



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

El papel de la Anatomía Patológica en la Pre-
vención y Pronóstico del Cáncer de Cérvix

The role of Pathological Anatomy in the Preven-
tion and Prognosis of Cervical Cancer

Autora

Vanesa Alonso Ventura

Directora

M^a Teresa Villegas Sordo

Codirector

Guillermo Muñoz González

Facultad de Medicina/Universidad de Zaragoza

Curso 2016/2017

ÍNDICE

Resumen	Pág. 2
Abstract	Pág. 3
Introducción	Pág. 4-11
Objetivo e hipótesis	Pág. 12
Material y métodos	Pág. 12-13
Búsqueda	Pág. 12
Análisis estadístico	Pág. 13
Resultados	Pág. 14-29
Tabla con las características de los estudios	Pág. 14,15,18,19
Citología vs test virales	Pág. 16-18
Citología convencional vs citología en base líquida	Pág. 18-19
Correlación biopsia y conización	Pág. 19-20
Variabilidad interobservador	Pág. 21
El papel de la inmunohistoquímica	Pág. 22-28
VEGFR	Pág. 22-23
ADAR1	Pág. 24
Citoqueratinas	Pág. 25
P16INK4	Pág. 26-27
Survivina	Pág. 27-28
Otros marcadores	Pág. 28
Nuevas líneas de investigación	Pág. 28-29
Discusión	Pág. 30-31
Conclusiones	Pág. 32
Bibliografía	Pág. 33-35
Anexo 1	Pág. 36-37

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El virus del papiloma humano es un virus ADN de la familia Papovaviridae responsable del cáncer de cuello de útero y de sus lesiones precursoras. La incorporación al cribado de las pruebas de detección de ADN viral, han supuesto una mayor detección de casos por su mayor sensibilidad.

OBJETIVO. El objetivo primario es justificar, desde los puntos de vista estadístico y anatomopatológico, el protocolo actual para la prevención del cáncer de cérvix y, el secundario, es la evaluación del papel de la inmunohistoquímica en el pronóstico y progresión de las lesiones premalignas epiteliales y del cáncer escamoso de cérvix avanzado.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se realizaron dos búsquedas; una en enero de 2017 en cuatro bases de datos en la que se encontraron 2819 artículos y, la segunda, se realizó en marzo de 2017, en Pubmed en busca de novedades en el campo de la inmunohistoquímica. Tras la eliminación, fueron incluidos en el trabajo 39 y 9 de las respectivas búsquedas. Para el análisis estadístico se utilizaron Review Manager 5.3 y calculadora Excel para conversión de datos.

RESULTADOS. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad de las pruebas ADN viral frente a la citología ($p=0.0007$) para la detección de CIN 2+, así como en la especificidad a favor de la citología ($p=0.0003$). No se encontraron diferencias significativas entre la citología convencional y en base líquida ($p=0.06$ y $p=0.51$). La inmunohistoquímica reveló correlación significativa con el grado de lesión, así como con el pronóstico de la neoplasia. El marcador más utilizado y estudiado es la proteína p16INK4, cuya sensibilidad es equiparable a la de pruebas de detección viral y su especificidad significativamente superior.

CONCLUSIONES. La mayor sensibilidad de los test de VPH justifica su utilización como primera línea de cribado, así como la mayor especificidad de la citología explica su uso en mujeres con mayor prevalencia de infección por VPH. La expresión de marcadores inmunohistoquímicos implica peor pronóstico y mayor probabilidad de progresión tumoral, aunque podrían utilizarse como dianas terapéuticas en el futuro.

PALABRAS CLAVE: citología; test ADN; histología; correlación; inmunohistoquímica; sensibilidad; especificidad; diagnóstico; pronóstico.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Human papillomavirus is a DNA virus of the Papovaviridae family responsible for cervical cancer and its precursor lesions. The incorporation of viral DNA tests to the screening process has produced a greater detection of cases due to its greater sensitivity.

OBJECTIVE. The primary objective is to justify, from the statistical and pathological points of view, the current protocol for the prevention of cervical cancer, and the secondary objective is the evaluation of the role of immunohistochemistry in the prognosis and progression of premalignant lesions and advanced squamous cancers of the cervix.

MATERIAL AND METHODS. Two searches were performed; the first one in January 2017 in four databases, during which 2819 articles were found, and the second one was carried out in March 2017, in Pubmed looking for recent advances in immunohistochemistry. After the elimination, 39 and 9 respectively were included in the study. For statistical analysis, Review Manager 5.3 and Excel calculator were used for data conversion.

RESULTS. There were statistically significant differences in the sensitivity of viral DNA tests compared to cytology ($p=0.0007$) for the detection of CIN 2+, as well as in the specificity in favor of cytology ($p=0.0003$). There were no statistically significant differences between conventional and liquid-based cytology ($p=0.06$ y $p=0.51$). Immunohistochemistry revealed a significant correlation with the degree of lesion as well as with the prognosis of the neoplasia. The most commonly used and studied marker is the p16INK4 protein, whose sensitivity is comparable to viral detection tests and its specificity is significantly higher.

CONCLUSIONS. The greater sensitivity of HPV tests justifies its use as the first line of screening, and the greater specificity of cytology explains its use in those women with a higher prevalence of HPV infection. Positive biomarkers mean worse prognosis and more probability of tumor progression and they could be used as therapeutic targets.

KEYWORDS: cytology; DNA test; histology; correlation; immunohistochemistry; sensitivity; specificity; diagnosis; prognosis.

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus ADN de la familia Papovaviridae que, por sus características morfológicas, produce una gran variedad de lesiones. De éstas, las más importantes por su repercusión clínica, son las lesiones premalignas o neoplasias intraepiteliales (CIN) del cuello de útero⁽¹⁾, siendo el principal agente etiológico de las mismas.

Dentro de esta familia de virus no todos producen lesiones a nivel del tracto genital femenino ni todos son potencialmente malignos. Atendiendo a su capacidad para producir cambios neoplásicos en el cuello uterino, se pueden clasificar en:

- Virus de bajo riesgo oncológico. Los más característicos son los serotipos 6 y 11, considerados agentes etiológicos más frecuentes de las verrugas genitales o condilomas acuminados.
- Virus de alto riesgo oncológico. Fuertemente asociados con las lesiones escamosas de alto grado. Los más conocidos e importantes en nuestro medio son los serotipos 16 y 18, responsables de casi el 70% de los cánceres de cérvix.

El primer método que se utilizó como procedimiento diagnóstico de las lesiones neoplásicas del cuello uterino fue la citología vaginal convencional⁽²⁾. Sin embargo, la baja sensibilidad^(2,3) de esta prueba ha hecho que nuevas técnicas con mejor perfil para el *screening* poblacional sean utilizadas en la práctica clínica como primera línea diagnóstica⁽³⁾. Entre éstas, destacan el papel de la citología líquida y el de la detección del ADN viral incorporados en el protocolo actual de prevención de cáncer de cérvix en nuestro país. La evolución de las técnicas citológicas y moleculares en los últimos 20 años ha permitido no sólo mejorar la atención clínica y el diagnóstico precoz sino conocer el comportamiento del virus a nivel intracelular y el proceso de progresión oncológica. Asimismo, este conocimiento ha permitido desarrollar una serie de vacunas (bivalente, tetravalente y nonavalente) que han mejorado el perfil epidemiológico de las infecciones por VPH y, por consiguiente, han contribuido a la reducción de la incidencia de las lesiones premalignas.

La génesis de la neoplasia cervical consiste en la integración del ADN del VPH y la alteración de los mecanismos de crecimiento celular gracias a la interacción de las oncoproteínas virales E6 y E7 con las proteínas supresoras tumorales p53 y retinoblastoma (pRb), respectivamente. De esta manera, por la degradación de p53 al unirse a E6 y la inhibición de Rb tras la unión con E7 la célula se mantiene en un estado proliferativo permanente que conduce a su inestabilidad genética y clonación maligna⁽⁴⁾. En trabajos que han utilizado partículas tipo virus se ha evidenciado que el microtrauma que se produce durante la actividad sexual deja expuestas las células basales en activa proliferación a los distintos tipos de VPH y, de esta manera, la unión entre el receptor de la célula basal y la proteína L1 de la cápside permiten la endocitosis del virus a la célula huésped⁽¹⁾. Cuando se integra el ADN viral en el ADN del huésped comienza un incremento en la transcripción de E6 y E7, lo que supone inactivación de pRb. Dado que la pRb se comporta como feedback negativo de la expresión de p16INK4 (proteína de supresión tumoral), su inactivación se traduce en un incremento de ésta⁽⁵⁾. En los últimos años se ha discutido el valor diagnóstico de la detección inmunohistoquímica de la proteína p16, así como las implicaciones pronósticas que

pueda tener y constituye un ejemplo de las líneas de investigación actuales. El objetivo de éstas es, por un lado, mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas incluidas en el protocolo de prevención y, por otro, estudiar la posibilidad de predecir el comportamiento y la progresión de las lesiones de bajo grado o indeterminadas por medio de biomarcadores^(6,7).

PROTOCOLO ACTUAL DE DIAGNÓSTICO EN ESPAÑA

El protocolo actual para la prevención de cáncer de cuello uterino se acordó en base a los conocimientos más actuales acerca de su patogénesis y a los datos epidemiológicos de distribución de los serotipos víricos. Dado que la infección por VPH es una condición necesaria para que se produzcan lesiones premalignas, aquellas mujeres que no han tenido relaciones sexuales están exentas de realizarse ninguna prueba. Por otro lado, la vacunación sistemática ha reducido considerablemente la incidencia y se refleja en la edad de inicio de las pruebas, a partir de los 25 años, coincidiendo con el período de mayor prevalencia de infección por VPH. En el cuadro a continuación, se recoge un resumen del protocolo, sin incidir en los casos particulares que muestren alteradas algunas de las pruebas y que, por consiguiente, pasen a un estudio posterior:

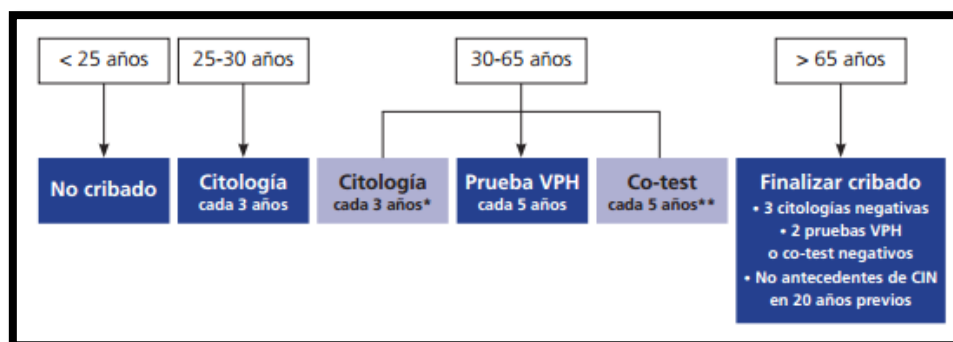


Imagen 1. Extraído de: Cribado poblacional del cáncer invasor de cuello uterino. *Oncoguía SEGO: Cáncer de Cuello Uterino 2008. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Octubre 2008.*

Cuando algunas de éstas salen alteradas, la prueba a realizar pasa a ser la colposcopia con biopsia dirigida puesto que es la prueba anatomopatológica que mejor informa de la morfología del epitelio y es la prueba de oro para la verificación de resultados anormales⁽²⁾. Los resultados de estas pruebas, tanto normales como atípicos, se definen en base al sistema Bethesda 2014⁽⁸⁾¹ para los extendidos citológicos e histológicos de la siguiente manera:

Anomalías celulares citológicas:

- En células escamosas:
 - L-SIL (Lesión escamosa de bajo grado)
 - H-SIL (Lesión escamosa de alto grado)
 - Células atípicas:
 - ASC-US (Células escamosas atípicas de significado incierto)
 - ASC-H (Células escamosas atípicas no pudiendo excluir una lesión de alto grado)
 - Carcinoma escamoso

¹ La última publicación Bethesda de 2014 trata de mejorar algunos aspectos relacionados con la nomenclatura de lesiones glandulares y lesiones de bajo grado que presentan algunos grupos celulares aislados sugestivos de alto grado⁽⁸⁾

- En células glandulares:
 - Células atípicas:
 - Células cervicales
 - Células endometriales
 - Células glandulares
 - AGC (Células glandulares atípicas)
 - Células atípicas:
 - Endocervicales, a favor de neoplasia
 - Glandulares, a favor de neoplasia
 - Adenocarcinoma endocervical *in situ*
 - Adenocarcinoma
 - Endocervical
 - Endometrial
 - Extrauterino
 - No especificado (NOS)

-NOS (Células atípicas “not otherwise specified”)

Anomalías histológicas:

- CIN 1: displasia leve (L-SIL)
 - CIN 2: displasia moderada.
 - CIN 3: displasia grave.
- } (H-SIL)

CITOLOGÍA CONVENCIONAL (CC)

La CC o *Papanicolaou* se implementó como primer procedimiento diagnóstico y tuvo gran aceptación por la facilidad de su reproducción y su bajo coste. Sin embargo, varios estudios^(9,10) demuestran baja concordancia con las muestras de biopsia, sobre todo para lesiones de intermedia gravedad, así como una sensibilidad de dispersión considerable e inferior a otras pruebas. Estas limitaciones tienen que ver, en primer lugar, con la variabilidad interobservador y con factores derivados de la toma de la muestra, el extendido hemático, la presencia de células inflamatorias y detritus celulares⁽²⁾. En segundo lugar, tienen que ver con las derivadas de la técnica y del retraso en la fijación de las muestras que pueden interferir en la morfología celular e inducir diagnósticos erróneos⁽²⁾.

