacteriana Mixta

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

Observaciones adicionales: _____

Patólogo _____

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

ANEXO 8 Informe de Histología

| código | EDAD | Gestas | Anticoncepción | Resultado Citología | Impresión Colposcópica |
|--------|------|--------|----------------|---------------------|---------------------------|
| | | | | | |

1 BIOPSIA

| Informe de Histología | |
|---|------------------------|
| Tipo de tinción | Hematoxilina Eosina |
| Tipo de muestra | Inmunohistoquímica P16 |
| <input checked="" type="radio"/> Biopsia | |
| <input type="radio"/> Biopsia y Legrado endocervical | |
| <input type="radio"/> Cono cervical | |
| Descripción: | _____ |
| | _____ |
| | _____ |
| Diagnóstico | |
| <input type="radio"/> Normal/negativo / cervicitis / Metaplasia | |
| <input type="radio"/> LEIBG(NIC I/Coilocitosis) | |
| <input type="radio"/> LEIAG (NIC II-III/ CA Insitu cervical) | |
| <input type="radio"/> Cáncer epidermoide microinvasivo | |
| <input type="radio"/> Cáncer epidermoide Invasivo | |
| <input type="radio"/> Adenocarcinoma | |
| <input type="radio"/> Carcinoma Mixto | |
| <input type="radio"/> Carcinoma Endócrino | |
| Médico Patólogo | _____ |

ANEXO 9 Base de datos de pacientes en Excel .

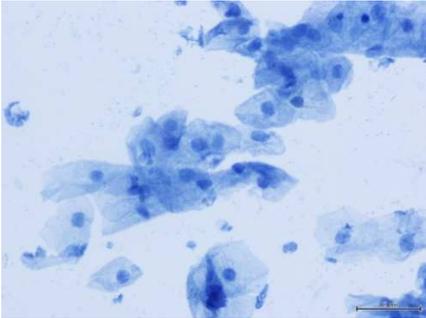
| 1 | Columna1 | Columna2 | Columna3 | Columna4 | Columna5 | Columna6 | Columna7 | Columna8 | Columna9 | Columna10 |
|----|----------------|----------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|----------------------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

ANEXO 10 Atlas de tinciones con inmunohistoquímica de exfoliados y biopsias cervicales.

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

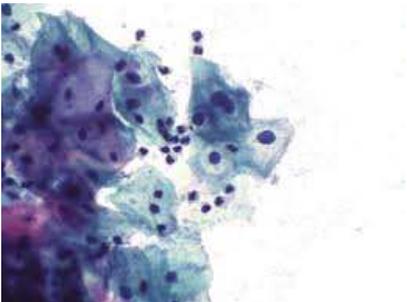
CITOLOGÍA

CAMBIOS BENIGNOS O INFLAMATORIOS



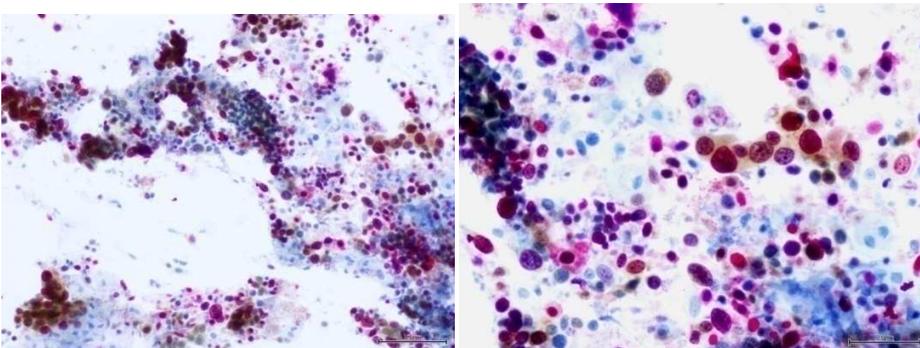
Relación núcleo citoplasma normal, presencia ó no de bacterias ó flagelados

LEIBG

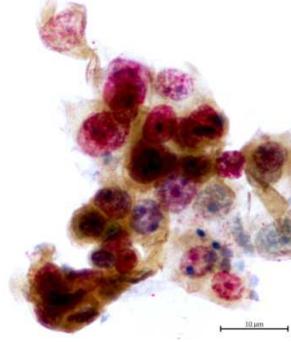
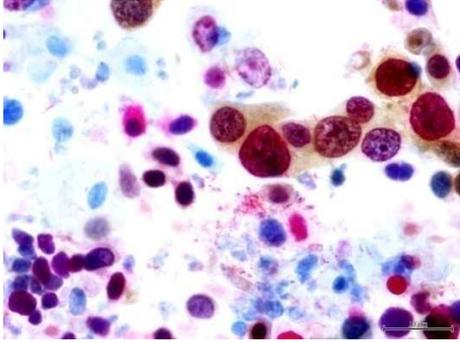


Presencia de células con núcleo rodeado de halo blanco (Coilocitosis)