CITOLOGÍA EN BASE LÍQUIDA (CBL)

La aparición de la CBL ha permitido superar los inconvenientes de la CC, demostrando superioridad diagnóstica sobre ésta^(2,3,11) y se ha incluido en algunas comunidades autónomas como primer método de cribado entre los 25 y los 30 años. Otra de las aportaciones de esta técnica es la reducción de citologías inespecíficas, esto es, con resultado citológico indeterminado (ASC-US o ASC-H), lo que disminuye el coste posterior de evaluación de estos resultados indeterminados en los que no se puede descartar una lesión de bajo grado (como es el caso del ASC-US) ni de alto grado (ASC-H)^(11,12,13).

Las características morfológicas que determinan la clasificación de la citología como una lesión de bajo grado o de alto grado se pueden ver reflejadas en las imágenes dispuestas a continuación:

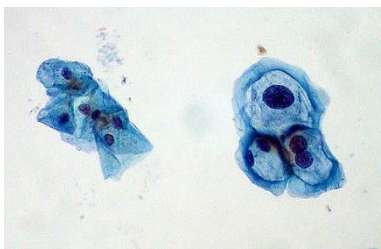


Imagen 2⁽¹⁴⁾. L-SIL (citología en medio líquido). A la izquierda se observan células normales y a la derecha infectadas por VPH.

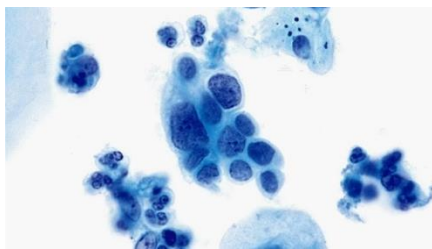


Imagen 3⁽¹⁵⁾. H-SIL (citología en medio líquido, 60X).

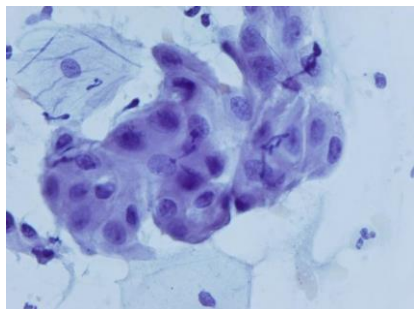


Imagen 4⁽¹⁶⁾. ASC-US (citología en medio líquido).

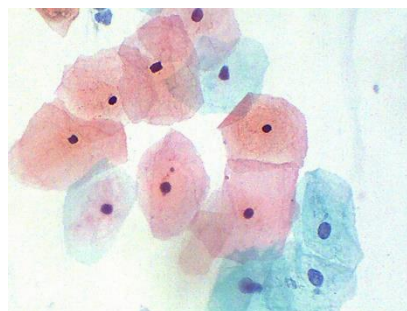


Imagen 5⁽¹⁷⁾. Hallazgos normales. Se observan células superficiales eosinófilas con núcleo picnótico y aspecto poligonal y células intermedias basófilas.

En la **Imagen 2** se observan núcleos de mayor tamaño y mitosis celular, mientras que en la **Imagen 3** estos cambios son más evidentes y la relación núcleo-citoplasma se ve muy reducida, en comparación con las células normales que se observan en la **Imagen 5**. En la **Imagen 4** se muestra un resultado de significado incierto, donde las características pueden ser un signo de infección por algunos tipos de VPH o corresponder a lesiones de crecimiento benigno.

DETECCIÓN ADN VIRUS

Hasta hace unos años, la detección del virus en el canal endocervical se hacía en aquellas pacientes con resultados anormales en la citología. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el test de ADN viral tiene mayor sensibilidad que la citología^(2,3) y, por este motivo, se utiliza en nuestro medio como primer método de cribado en mujeres mayores de 30 años. La razón por la que es a partir de esta edad y no antes radica en fundamentos epidemiológicos: la mayor parte de la población femenina por debajo de los 30 años presenta infección transitoria por el VPH sin tener lesiones significativas y, a lo largo de un período corto de años, se desharán de esa infección; por contra, a partir de los 30 resulta más difícil eliminar el virus y hay mayor riesgo de infecciones persistentes.

Existen varios métodos de detección de virus y los que se siguen desarrollando. Entre ellos se encuentran los de hibridación (HC2), los moleculares y los de amplificación. El primer método aceptado y más utilizado es el HC2, puesto que identifica 13 genotipos virales de alto riesgo (incluyendo 16 y 18) y 5 tipos de bajo riesgo; el hándicap es que no identifica el tipo viral

específico a diferencia de otros métodos. Por su parte, lo más importante de la detección y tipificación del VPH es su papel en la clasificación de citologías con resultado ASC-US y su implicación en el pronóstico y optimización de tratamiento en las lesiones precursoras de cáncer.

COLPOSCOPIA CON BIOPSIA DIRIGIDA. CONIZACIÓN

La colposcopia con biopsia dirigida supone el segundo escalón en el protocolo de prevención de cáncer de cérvix y su papel consiste en confirmar o descartar las lesiones presentes en la citología o identificar lesiones en resultados positivos para infección por VPH.

En último lugar se encuentra la conización, que es una medida terapéutica y diagnóstica, pues constituye una pieza macroscópica que, la mayor parte de las veces, coincide con el resultado histológico, no así siempre:

		Excisional procedure						Total
		Normal	CIN 1	CIN 2	CIN 3	AIS	SCC	
Biopsy	Normal, n (%)	2 (28.5)	1 (14.2)	2 (28.5)	2 (28.5)	—	—	7
	CIN 1, n (%)	14 (29.1)	23 (47.9)	1 (2.1)	10 (20.8)	—	—	48
	CIN 2, n (%)	5 (18.5)	6 (22.2)	6 (22.2)	10 (37.0)	—	—	27
	CIN 3/AIS, n (%)	4 (3.6)	8 (7.2)	5 (4.5)	78 (70.9)	1 (0.9)	14 (12.7)	110
	Absence, n (%)	6 (42.8)	4 (28.5)	1 (7.1)	3 (21.4)	—	—	14

CIN 1 indicates cervical intraepithelial neoplasia grade 1; CIN 2, cervical intraepithelial neoplasia grade 2; CIN 3, cervical intraepithelial neoplasia grade 3; AIS, adenocarcinoma in situ; SCC, squamous cell carcinoma.

Figura 1⁽¹⁸⁾. Kabaca C et al. Is Cervical Punch Biopsy Enough for the Management of Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. Journal Of Lower Genital Tract Disease 2014; 18 (3): 240-245.

Desde el punto de vista histológico, la neoplasia intraepitelial comprende diferentes grados con sus respectivas características, aunque, en algunos casos, no sea fácil atender a esos rasgos y emitir un diagnóstico claro, en la mayor parte de ocasiones así es. Los criterios que se utilizan para el diagnóstico de los diversos grados de CIN son: estratificación y maduración del epitelio cervical, anormalidades celulares y actividad mitótica.

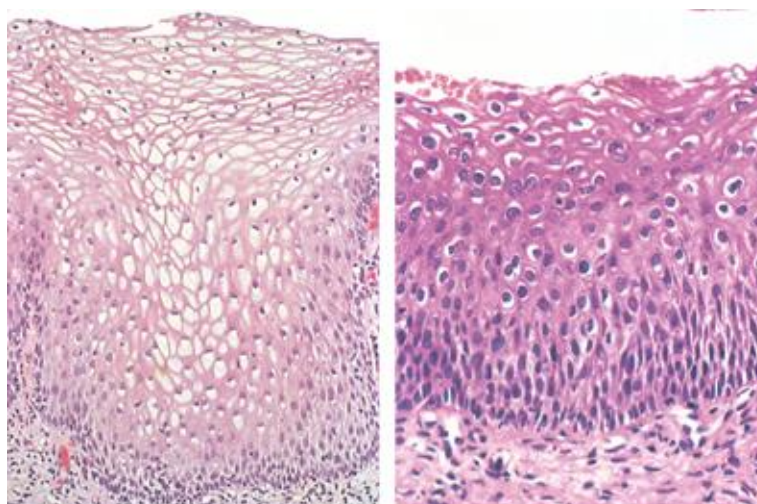


Imagen 6⁽¹⁹⁾. A la izquierda, epitelio normal. A la derecha CIN 1 → las alteraciones displásicas se encuentran limitadas a las capas más basales del epitelio, así como las mitosis y se acompañan de alteraciones citopáticas producidas por el VPH: coilocitosis, paraqueratosis... Se acompañan de maduración en los dos tercios superficiales del epitelio.

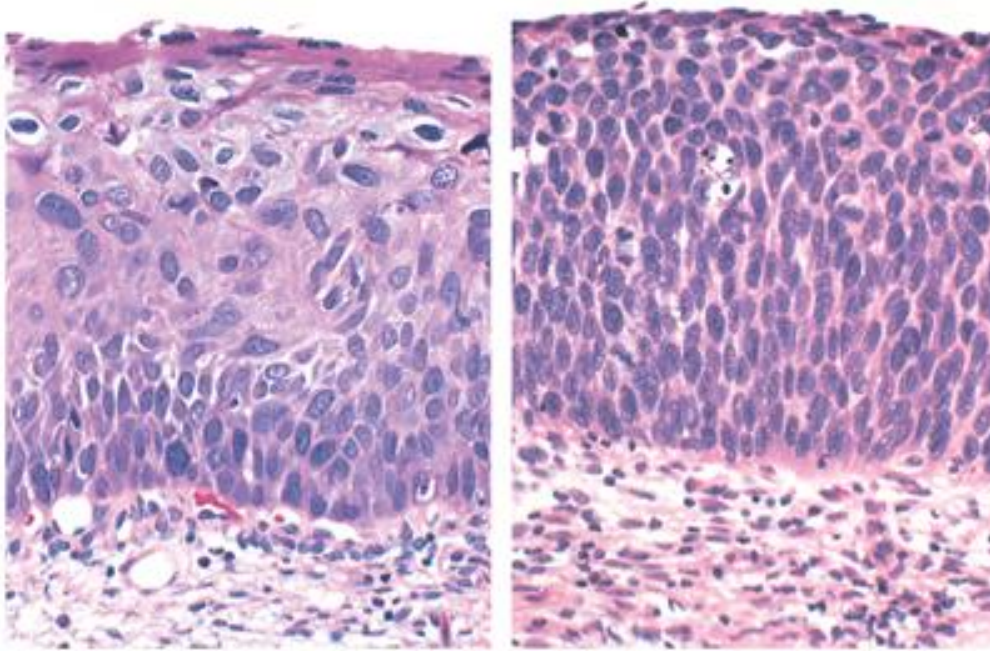


Imagen 7⁽¹⁹⁾. A la izquierda CIN 2 → se encuentra maduración en las capas superficiales y las atipias celulares se encuentran más próximas a la superficie que en el caso anterior. Las mitosis suelen encontrarse en los dos tercios displásicos basales (aunque pueden aparecer en cualquier nivel). En este estadio es posible encontrar mitosis atípicas. A la derecha CIN 3 → no se encuentra maduración y las atipias celulares están presentes en todas las capas celulares. Las mitosis atípicas aumentan en número y la proliferación de células displásicas puede desplazar al epitelio glandular.

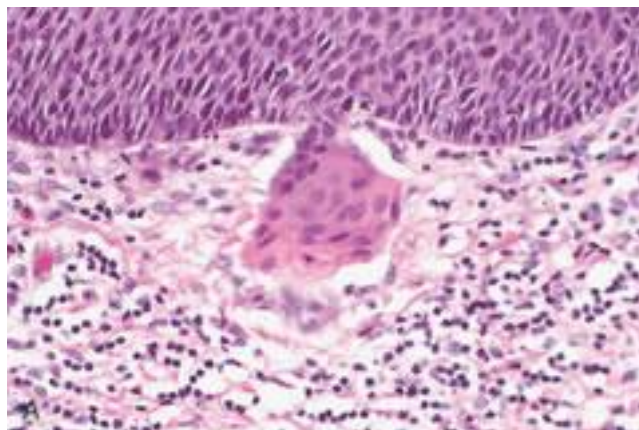


Imagen 8⁽²⁰⁾. Carcinoma microinvasor. Véase la invasión estromal y la rotura de la membrana basal.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La variabilidad inter e intraobservador hace referencia al grado de concordancia diagnóstica en las muestras citológicas y biópsicas. Se ha observado que la concordancia alcanza su máximo exponente en los extremos diagnósticos: biopsias negativas y CIN3/carcinoma invasor (F.J. Torres Gómez et al.)⁽²¹⁾. El problema de este hecho radica en que el tratamiento quirúrgico está disponi-

ble para las lesiones por encima de CIN 2 o intermedias, es decir, las que mayor variabilidad presentan son las que son susceptibles de tratamiento. Por este motivo, a lo largo de los años se han propuesto otros marcadores que reduzcan esta variabilidad y permitan homogeneizar los criterios, aumentando así la concordancia diagnóstica en las lesiones. Un buen marcador podrá ser útil si: posee una elevada sensibilidad para CIN2+ y/o CIN3 y una alta especificidad y es fácil de evaluar y reproducible. Algunos de los marcadores que se han ido utilizando bajo el propósito anteriormente citado son:

- **p16INK4a**⁽²¹⁾. Se trata de una proteína humana codificada por el gen supresor tumoral CDKN2A que se sobreexpresa cuando existe una infección por VPH y las evidencias existentes la convierten en altamente específica, sobre todo de las lesiones de alto grado. (**Tabla 7**). Se considera expresión cuando hay tinción de las capas basales y suprabasales, por muy pequeña que sea el área. Por el contrario, se considera negativa cuando existe negatividad absoluta, positividad focal o parcheada y la tinción exclusiva de las capas superficiales. Esta tinción resulta particularmente útil para diferenciar lesiones intraepiteliales de alto grado de las lesiones no neoplásicas con morfología similar, por ejemplo, alteraciones secundarias a la inflamación, atrofia o metaplasia inmadura (**Imagen 9**), así como para comprobar el estado de los márgenes de resección en piezas de conización.
- **Ki67**⁽²¹⁾. Es un antígeno que identifica células en proliferación. A pesar de que se ha empleado para discriminar en casos dudosos, es un marcador poco específico, ya que se expresa con mucha intensidad en muestras reactivas epiteliales. Algunos trabajos como Galgano et al. concluyen que no existe ventaja clara en su utilización conjunta con p16INK4a.

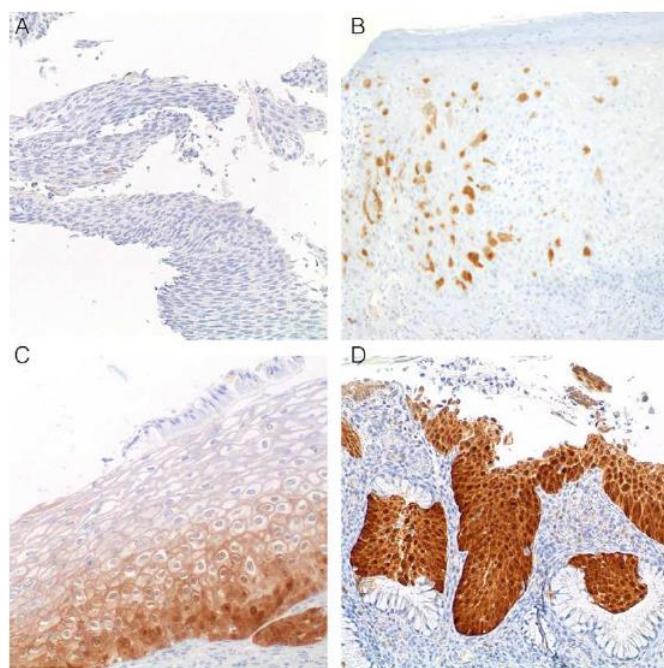


Imagen 9⁽²¹⁾. Patrones de tinción inmunohistoquímica para p16INK4a. A) Negatividad, atrofia. B) Negatividad, tinción parcheada. C) Positividad, tinción células basales (lesión de bajo grado). D) Positividad, tinción de todo el espesor epitelial (lesión de alto grado/carcinoma *in situ*).

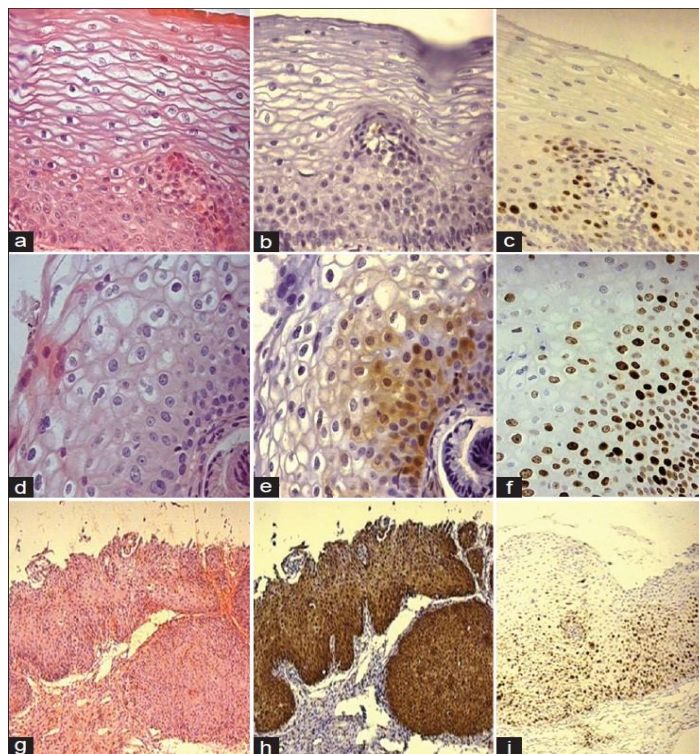


Imagen 10⁽²²⁾. Diferentes tinciones de biopsias cervicales: columna de la izquierda hematoxilina y eosina, del medio p16INK4a y derecha ki67. a, b y c negativas para lesión intraepitelial. d, e y f lesión intraepitelial de bajo grado. g, h e i lesión intraepitelial de alto grado.

- **Proteína 2 del mantenimiento de minicromosomas (MCM2) y la topoisomerasa II α (TOP II α)**⁽²¹⁾. Ambas se encuentran sobreexpresadas en procesos con inducción aberrante de la fase S del ciclo celular, hecho que ocurre en las células infectadas por VPH. Dado que mejoran su perfil de sensibilidad y especificidad cuando se combinan, se ha comercializado esta fórmula. Sin embargo, no han demostrado ninguna ventaja con respecto a p16INK4a.
- **Cdc6 y Mcm5**. Al igual que Ki67, son dos antígenos relacionados con la proliferación celular pero que, también presentan el mismo problema que el primero: carecen de especificidad al aparecer sobreexpresados cuando hay procesos inflamatorios epiteliales.
- **Forkead box protein 3 (Foxp3)**⁽²³⁾. Es un factor regulador de la transcripción que participa en las funciones de las células T CD4+ y ha sido definido y considerado como el principal marcador molecular de la subpoblación reguladora de linfocitos T. Estudios recientes han demostrado que, además, esta proteína se expresa en células tumorales.
- **Receptor Toll 4 (TLR4)**⁽²³⁾. Tiene un papel crucial en el reconocimiento de ligandos en la inmunidad adquirida y, en los últimos años, a este papel se le ha añadido su aparente expresión en líneas y tejidos tumorales.
- **Survivina**⁽²⁴⁾. Se trata de una proteína que tiene un doble papel: por un lado, actúa como supresor de la apoptosis y, por otro, juega un papel central en la división celular. Su implicación pronóstica en las lesiones neoplásicas y su predicción de respuesta al tratamiento radioterápico han hecho que varios estudios la hayan propuesto como posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. Todavía existe controversia en la relación de la survivina con el cáncer de cérvix y se requieren más estudios para esclarecer su implicación en este tipo de neoplasia.

OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo primario es justificar, desde el punto de vista estadístico y anatomopatológico, el protocolo actual para la prevención del cáncer de cérvix, así como la correlación entre pruebas diagnósticas. El objetivo secundario es la introducción de la inmunohistoquímica y la evaluación de su papel en el pronóstico y progresión de las lesiones premalignas epiteliales, ya que son las más frecuentes, y del cáncer escamoso de cérvix avanzado.

- ¿Existen diferencias significativas entre los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas de cribado? ¿es mejor utilizar la detección de ADN viral?
- ¿Es posible predecir el comportamiento de las lesiones cervicales a partir de la positividad de las biopsias para determinados marcadores inmunohistoquímicos?
- ¿Se puede mejorar el rendimiento diagnóstico de la histología utilizando técnicas inmunohistoquímicas?

MATERIAL Y MÉTODOS

BÚSQUEDA

Se realizó una primera búsqueda en enero de 2017 (ver anexo 1) en 4 bases de datos distintas. El número de artículos con respecto a cada base de datos se distribuyó de la siguiente manera: 1993 artículos en Pubmed, 49 en Cochrane Library, 507 en Web of Science y 269 en Scopus, un total de 2819. A continuación, utilizando la base de datos EndNote, se procedió, en primer lugar, a la eliminación de duplicados y, en segundo lugar, a la eliminación por título. Los criterios de exclusión, en este último proceso de eliminación fueron: tema tratado sin interés para el estudio, mujeres embarazadas y puerperio, mujeres con infección del virus de la inmunodeficiencia humana, enfermedades autoinmunes e infecciones vaginales concomitantes. Tras estos procesos quedaron, respectivamente, 2243 y 1178 artículos (ver **Figura 1** en **Anexo 1**). Posteriormente, se procedió a la eliminación por contenido. Se eliminaron 11 por ser libros, 10 por estar escritos en otro idioma distinto del inglés y no tener traducción disponible y 22 no estaban disponibles. Posteriormente, se eliminaron aquellos artículos anteriores al 2010.

Se realizó una nueva búsqueda en marzo 2017 (ver **Figura 2** en **Anexo 1**) con el fin de completar el apartado de nuevas líneas de investigación, así como el papel de la inmunohistoquímica en la progresión y pronóstico de las lesiones intraepiteliales del cérvix.

De esta búsqueda surgieron 4579 nuevos artículos en Pubmed, de los cuales, tras eliminar aquellos que no habían sido publicados en los últimos 5 años quedaron 992. Se revisaron artículos publicados a partir del año 2015, un total de 104. Tras excluir por título, no disponibilidad y tema quedaron 22, de los cuales 9 fueron utilizados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CITOLOGÍA VS ADN VIRUS

El análisis estadístico se llevó a cabo con Review Manager 5.3. Se encontraron en total 8 artículos que evaluaban a la vez y de forma comparativa los resultados de la citología (convencional o en medio líquido) y la detección del ADN viral (HC2 en su mayoría salvo Agorastos et al.2016, que utilizaba Cobas 4800 y Wojciech et al. 2012 que utilizaba Roche Cobas), comparando ambas pruebas con la biopsia. A partir de la proporción de falsos positivos y negativos y verdaderos positivos y negativos, se calcularon la sensibilidad y la especificidad de las pruebas como media e intervalo de confianza. Una vez obtenidas, se utilizó una calculadora Excel para convertir los datos dados en media e intervalo de confianza en media y desviación estándar y, así, calcular la diferencia de medias y el valor de p estadístico y evaluar si existían o no diferencias significativas en sensibilidad y especificidad entre ambas pruebas.

Para calcular la diferencia de medias era necesario un tamaño muestral. En el caso de la sensibilidad se utilizó como muestra ("Total" en los forest plots) la suma de VP y FN, así como para la especificidad la suma de VN y FP.

CC VS CBL

Se encontraron 3 artículos (**Tabla 3**) que comparaban los resultados de cribado obtenidos con CC y CBL en relación a un control con biopsia dirigida. De la misma manera que en el caso anterior, se calcularon la sensibilidad y especificidad de cada prueba a partir de los falsos positivos y negativos y verdaderos positivos y negativos para, posteriormente, convertir los resultados en media y desviación estándar y hacer la diferencia de medias y los forest plots.

BIOPSIA VS. CONIZACIÓN

Se encontraron un total de 2 artículos que comparaban los resultados obtenidos en biopsia por colposcopia dirigida con piezas de conización, utilizadas en el estudio como control (sin falsos negativos ni positivos). El procedimiento llevado a cabo fue idéntico al descrito en el primer apartado. Lo que se pretendía evaluar en este caso no era tanto si existían o no diferencias en la sensibilidad y especificidad de las pruebas, sino conocer su correlación.

RESULTADOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, el protocolo actual consiste en la detección de VPH en mujeres mayores de 30 años relegando la citología a la comprobación de resultados de los tests virales y pruebas posteriores o para el cribado de mujeres menores de 30 años, en las que la infección sin enfermedad existe con más frecuencia (infección transitoria, portadoras o infección sin patología) y los test de VPH darían muchos falsos positivos. Para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de cribado, se llevó a cabo una selección de artículos que incluían ambas pruebas y sus resultados (ver **Tablas 1 y 2**). Una vez distribuidos, se calcularon sensibilidad y especificidad de cada uno según los objetivos (CIN 2/ CIN 3) y las características de las pruebas. A continuación, se compararon ambas pruebas en busca de significación estadística obteniendo los siguientes resultados:

Primer autor	VP _{citol.}	FP _{citol.}	FN _{citol.}	VN _{citol.}	VP _{VPH}	FP _{VPH}	FN _{VPH}	VN _{VPH}
Agorastos T⁽²⁵⁾ CIN 2	13	18	14	45	27	49	0	14
	9	18	5	45	14	49	0	14
CIN 3								
Alaghebandan R⁽²⁶⁾ CIN 2	100	14	61	302	348	324	12	282
Blatt AJ⁽²⁷⁾ CIN 2	9966	175664	972	65173	10443	177488	453	64172
	3124	175664	230	65173	3225	177488	140	64172
CIN 3								
Mahmud SM⁽²⁸⁾ CIN 2	1	8	2	441	5	49	1	401
Nijhawan R⁽²⁹⁾ CIN 2/3	10	1	2	18	23	17	7	41
Rodríguez-Manfredi A⁽³⁰⁾ CIN 2	128	51	3	14	166	56	5	24
Song SH⁽³¹⁾ CIN 2	4	3	2	28	11	44	1	22
	16	3	0	28	21	44	0	22
CIN 3								
Wojciech R⁽³²⁾	26	8	20	51	107	140	10	69

Tabla 1. VP_{citol.}: verdaderos positivos citología; FP_{citol.}: falsos positivos citología; FN_{citol.}: falsos negativos citología; VN_{citol.}: verdaderos negativos citología; VP_{VPH}: verdaderos positivos test VPH; FP_{VPH}: falsos positivos test VPH; FN_{VPH}: falsos negativos test VPH; VN_{VPH}: verdaderos negativos test VPH.