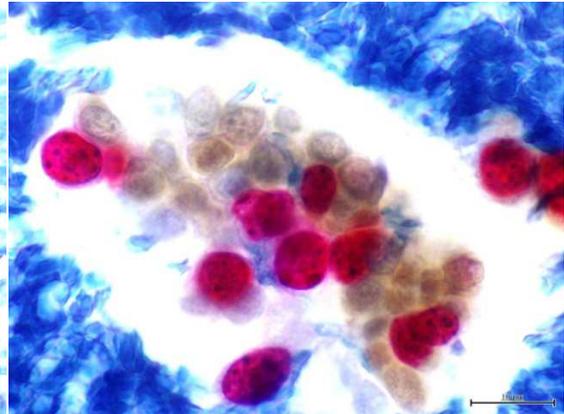
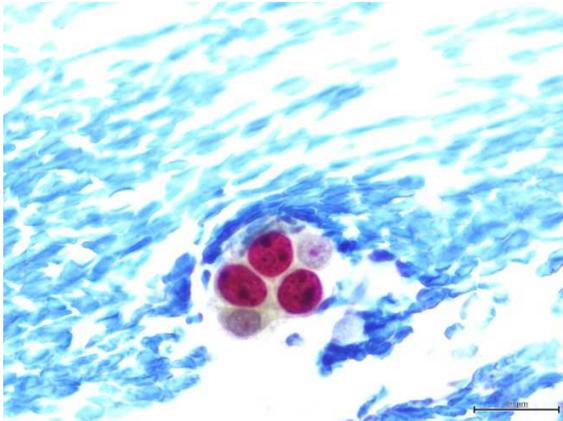
LEIAG



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



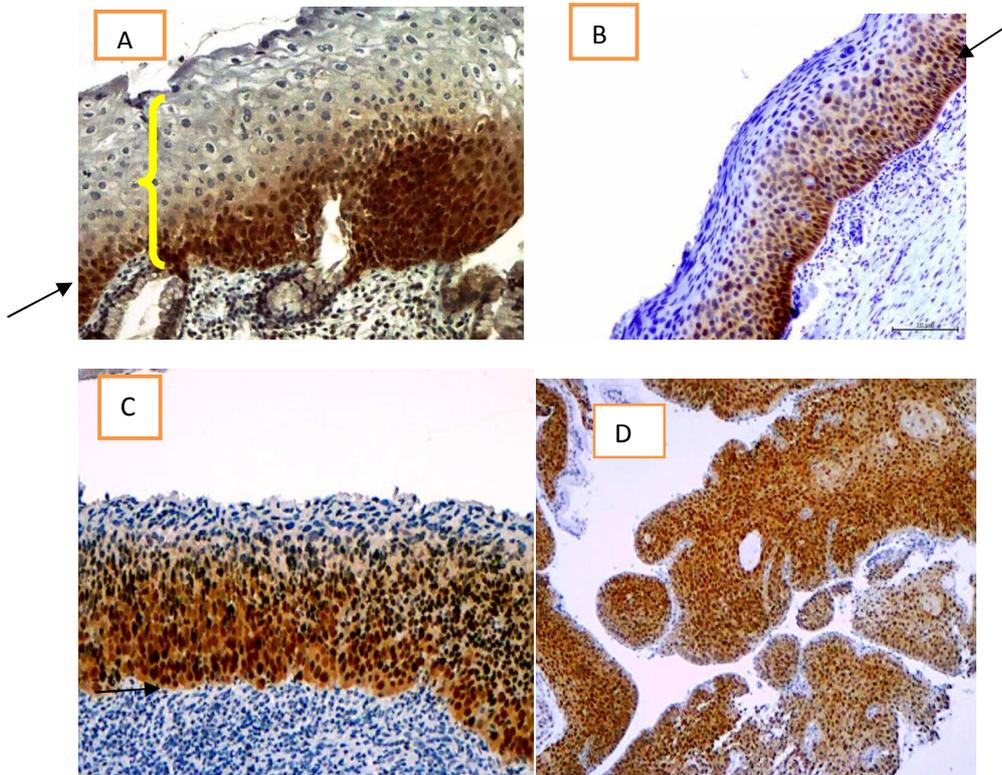
Observe la pérdida relación núcleo citoplasma, los núcleos se ven más grandes y hay nucléolos