Primer autor	Año	Técnica citológica	Test VPH	Objetivo diagnóstico	Muestra control	S citología[IC 95%]	E citología[IC 95%]	S ADN[IC 95%]	E ADN[IC 95%]
Agorastos T ⁽²⁵⁾	2015	CBL	Cobas HPV test	CIN 2	Biopsia	0.48 [0.29,0.68]	0.71 [0.59,0.82]	1.00 [0.87, 1.00]	0.22 [0.13, 0.34]
				CIN 3		0.64 [0.35,0.87]	0.71 [0.59,0.82]	1.00 [0.77, 1.00]	0.22 [0.13, 0.34]
Alaghebandan R ⁽²⁶⁾	2013	CC	HC2	≥ CIN 2	Biopsia	0.62 [0.54,0.70]	0.95 [0.92,0.97]	0.97 [0.94, 0.98]	0.47 [0.43, 0.51]
Blatt AJ ⁽²⁷⁾	2015	CBL	HC2	CIN 2 +	Biopsia	0.91 [0.91, 0.92]	0.271 [0.27, 0.27]	0.96 [0.95, 0.96]	0.265 [0.26, 0.27]
				CIN 3 +		0.93 [0.92, 0.94]	0.271 [0.27, 0.27]	0.96 [0.95, 0.96]	0.265 [0.26, 0.27]
Mahmud SM ⁽²⁸⁾	2012	CC	HC2	≥ CIN 2	Biopsia	0.33 [0.01,0.91]	0.980[0.97,0.99]	0.83 [0.36, 1.00]	0.89 [0.86, 0.92]
Nijhawan R ⁽²⁹⁾	2010	CC	HC2	CIN 2-3	Biopsia	0.83 [0.52, 0.98]	0.95 [0.74, 1.00]	0.77 [0.58, 0.90]	0.71 [0.57, 0.82]
Rodríguez-Manfredi A ⁽³⁰⁾	2013	CBL	HC2	CIN 2-3	Pieza de conización	0.98 [0.93,1.00]	0.22 [0.12,0.33]	0.97 [0.93, 0.99]	0.22 [0.15, 0.31]
Song SH ⁽³¹⁾	2012	CBL	HC2	CIN 2	Biopsia	0.67 [0.22,0.96]	0.90 [0.74,0.98]	0.92 [0.62, 1.00]	0.33 [0.22, 0.46]
				CIN 3/CIS		1.00 [0.79,1.00]	0.90 [0.74,0.98]	1.00 [0.84, 1.00]	0.33 [0.22, 0.46]
Wojciech R ⁽³²⁾	2012	CC	Roche Cobas	CIN 2 +	Biopsia	0.57 [0.41,0.71]	0.86 [0.75,0.94]	0.91 [0.85, 0.96]	0.33 [0.27, 0.40]

Tabla 2. Características de los estudios incluidos en la comparación citología vs test ADN viral con los datos de sensibilidad y especificidad correspondientes. **S:** sensibilidad; **E:** especificidad; **IC:** intervalo de confianza.

CITOLOGÍA Y DETECCIÓN DE ADN VIRAL CIN 2 o CIN 2 +

Sensibilidad

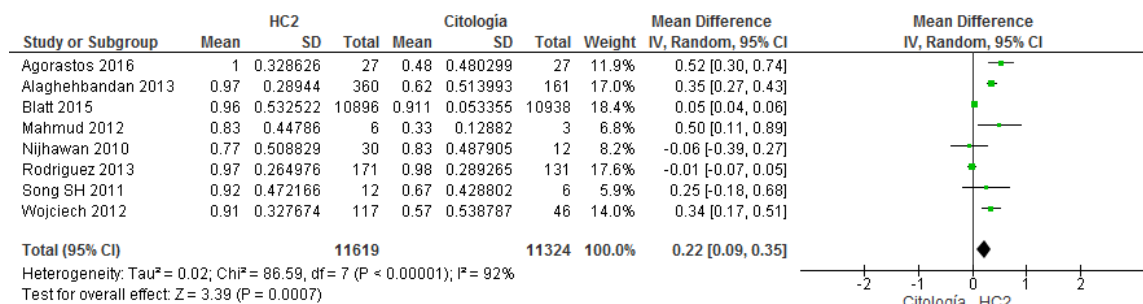


Figura 2. Forest plot para la sensibilidad tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

Especificidad

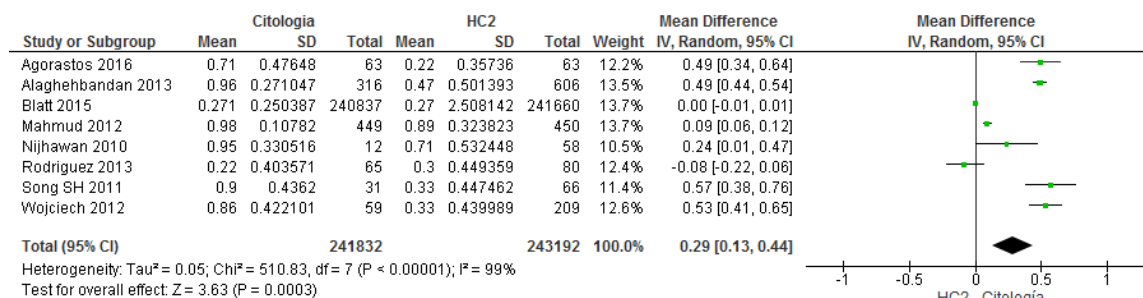


Figura 3. Forest plot para la especificidad tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

Como se observa en los forest plots, las pruebas de ADN tienen una sensibilidad superior a la citología de forma estadísticamente significativa ($p=0.0007$), mientras que, la diferencia de especificidades, presenta significancia estadística a favor del uso de la citología ($p=0.0003$). Esto explicaría y justificaría el uso de las pruebas de detección viral como primera línea de cribado en la población general y la preferencia de la citología cuando estas poblaciones tienen una prevalencia muy alta de infección por VPH (donde los test virales darían muchos falsos positivos).

Puesto que algunos artículos utilizaron CC y otros CBL, se hizo un subanálisis y se compararon de forma independiente las dos citologías con la captura de híbridos. Los resultados del subanálisis muestran que las pruebas de ADN son más sensibles de forma estadísticamente significativa ($p<0.0001$) cuando se comparan con la CC, mientras que, cuando HC2 se compara con la CBL, la diferencia de sensibilidad es marginalmente significativa, con un valor de $p=0.05$ (véase **Figura 4**).

De la misma manera, se procedió a estudiar por separado la especificidad de la CC y de la CBL y se comparó individualmente con la de HC2. En este caso y como se puede observar en la

Figura 5 se encontraron diferencias estadísticamente significativas a favor del uso de la CC ($p=0.02$) pero no para el uso de la CBL ($p=0.10$).

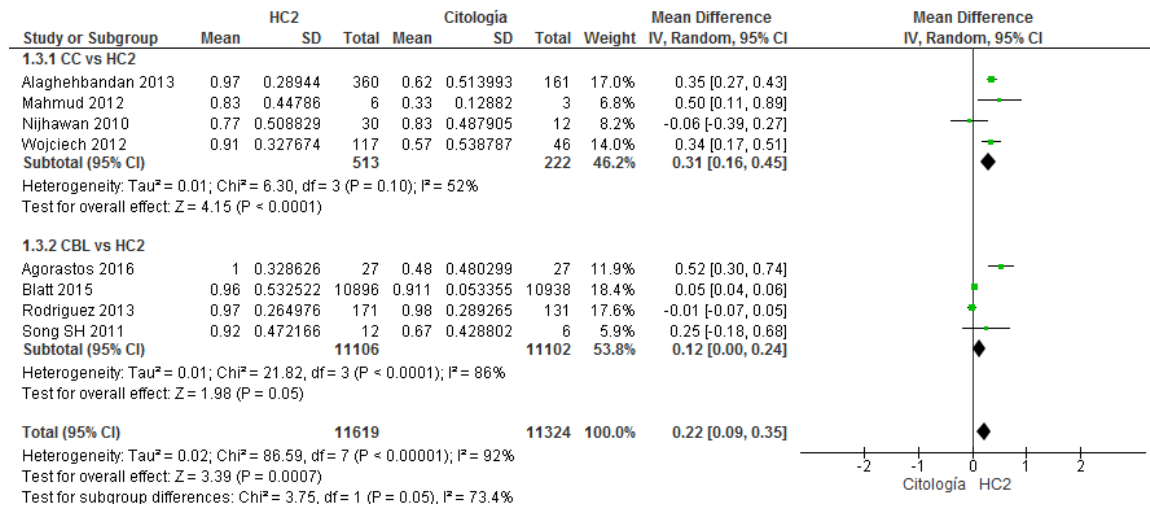


Figura 4. Forest plot para el estudio de la sensibilidad separando la CC y de la CBL y comparándolas con HC2.

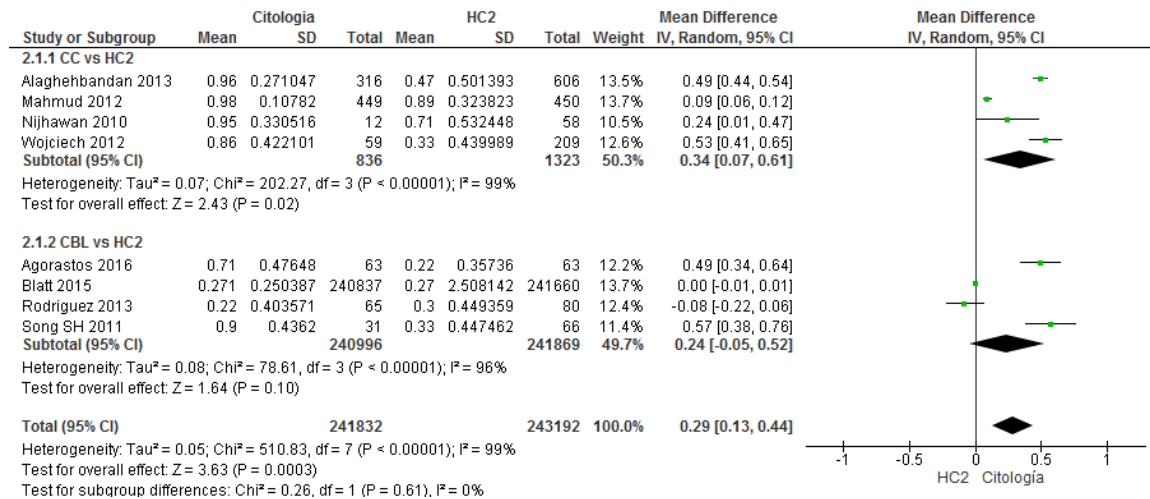


Figura 5. Forest plot para el estudio de la especificidad separando la CC y de la CBL y comparándolas con HC2.

CBL y DETECCIÓN ADN VIRAL PARA CIN 3

Sensibilidad

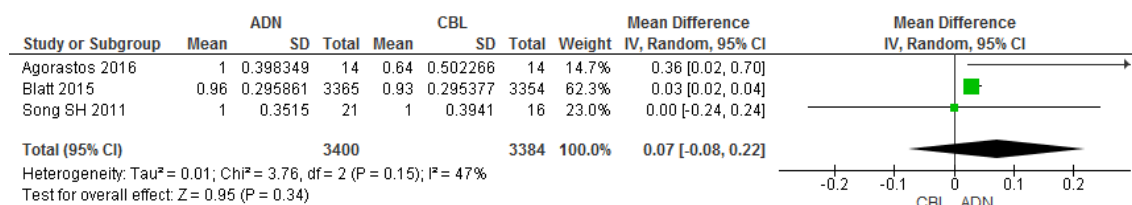


Figura 6. Forest plot para la sensibilidad de CBL vs HC2 en CIN 3 tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

Especificidad

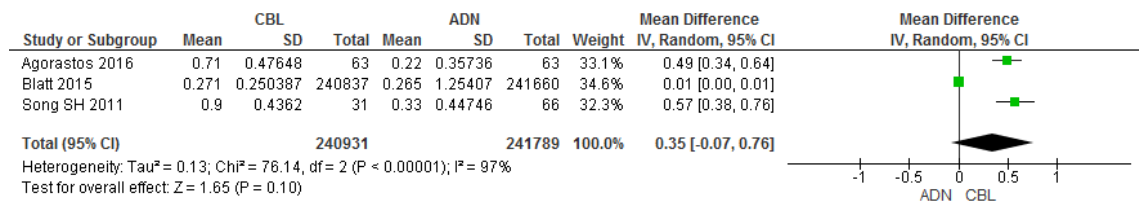


Figura 7. Forest plot para la especificidad de CBL vs HC2 en CIN 3 tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

En las lesiones CIN 3, la sensibilidad de la citología aumenta y la variabilidad interobservador de ésta disminuye⁽²¹⁾. Como se puede observar en estos forest plot, en comparación con los de CIN 2+, el valor de en la sensibilidad es muy superior ($p=0.34$ frente a $p=0.05$ ó $p<0.0001$). Estos resultados confirman la premisa de que, a medida que las lesiones aumentan en gravedad, la concordancia diagnóstica entre patólogos aumenta y la sensibilidad de las pruebas son similares. Sin embargo, la especificidad de las pruebas de ADN sigue siendo un poco inferior, aunque no significativamente, con respecto a la de la CBL.

CC Y CBL

Se compararon ambas citologías entre sí para valorar si esas ventajas de la CBL de las que se hablaban al principio tenían significancia estadística. En la **Tabla 3** se recogen los datos de sensibilidad y especificidad de ambas pruebas:

Primer autor	Año	VP	FP	FN	VN	SENSIBILIDAD [IC]	ESPECIFICIDAD [IC]
Jesdapatarakul S ⁽³³⁾ (CC)	2010	8	2	10	44	0.44 [0.22,0.69]	0.96 [0.85,0.99]
Jesdapatarakul S (CBL)		11	3	13	37	0.46 [0.26,0.67]	0.93 [0.80,0.98]
Karimi-Zarchi M ⁽³⁴⁾ (CC)	2013	1	8	8	133	0.11 [0.00,0.48]	0.94 [0.89,0.98]
Karimi-Zarchi M (CBL)		6	34	3	107	0.67 [0.30,0.93]	0.76 [0.68,0.83]
Tanabodee J ⁽³⁵⁾ (CC)	2015	2	3	3	39	0.40 [0.05,0.85]	0.93 [0.81,0.99]
Tanabodee J (CBL)		4	0	0	45	1.00 [0.40,1.00]	1.00 [0.92,1.00]

Tabla 3. VP.: verdaderos positivos; FP.: falsos positivos; FN.: falsos negativos; VN: verdaderos negativos; CC: citología convencional; CBL: citología en base líquida; IC: intervalo de confianza al 95%.

Sensibilidad

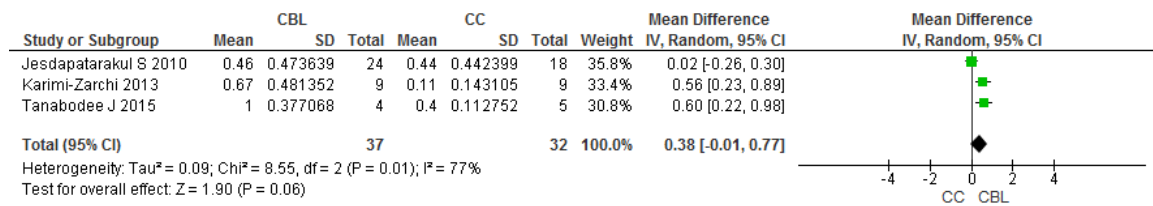


Figura 8. Forest plot para la sensibilidad de CBL vs CC en CIN 2/3 tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

Especificidad

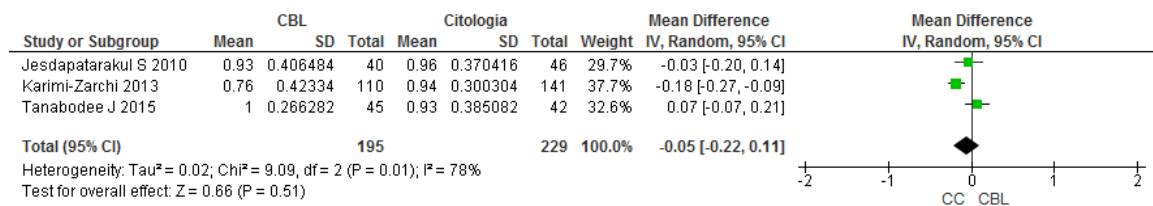


Figura 9. Forest plot para la especificidad de CBL vs CC en CIN 2/3 tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

Tras el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas ni en la sensibilidad ni en la especificidad de las pruebas mencionadas ($p=0.06$ y $p=0.51$, respectivamente). Sin embargo, se puede observar una sensibilidad superior y con un intervalo de variabilidad más estrecho (aunque sin significancia estadística) en la CBL, lo que podría servir para justificar, junto con el menor porcentaje de citologías indeterminadas e insatisfactorias, que se prefiera su uso en la actualidad.

BIOPSIA Y CONIZACIÓN

Primer autor y año	Lesión	VP	FP	FN	VN	SENSIBILIDAD [IC]	ESPECIFICIDAD [IC]
Kabaca C 2014⁽¹⁸⁾ Biopsia	CIN 3	78	4	5	8	0.94 [0.86,0.98]	0.67 [0.35,0.90]
	CIN 2	6	5	3	8	0.67 [0.30,0.93]	0.62 [0.32,0.86]
Kabaca C 2014 Cono	CIN 3	83	0	0	12	1.00 [0.96,1.00]	1.00 [0.74,1.00]
	CIN 2	9	0	0	13	1.00 [0.66,1.00]	1.00 [0.75,1.00]
Rodriguez-Manfredi⁽³⁰⁾ 2013 Biopsia	CIN 3	67	19	15	20	0.82 [0.72,0.89]	0.51 [0.35,0.68]
	CIN 2	70	40	15	20	0.82 [0.73,0.90]	0.33 [0.22,0.47]
Rodriguez-Manfredi⁽³⁰⁾ 2013 Cono	CIN 3	82	0	0	39	1.00 [0.96,1.00]	1.00 [0.91,1.00]
	CIN 2	85	0	0	60	1.00 [0.96,1.00]	1.00 [0.94,1.00]

Tabla 4. VP.: verdaderos positivos; FP.: falsos positivos; FN.: falsos negativos; VN.: verdaderos negativos; CC: citología convencional; CBL: citología en base líquida; IC: intervalo de confianza al 95%.

Para evaluar el grado de concordancia de la biopsia dirigida por colposcopia y la pieza de conización se compararon, siguiendo el mismo procedimiento, la sensibilidad y la especificidad de cada una de las pruebas, tomando como control la pieza de conización.

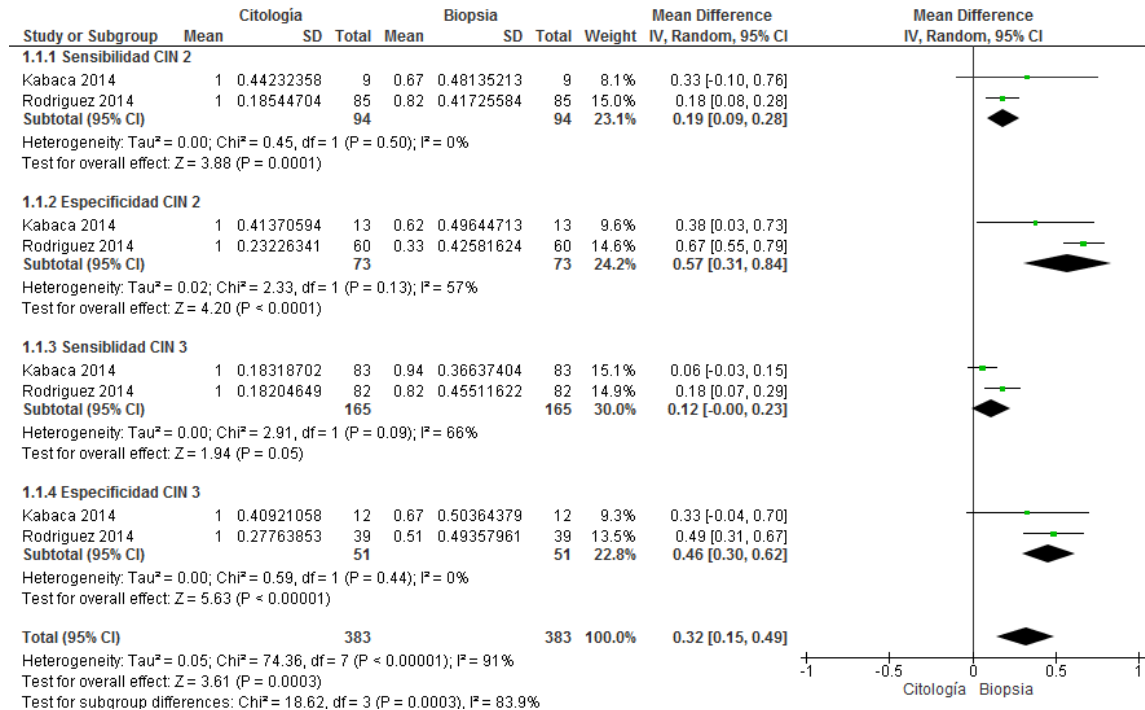


Figura 10. Forest plot para evaluar el grado de concordancia de sensibilidad y especificidad de biopsia y como en CIN 2 y CIN 3, tomando la diferencia de medias y la desviación estándar como datos originales, ponderando por la inversa de la varianza y tomando un modelo randomizado.

Se acepta que la biopsia dirigida por colposcopia es el estándar de oro en el diagnóstico de las lesiones precancerosas de cuello uterino. Sin embargo, los resultados reflejados tras el análisis comparativo de los dos estudios muestran diferencias significativas entre ambas pruebas (salvo en el caso de la sensibilidad para CIN 3 con $p=0.05$), lo que revela una baja correlación entre ambas. Las explicaciones que pueden darse a este respecto son las siguientes: en algunas ocasiones, el único foco de lesión es el que se encuentra en la biopsia dirigida por colposcopia, de manera que tras su toma la lesión desaparece y el resultado de la conización no concuerda en absoluto con la muestra biopsiada; el tiempo que transcurre desde la toma de biopsia hasta la cirugía es suficiente como para que las lesiones regresen o disminuyan en gravedad dando lugar a una discordancia de resultados obtenidos; resulta más sencillo reconocer las lesiones de intermedia gravedad cuando es posible compararlas con regiones sanas o de mayor y menor grado, por este motivo, el reconocimiento de lesiones es más sencillo en la pieza de conización que en la biopsia aislada, pudiendo explicar, así, esas diferencias. No es casualidad que en las lesiones de alto grado la sensibilidad de las dos pruebas sea equivalente pues, en lesiones de mayor gravedad, la correlación entre ambas pruebas es mayor.

VARIABILIDAD INTEROBSERVADOR

Los resultados de la variabilidad interobservador representan el grado de concordancia diagnóstica y se expresan con el índice Kappa cuyo significado se interpreta según la **Tabla 5**:

Valoración índice kappa

Valores	Fuerza de concordancia
< 0.20	Pobre
0.21-0.40	Débil
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Buena
0.81-1.00	Muy buena

Tabla 5⁽²¹⁾. Valores del índice kappa y su interpretación

A pesar de que la biopsia es el estándar de oro para el diagnóstico de las lesiones precursoras del cáncer invasivo de cérvix, existe una moderada variabilidad interobservador que dificulta el tratamiento adecuado de las lesiones premalignas. En la **tabla 6** se pueden observar algunos valores del índice kappa de los estudios encontrados disponibles en la búsqueda inicial:

Primer autor	Año	Diagnóstico	Kappa interobservador (IC 95%)
Basu et al. ⁽³⁶⁾	2013	Normal	0.32
		LSIL	0.23
		HSIL	0.48
		Cáncer	0.76
Placidi et al. ⁽³⁷⁾	2016	Cualquier diagnóstico	A: 0.692 (0.682-0.702)
			B: 0.603 (0.558-0.612)
			C: 0.521 (0.485-0.543)
			D: 0.753 (0.739-0.757)
Stoler et al. ⁽³⁸⁾	2015	Normal	0.53 (0.50-0.56)
		CIN 1	0.35 (0.31-0.38)
		CIN 2	0.32 (0.29-0.35)
		CIN 3	0.64 (0.61-0.67)
		Cáncer	0.77 (0.71-0.84)
		Cualquier diagnóstico	0.46 (0.43-0.48)

Tabla 6. Datos de variabilidad interobservador de 3 artículos incluidos.

Los datos recogidos en la **Tabla 6** demuestran que la variabilidad interobservador disminuye cuando se trata de lesiones epiteliales de alto grado, es decir, cuando existe cáncer o lesiones CIN 3+. Sin embargo, cuando son lesiones intermedias y susceptibles de ser o no tratadas quirúrgicamente (CIN 2/CIN2+) no hay tanta concordancia entre los patólogos como demuestran Basu et al.⁽³⁶⁾ y Stoler et al.⁽³⁸⁾. Este último, muestra una fuerza de concordancia débil para las lesiones CIN 2 mientras que, para lesiones avanzadas, la concordancia es buena (kappa= 0.64 para CIN 3 y kappa= 0.77 para cáncer).

Estos datos sugieren la necesidad de técnicas aplicadas a la histología que permitan aumentar la concordancia interobservador y, de esa manera, mejorar el manejo de las lesiones intermedias. Desde su aparición, el objetivo de las técnicas inmunohistoquímicas ha sido, entre otros, disminuir la variabilidad entre los patólogos.