Observe los núcleos rojos con nucléolos más oscuros dentro del mismo

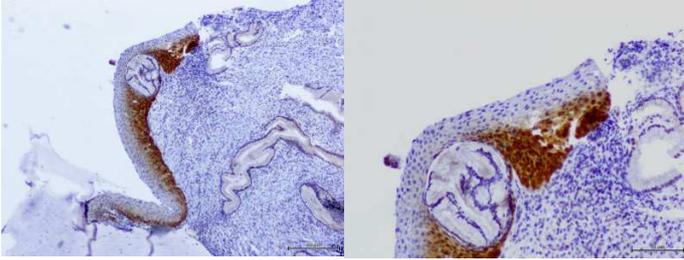
HISTOLOGÍA

Cortes de biopsias del cérvix con Inmunohistoquímica P16



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

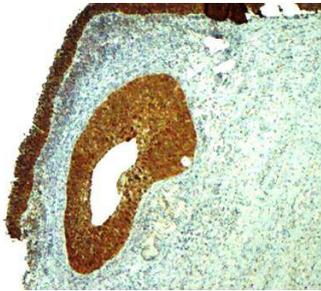
LEIAG



Aumento 10X

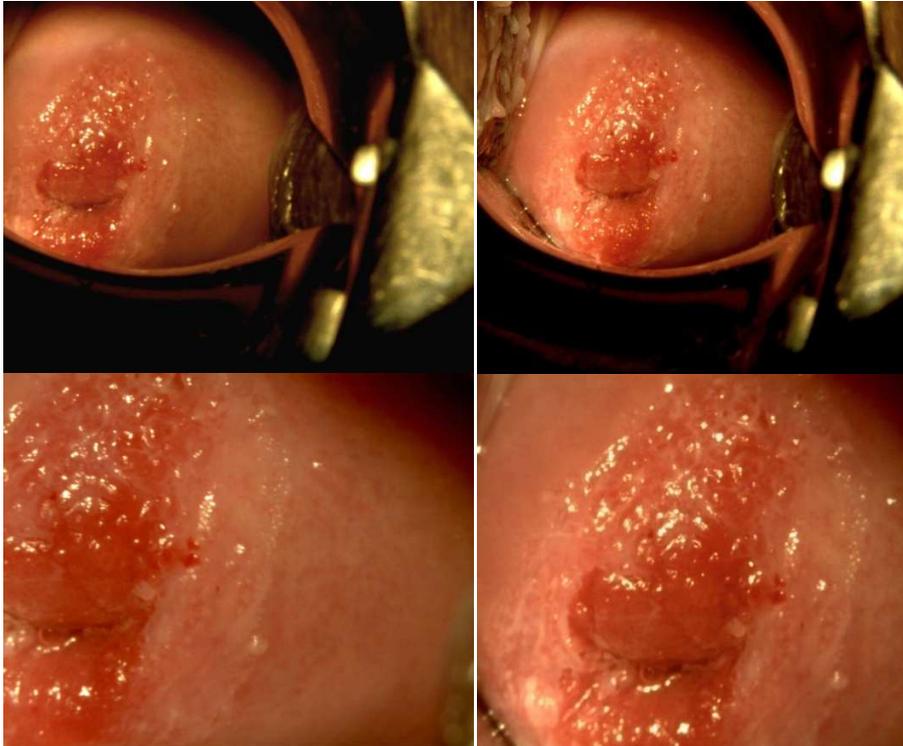
Aumento 20X

LEIAG CON EXTENSIÓN GLANDULAR



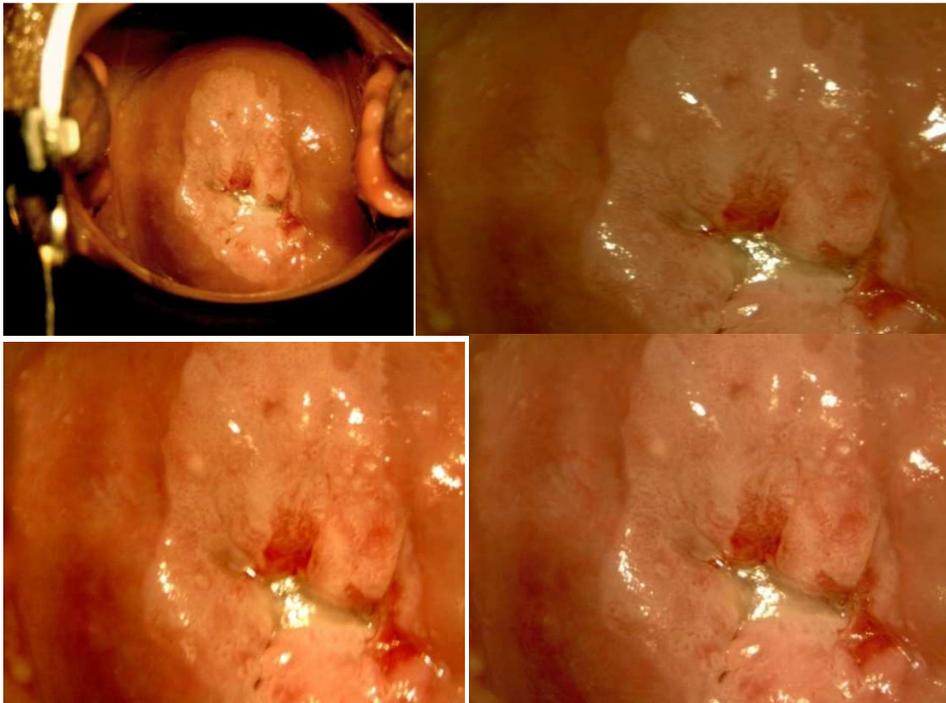
IMÁGENES POR COLPOSCOPIA

POCO SIGNIFICATIVA



Zonas blancas tenues, asociados ó no a ectopía

COLPOSCOPIA SIGNIFICATIVA



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

COLPOSCOPIA MUY SIGNIFICATIVA



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

PARTE V

V.1 INFORME FINANCIERO