EL PAPEL DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES PREMALIGNAS

Se sabe que la mayor parte de carcinomas de cérvix derivan de lesiones intraepiteliales que pueden progresar o regresar dependiendo del estado inmunitario de las pacientes, así como de la presencia de cofactores (tabaco, enfermedades de transmisión sexual concomitantes, embarazo...). En el momento actual se están investigando patrones de inmunotinción que permitan diferenciar entre aquellos casos que van a progresar y los que no y, de esta manera, llevar la conducta más apropiada con cada paciente, evitando tratamientos y seguimientos innecesarios, además de mejorar el diseño de algoritmos de manejo clínico. A continuación, se enumeran y explican algunos de los marcadores más relevantes y estudiados en la actualidad.

VEGFR2

Como ya es conocido, los factores proangiogénicos han sido identificados como los biomarcadores más importantes en el proceso de carcinogénesis e invasión tumorales. Los estudios realizados han demostrado que el proceso de linfangiogénesis está presente desde las lesiones preneoplásicas más iniciales y, por tanto, la expresión de estos factores podría tener importancia en la evolución y pronóstico de las lesiones⁽³⁹⁾. De entre los receptores de la familia de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), el subtipo 2 es el que se ha considerado como el más importante en el proceso de angiogénesis tumoral. No existe consenso en relación a su significado, pues existen diferencias entre los distintos tipos de cáncer. Así, en pacientes con cáncer de mama la expresión de VEGFR 2 no se correlaciona con el grado histológico; sin embargo, en pacientes con cáncer de vejiga su ausencia se relaciona con menor probabilidad de recurrencia y mayor supervivencia libre de enfermedad⁽⁴⁰⁾. En lo que respecta al cáncer de cérvix, Jach et al. 2010 y Kuemmel et al. 2009 identificaron relaciones casi lineares entre su expresión y el grado de neoplasia intraepitelial⁽⁴⁰⁾, así como correlación con la progresión de la enfermedad. Asimismo, la sobreexpresión e intensidad de VEGF es mayor en lesiones histopatológicas CIN 2 y CIN 3 en comparación con los grupos CIN 1⁽³⁹⁾.

A pesar de que no hay evidencias claras en relación a este marcador y la supervivencia de las mujeres con cáncer, sí que se revelan asociaciones positivas con factores pronósticos tales como metástasis a distancia o progresión libre de enfermedad (en el caso de VEGFR1) y tamaño tumoral (en el caso de VEGFR 2)⁽⁴⁰⁾. Dang et al. 2017⁽⁴⁰⁾ hipotetiza sobre la posible implicación de VEGFR1 en la recurrencia tumoral y baja supervivencia, al tiempo que alega necesidad de mayor investigación en este aspecto.

Algunos estudios^(40,41) han encontrado diferencias en cuanto a la supervivencia en pacientes que expresan VEGFR y los que no, siendo mayor en éstos últimos, como se puede observar en las **imágenes 12 y 13**.⁽⁴⁰⁾ A pesar de que los mecanismos moleculares de proliferación celular y vascularización inducidos por VEGFR no son del todo conocidos, la posible utilización de estos receptores como dianas terapéuticas supone un avance prometedor en la terapéutica y pronóstico de las mujeres afectas⁽⁴⁰⁾.

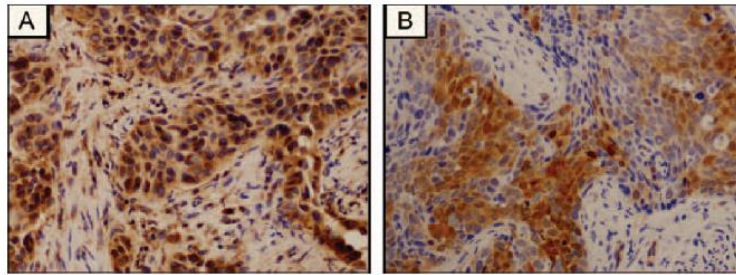


Imagen 11⁽⁴⁰⁾. Inmunotinción para VEGFR1 y VEGFR2. A (x200). Expresión de VEGFR1 en el citoplasma de las células en cáncer de cérvix.. B (x200). Expresión citoplasmática de VEGFR2 en lesiones del cervix.

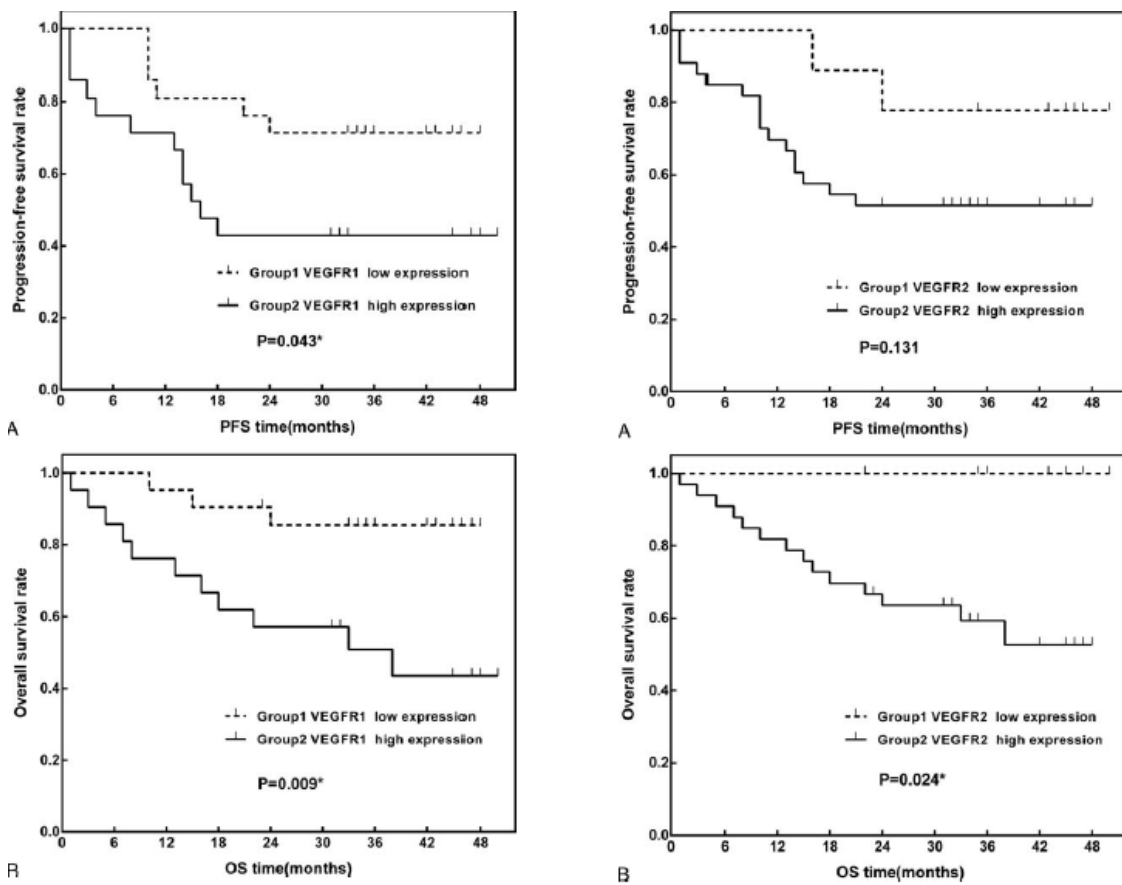


Imagen 12⁽⁴⁰⁾. Curvas de Kaplan-Meyer. A) Se muestra la progresión libre de enfermedad a los tres años (PFS = progression-free survival) en pacientes estratificadas de acuerdo a la sobre-expresión de VEGFR 1. B) Se muestra la supervivencia global (OS= overall survival) en pacientes con alta y baja expresión de VEGFR 1. Tanto en A) como en B) se observan diferencias esta-

Imagen 13⁽⁴⁰⁾. Curvas de Kaplan-Meyer. A) Se muestra la progresión libre de enfermedad a los tres años (PFS = progression-free survival) en pacientes estratificadas de acuerdo a la sobre-expresión de VEGFR 2. B) Se muestra la supervivencia global (OS= overall survival) en pacientes con alta y baja expresión de VEGFR 2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global, no así en la progresión libre de enfermedad.

ADAR1

Estudios recientes⁽⁴²⁾ han demostrado que la adenosin-desaminasa dependiente de ARN (ADAR1) se sobreexpresa en las células tumorales y juega un papel importante en la progresión de neoplasias en varias localizaciones, así como en el cáncer de cérvix⁽⁴²⁾, observándose una relación directamente proporcional en su expresión y el estadio de la enfermedad cervical. Además, se ha observado una mayor supervivencia en aquellas mujeres con lesiones negativas para ADAR1 (ADAR1-) con respecto a las que presentaban positividad para este marcador (ADAR1+).

Chen et al. 2017⁽⁴²⁾ demuestran diferencias significativas en cuanto a la supervivencia en los grupos ADAR1+ y ADAR1-, a favor de este último. En las curvas de supervivencia se puede observar que al año y a los dos años, la supervivencia en el grupo ADAR1- es del 100% y del 93.8% respectivamente, frente a la supervivencia del grupo ADAR1+ al año, 82.1%, y a los dos años 81.2% (**Imagen 14**). De mismo modo, encontraron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad en ambos grupos (**Imagen 15**). Desde el punto de vista anatomopatológico, existe correlación entre la expresión de ADAR1 y la invasión perineural, considerada como un fenómeno de invasión local y metástasis en estudios previos (Memarzadeh et al. 2003, Horn LC et al. 2010 y Zhang G et al. 2015)⁽⁴²⁾, lo que parece indicar que este marcador está implicado en el pronóstico del carcinoma escamoso de cérvix, además de correlacionarse con el grado de lesión.

Sin embargo, se requieren más estudios al respecto para poder sacar conclusiones sobre las consecuencias de la positividad de este marcador en el pronóstico y evolución de las lesiones premalignas y del cáncer de cérvix, así como de su posible utilidad en el tratamiento.

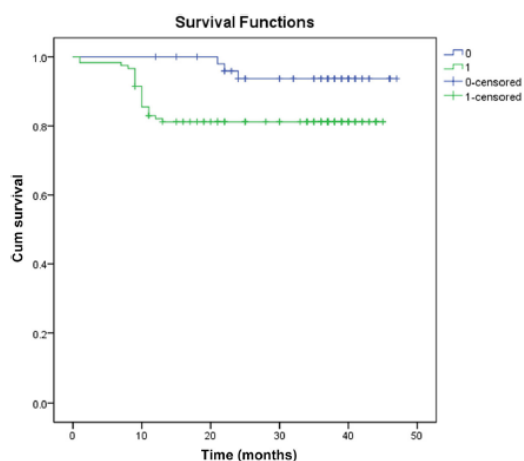


Imagen 14⁽⁴²⁾. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia en pacientes ADAR1 + (verde) y – (azul).

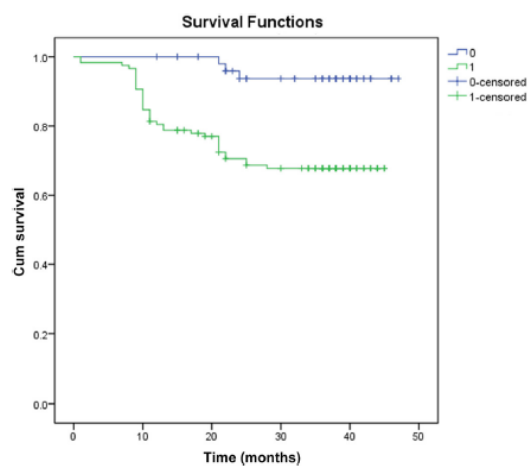


Imagen 15⁽⁴²⁾. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en pacientes ADAR1 + (verde) y – (azul).

CITOQUERATINAS(CK)^(43,44)

Las citoqueratinas han sido utilizadas como biomarcadores para identificar lesiones precancerosas susceptibles de evolucionar. Esto es así porque, al igual que ocurre con otros marcadores, su positividad en lesiones de bajo grado o CIN 1 sugieren una mayor probabilidad de progresión a CIN 3 frente a aquellas que son negativas. El epitelio normal escamocolumnar es muy susceptible a la infección por VPH y posterior transformación neoplásica, siendo algunas citoqueratinas marcadores precoces de esta infección, aunque también se expresan en la mayor parte de pacientes con neoplasia intraepitelial y carcinoma. Lee et al. 2017⁽⁴³⁾ encontraron que tanto la citoqueratina 7 como la 19 (CK7/CK19) se expresaban en las lesiones CIN 3 en el 100% de los casos, mientras que en el carcinoma escamoso se expresaron en un 66% y 100%, respectivamente. Todavía es desconocido el mecanismo de acción de CK7 y la participación de CK19 en el cáncer cervical VPH+, sin embargo, se ha observado que en las lesiones CIN 1, CK7 aparece positivamente en las células más superficiales y, conforme avanza gradualmente la lesión, se convierte en una expresión basal. No así es la positividad para CK19, que comienza desde el estrato basal hasta la superficie, al igual que p16INK4⁽⁴³⁾. Las conclusiones a este respecto apuntan que ambas CK tendrían un papel diferente en la génesis de la neoplasia cervical: CK7 en el fenómeno de replicación viral (podría ser un marcador precoz de infección por VPH) y CK19 en el proceso de integración viral como promotor de la oncoproteína E7⁽⁴³⁾.

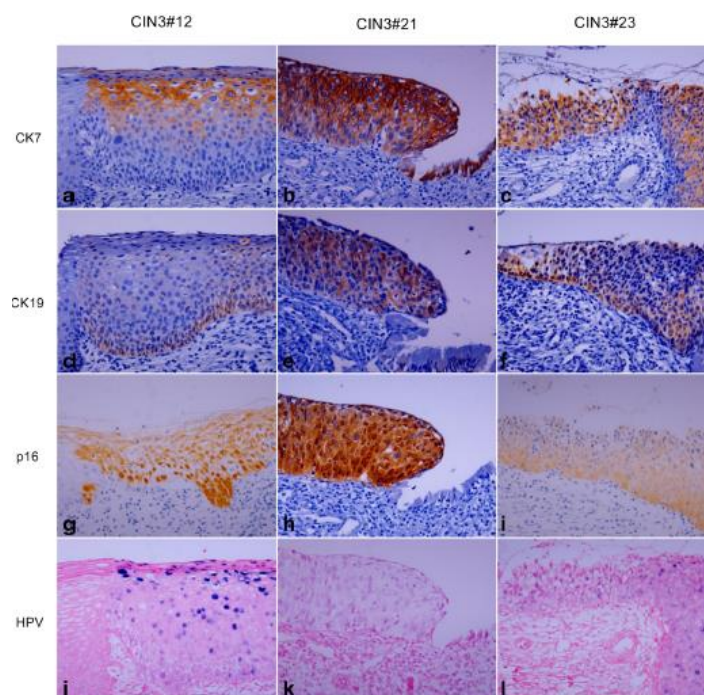


Imagen 16⁽⁴³⁾. Patrones de positividad para los marcadores CK7, CK19, p16 y VPH AR. a) patrón parcheado en las capas superficiales. b) y c) patrón difuso para CK7, d) patrón parcheado en las capas basales. e) y f) patrón difuso para CK19 g) patrón difuso en todo el grosor. h) e i) patrón difuso para p16. j) patrón episomal e intracelular de VPH. k) patrón intracelular. l) patrón difuso. CIN 3#12: ectocérvix. CIN 3#21: zona de transformación. CIN 3#23: epitelio de unión.

P16INK4

Este marcador inmunohistoquímico presenta perfiles de sensibilidad similares a los test VPH y una mayor especificidad, sobre todo para las lesiones displásicas, ya que no se expresa en la mayoría de lesiones reactivas (cervicitis, atrofia...)⁽²¹⁾. Esto le convierte en un discriminador de las lesiones de bajo grado susceptibles de progresar y, por tanto, con necesidad de un seguimiento y evaluación con otras pruebas. Esta elevada sensibilidad y especificidad, además, es especialmente útil en la detección de neoplasias intraepiteliales de alto grado ocultas en muestras de citologías atípicas o de bajo grado⁽⁴⁾. Los estudios hasta la fecha han demostrado que la expresión simultánea de los biomarcadores *p16INK4a/Ki-67* es característica de células epiteliales transformadas por VPH alto grado (VPH-AR), esta metodología podría ser utilizada para detectar pacientes con lesiones neoplásicas en cuello uterino, ocultas, que aún no han sido diagnosticadas o han pasado inadvertidas⁽⁴⁾. La tinción dual p16/ki67 en citología tienen una sensibilidad del 100% y un VPN del 100% para CIN 3, superior a la de los test ADN virus y, por este motivo, se ha abogado por utilizar esta tinción dual como alternativa en el triaje de las lesiones ASC-US y LSIL.

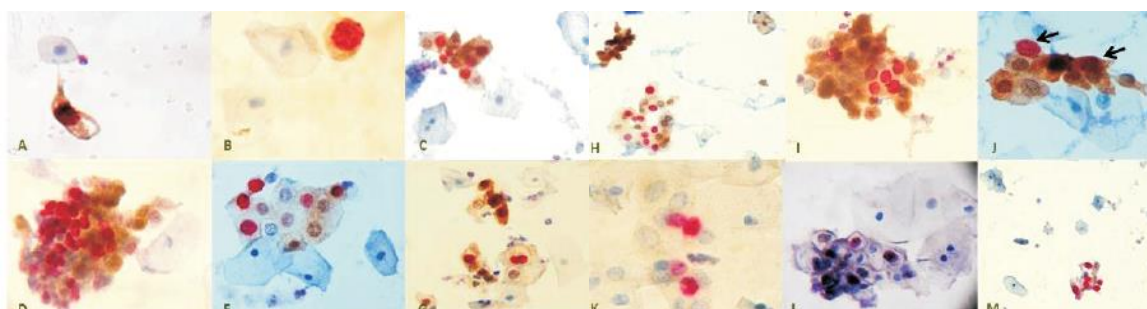


Imagen 17⁽⁴⁾. Tinción dual para *p16INK4a/Ki-67*. Contratinción con Hematoxilina de Harris. Un resultado positivo está representado por al menos una célula epitelial con doble inmunoreactividad: citoplasma de color marrón que indica sobreexpresión de la proteína *p16INK4a* y el núcleo rojo con expresión del antígeno de proliferación celular *Ki-67*, con independencia de la morfología: (A: célula metaplásica inmadura atípica y B: célula basal maligna), 40X. C: Células metaplásicas inmaduras atípicas sin posibilidad de descartar una lesión de alto grado (ASC-H), 20X. D: Células metaplásicas inmaduras atípicas, 40X. E: Células intermedias discarióticas (LSIL), 40X. F: Coilocitos con positividad para *p16INK4a/Ki-67* y tres células inmaduras atípicas con intensa sobreexpresión de *p16INK4a*, a nivel nuclear y citoplasmático (LSIL20X. G: Células intermedias atípicas de significado incierto (ASC-US), 10X. H: ASC-H, 40X. I: ASC-H 40X. En la parte superior las flechas señalan dos células con inmunoreactividad positiva para p16INK4a/Ki-67. El resto de las células epiteliales son sólo reactivas ante el anticuerpo contra *p16INK4a*, 40X. Resultados inmuno-negativos para tinción dual *p16INK4a/Ki-67* en células epiteliales del cuello uterino (J-L): J: ASC-US, 40X; K: LSIL (coilocito), 40X; L: ASC-H, 10X.

P16INK4 Y SU PAPEL EN EL PRONÓSTICO DE LAS LESIONES PREMALIGNAS

Como se ha dicho anteriormente, la variabilidad interobservador es mayor en las lesiones de malignidad intermedia y, por este motivo, el papel de este marcador ha cobrado mucha importancia dadas sus sensibilidad y especificidad para lesiones \geq CIN 2. A continuación, se recogen

en la **Tabla 7** los datos de sensibilidad y especificidad para la inmunotinción p16INK4 de distintos estudios, tanto para CIN 2+ como para CIN3:

Estudio	Año	Para CIN 2+		Para CIN 3	
		Sensibilidad (IC)	Especificidad (IC)	Sensibilidad (IC)	Especificidad (IC)
Benczik et al. ⁽⁴⁵⁾	2015	75.5% (67-81.1)	68.1% (62.6-73)	-	-
Benevolo et al. ⁽²¹⁾	2010	96%	66%	-	-
Bergueron et al. ⁽⁴⁶⁾	2014	88% (80-94)	61% (57-64)	91% (77-97)	59% (55-63)
Galgano et al. ⁽²¹⁾	2010	87%	83%	99%	74%
Guo et al. ⁽²¹⁾	2011	79%	85%	90%	71%
Hariri y Osler et al. ⁽²¹⁾	2007	100%	72%	-	-
Indarti et al. ⁽⁴⁷⁾	2013	87.50%	95.80%	-	-
Klaes et al. ⁽²¹⁾	2002	100%	71%	100%	62%
Kong et al. ⁽²¹⁾	2007	82%	100%	-	-
Ordi et al. ⁽²¹⁾	2009	99%	89%	-	-
Waldstrøm et al. ⁽⁴⁸⁾ (p16INK/ki67)	2012	92%			
Wang et al. ⁽²¹⁾	2004	81%	95%	100%	95%

Tabla 7. Resumen de la sensibilidad y especificidad de la tinción inmunohistoquímica p16INK4 para lesiones CIN 2 y CIN 3 en diferentes estudios.

Además de este papel diagnóstico, se ha estudiado su posible utilidad en el pronóstico tanto de las lesiones preneoplásicas como neoplásicas. Ya en el año 2007 y 2010, respectivamente, Hariri et al. y Del Pino et al.⁽¹³⁾ analizaban el valor predictivo de la determinación de p16INK4 en lesiones intraepiteliales de bajo grado y en ambos trabajos las lesiones que presentaban negatividad tenían una mínima capacidad de progresión y sólo un pequeño porcentaje progresaron.

A pesar de que el diagnóstico de carcinoma invasor se basa en criterios morfológicos algunas circunstancias pueden dificultar el diagnóstico con estos criterios, con lo que las técnicas inmunohistoquímicas pueden ser de gran utilidad en estas situaciones. Tanto la tinción con citoqueratinas como con p16INK4 son útiles en la confirmación de invasión, pues permite poner de manifiesto focos invasivos que hayan podido pasar desapercibidos al patólogo, así como proporcionar información acerca del pronóstico de las lesiones^(13,43).

SURVIVINA⁽²⁴⁾

La survivina es un miembro de la familia de los inhibidores de la apoptosis que se encuentra expresada en muchos cánceres y su expresión se traduce en una condición desfavorable en la evolución neoplásica. Diferentes estudios a lo largo del tiempo han publicado la expresión de este marcador en lesiones precursoras de cáncer cervical, con una variabilidad en ésta de entre el 40

y el 100%. Fan et al. 2017 recoge datos de distintos artículos y concluye que la expresión de survivina es significativamente mayor en tejidos neoplásicos o CIN frente a tejidos normales o con alteración morfológica no neoplásica; esto es, sugiere una correlación significativa de la expresión de survivina y la patogénesis del cáncer de cérvix. Sin embargo, al parecer, el significado de su expresión es diferente en función de la etnia, así pues, en etnia asiática su expresión está asociada con un riesgo aumentado de cáncer, pero no es así en la raza caucásica o, al menos, no ha sido demostrada su relación todavía. Por tanto, ante los resultados obtenidos solo se puede afirmar que la positividad para survivina es indicativa de progresión de las lesiones CIN en la población asiática.

Por último, la expresión de survivina sí que se correlaciona con el grado tumoral y con el estadio, siendo más significativa en las lesiones de alto grado y cánceres avanzados frente a los estadios iniciales. Asimismo, su positividad es más intensa en ganglios linfáticos de origen metastásico que en los no metastásicos. Estos resultados, al igual que en el caso de VEGFR, sugieren la existencia de una posible diana terapéutica en la expresión de survivina.

OTROS MARCADORES

Además de los anteriormente citados, existen otros marcadores que, en los últimos años y recientemente, se han investigado con el objetivo de descubrir nuevas dianas terapéuticas y métodos diagnósticos, así como de profundizar en el estudio de su correlación con la supervivencia a largo plazo y libre de enfermedad.

Algunos ejemplos de estos avances son el aumento en la expresión de Notch-1 y ciclina D1 y la reducción en la expresión de β catenina en cánceres invasivos frente a cánceres localizados, sugiere la implicación de estas proteínas en el proceso de invasión estromal⁽⁴⁹⁾. Lo mismo ocurre con la ciclina dependiente de kinasa 5, que se encuentra sobreexpresada en tejidos neoplásicos, siendo esta sobreexpresión mayor conforme aumenta el grado de malignidad⁽⁵⁰⁾.

De la misma manera que ocurre con la survivina, la expresión de psoriasina (S100A7) se correlaciona con el tipo y grado histológico tumoral y está presente en los ganglios linfáticos metastásicos más intensamente que en los no metastásicos⁽⁵¹⁾.

En lo que respecta al pronóstico, algunos marcadores han cobrado más importancia que otros en los últimos años. Destacan los receptores de factores de crecimiento fibroblástico (FGFR) que presentan correlación con la expresión de ARNm viral, así como con mejor pronóstico y menor agresividad⁽⁵²⁾ (sobre todo FGFR2, FGFR3 y FGFR4); y la proteína tirosin-kinasa 6, cuya sobreexpresión se correlaciona también con menor supervivencia⁽⁵³⁾.

NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Además de las técnicas inmunohistoquímicas, existen otras vertientes de investigación diagnósticas del cáncer cervical. En Bruselas se diseñó un microscopio digital holográfico que, acompañado de un software, permite reconstruir imágenes en tres dimensiones de las células del

epitelio cervicouterino. Desde el punto de vista tecnológico, el sistema consiste en un análisis de la luz emitida por las células y la creación de una imagen celular a partir de dicha luz (**Imágenes 18 y 19**).

La estructura interna diferenciada de las células neoplásicas se está utilizando para establecer criterios holográficos en la evaluación y análisis de células cervicales, así como para averiguar su utilidad en el diagnóstico diferencial de CIN 1, CIN 2, CIN 3 y ASC-US.

La principal ventaja es la posibilidad de medir parámetros celulares de forma más objetiva y automatizada, lo que podría incrementar la sensibilidad de la citología⁽⁵⁴⁾. De la misma manera, la microscopía holográfica podría disminuir la variabilidad interobservador, sobre todo en resultados citológicos ASC-US y ASC-H⁽⁵⁴⁾.

Los hologramas obtenidos se visualizan con microscopios potentes y analizan célula por célula. Aunque es necesario profundizar en este proyecto y esclarecer cuáles son los parámetros (para ello se requieren más investigaciones), los datos aportados por Benzerfjeb 2016 et al.⁽⁵⁴⁾ sugieren un futuro prometedor y esta técnica podría ser adecuada para la evaluación de muestras citológicas cervicales.

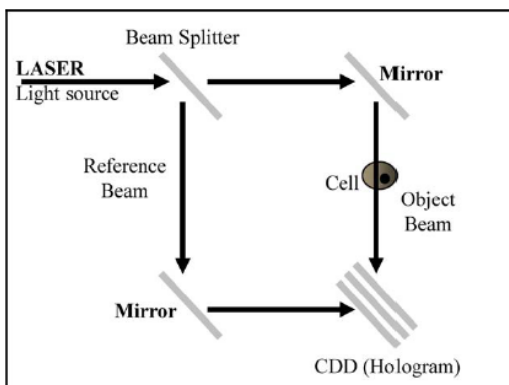


Imagen 18⁽⁵⁴⁾. Tecnología de la microscopía holográfica digital. La fuente de luz es un láser que emite una longitud de onda de 532 nm. El láser se divide en dos haces por un divisor de haces (beam-splitter) y las diferencias en las características entre los dos haces son observadas en escalas de grises que, posteriormente, servirán para hacer la imagen holográfica.

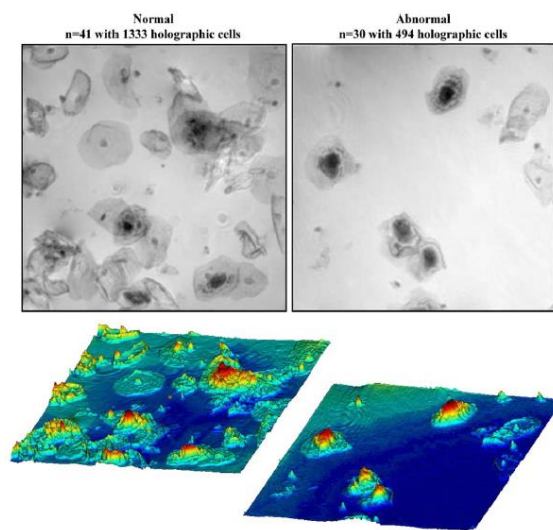


Imagen 19⁽⁵⁴⁾. Ejemplos de células holográficas en la parte superior y sus correspondientes imágenes en tres dimensiones. A la izquierda se observa una muestra normal y a la derecha una muestra anormal.

DISCUSIÓN

El mayor hito en la historia del manejo diagnóstico y terapéutico del cáncer de cérvix fue el descubrimiento de la implicación de algunos virus del papiloma humano en la génesis y progresión de esta neoplasia. Este hecho supuso un cambio radical en la concepción de esta patología y permitió desarrollar nuevos protocolos de diagnóstico y tratamiento, así como medidas de prevención primaria (vacunación). Asimismo, el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular (detección de ADN viral) tuvo un gran impacto en los métodos de cribado poblacional ya que la presencia de VPH en el canal cervical es una causa necesaria (aunque no suficiente) en la carcinogénesis de la neoplasia epitelial de cuello de útero.

Análisis estadístico

En este trabajo se pretende justificar desde los puntos de vista estadístico y anatomopatológico el papel de la citología y la biopsia cervicovaginales en la detección precoz de neoplasias intraepiteliales. Los resultados obtenidos presentan una sensibilidad mayor estadísticamente significativa ($p=0.0007$) en el uso de las técnicas de detección viral con captura de híbridos frente a la citología para lesiones CIN2+, mientras que para lesiones mayores (CIN 3) no existen tales diferencias. Esto último puede deberse a que, a medida que las lesiones aumentan en grado, la concordancia interobservador en la interpretación morfológica de la citología es mayor y, por tanto, su sensibilidad no difiere de forma estadísticamente significativa de la de las pruebas de ADN viral.

En lo que respecta a la especificidad, los resultados obtenidos muestran significancia estadística a favor de la citología ($p=0.0003$). Estas diferencias se explican porque, desde el punto de vista morfológico, puede existir infección por VPH y no existir lesión anatomopatológica asociada, como es el caso de las mujeres menores de 30 años (en las que existe mayor prevalencia de VPH). Por este motivo y dado que en las mujeres más jóvenes es más frecuente la infección por VPH por el mayor número de relaciones sexuales, si se empleara como método de cribado la detección del ADN viral, la cantidad de falsos positivos sería muy alta y clasificaría en alto riesgo a mujeres que, de forma natural, van a eliminar el virus sin dejar ninguna lesión asociada.

En la comparación por separado de ambas citologías con las pruebas de detección viral, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando la comparación se hizo con la citología convencional (en la sensibilidad, a favor de la captura de híbridos $p<0.0001$ y, en la especificidad, a favor de la citología $p<0.02$) y no para la citología en base líquida. A pesar de estas diferencias entre los dos tipos de citología, no se encontraron diferencias significativas entre ambas ($p=0.06$ para la sensibilidad y $p=0.51$ para la especificidad). Sin embargo, la preferencia de una sobre otra se debe a que el número de citologías insatisfactorias es mayor en los extendidos convencionales⁽¹³⁾ y la CBL es más efectiva a la hora de diagnosticar ASC⁽⁵⁵⁾, así como de lesiones inespecíficas y sospechosas de alto grado de malignidad (ASC-H)⁽¹³⁾. Además, la CBL permite, con la misma muestra, analizar la presencia de VPH.

Inmunohistoquímica y concordancia diagnóstica

Están en auge las nuevas técnicas inmunohistoquímicas que, en parte, tratan de reducir la variabilidad interobservador y aumentar la exactitud diagnóstica, mejorando de esta manera el manejo de las mujeres con neoplasia epitelial de medio y alto grado y clasificándolas en función de la existencia o no de riesgo de progresión. La más utilizada y estudiada hasta el momento es la proteína p16INK4, cuya positividad se considera factor de riesgo para la progresión y recurrencia de las lesiones. Además, presenta una sensibilidad similar a la detección de ADN viral y una mayor especificidad, siendo útil en el diagnóstico de lesiones incipientes y pequeñas y en el aumento del grado de concordancia diagnóstica⁽²¹⁾.

Asimismo, el papel de estos biomarcadores es la constitución de posibles dianas terapéuticas que supongan una mejoría en el tratamiento y pronóstico de las lesiones, disminuyendo los efectos secundarios de los tratamientos actuales que son menos específicos y más agresivos (cirugía y quimiorradioterapia).

Puntos fuertes y débiles del estudio

En el análisis de los resultados estadísticos obtenidos hay que tener en cuenta algunas limitaciones y puntos fuertes del estudio. En primer lugar, los estudios que aportaban directamente la sensibilidad y la especificidad de las pruebas fueron descartados, evitando que el método de cálculo y la muestra para hacer los forest plot fuese diferente a las calculadas y pudiera interferir en la exactitud de los resultados finales. En segundo lugar, como se observa en los forest plot, la heterogeneidad de los estudios es considerable y, para tenerla en cuenta durante el análisis y disminuir los sesgos, se utilizó el modelo de análisis randomizado (random effects). Con este método se pretende disminuir la heterogeneidad que pudiera existir entre los distintos estudios. En tercer lugar, a pesar de que dos de los ocho estudios utilizaban un método de detección viral diferente de la captura de híbridos, se piensa que esto no ha interferido en los resultados finales pues, cuando se eliminaban de los forest plots las diferencias seguían siendo estadísticamente significativas.

Por otro lado, en la comparación de biopsia y pieza de conización se consideró esta última como control, de manera que se obviaron posibles falsos negativos y positivos. Sin embargo, lo importante de esto no es tanto si existen o no diferencias significativas sino la concordancia de ambas piezas de biopsia que, dados los resultados, se puede concluir que en muchos casos no es tan buena como cabría esperar^(14, 24). Esta concordancia media, se explica por aspectos de temporalidad (tiempo que pasa desde el diagnóstico por biopsia hasta el tratamiento) y porque la toma de biopsia puede suponer en sí mismo la escisión completa de todos los focos lesionales.

En lo que respecta a las técnicas inmunohistoquímicas, se hizo una selección de las más actuales y más utilizadas, dejando muchas sin mencionar, pues constituyen una larga lista con tendencia a aumentar. Además, se requieren más estudios y cohortes mayores que permitan establecer unos criterios diagnósticos específicos y determinar los límites de normalidad, así como el grado de positividad para los marcadores que constituye en sí mismo un alto riesgo de progresión, recurrencia y persistencia de enfermedad.

CONCLUSIONES

La incorporación al cribado de los tests virales, ha supuesto una mayor detección de casos por su sensibilidad significativamente superior. Aun así, el diagnóstico de confirmación por biopsia (estándar de oro) todavía está sujeto a una importante variabilidad interobservador que influye directamente en la exactitud diagnóstica y en la realización de seguimiento a mujeres que no lo requieren. Con todo lo anterior, las conclusiones extraídas del trabajo han de ser evaluadas atendiendo a los límites citados en la discusión:

- La sensibilidad de las pruebas de ADN viral con HC2 es superior a la citología de forma estadísticamente significativa para detectar lesiones CIN 2/2+, con lo que queda justificado su uso como primera línea de cribado.
- Cuando las citologías se estudian por separado, la sensibilidad de las pruebas de ADN viral con HC2 es superior a la CC de forma estadísticamente significativa para detectar lesiones CIN 2/2+ y es mayor que la CBL en la detección de CIN 2/CIN 3 (aunque sin significancia estadística).
- La especificidad de la citología es superior a las pruebas de ADN con HC2 de forma estadísticamente significativa para detectar lesiones CIN 2/2+, por lo que se usa en el cribado en mujeres menores de 30 años en las que la prevalencia de infección por VPH es mayor y como prueba de confirmación.
- No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ni en la sensibilidad ni en la especificidad de la CBL frente a la CC, sin embargo, la CBL presenta menor porcentaje de citologías insatisfactorias que la CC y permite la detección del virus.
- La variabilidad interobservador es menor en los extremos diagnósticos (normalidad y CIN 3/cáncer in situ) y existe una posibilidad de disminuirla con los biomarcadores y la inmunotinción.
- La inmunohistoquímica supone un futuro prometedor en el diagnóstico y predicción de progresión de las lesiones preneoplásicas y recidiva tumoral, así como en la constitución de dianas terapéuticas que mejoren el tratamiento de las mujeres afectadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rivera RZ, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus de papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2006; 71(2): 135-140.
2. Contreras R. Papanicolaou y citología líquida en diagnóstico de cáncer de cérvix. Hospital Civil de Maracay. 2012. *Comunidad y Salud.* 2015; 13 (1): 12-22.
3. Bergeron C, von Knebel M. The Role of Cytology in the 21st Century: The Integration of Cells and Molecules. *Acta Cytol.* 2016; 60:540-542.
4. Toro de Méndez M, Ferrández A, Llombart-Bosch A. Tinción dual inmunocitoquímica de p16^{INK4}/Ki-67 para la detección de lesiones del cuello uterino asociadas a la infección por el virus del papiloma humano. *Invest Clin.* 2014; 55(3): 238 – 248.
5. Pandhi D, Bisherwal K, Signal A, Guleria K, Mishra K. p16 immunostaining as a predictor of anal and cervical displasia in women attending a sexually transmitted infection clinic. *Indian J Sex Transm Dis.* 2016; 37(2): 151–156.
6. Lee H et al. HPV Infection and p16 Promoter Methylation as Predictors of ASC-US/LSIL Progression. *Cancer Cytopathol.* 2016.
7. Benczik M et al. Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res.* 2015.
8. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytol.* 2015; 59: 121-132.
9. Gilani SM, Mazzara PF. Cytohistologic Correlation in Premenopausal and Postmenopausal Women. *Acta Cytol.* 2013;57:575-580.
10. Abali R, Bacanakgil BH, Çelik S, Aras Ö, Koca P, Boran B, Dursun N. Histopathological Correlation of Squamous Cell Abnormalities Detected on Cervical Cytology. *Turkish Journal of Pathology.* 2011; 27(2):144-148.
11. Tanabodee J et al. Comparison of Efficacy in Abnormal Cervical Cell Detection between Liquid-based Cytology and Conventional Cytology. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16 (16): 7381-7384.
12. French DP, Maissi E, Marteau TM. Psychological costs of inadequate cervical smear test results. *Br J Cancer.* 2004; 91: 1887–92.
13. Haghighi F et al. A comparison of liquid-based cytology with conventional Papanicolaou smears in cervical displasia diagnosis. *Adv Biomed Res.* 2016; 5: 162.
14. Extraído de: [lainformacion.com](http://www.lainformacion.com), Identificar el genotipo del virus del papiloma que causa lesiones uterinas permite determinar el riesgo de cáncer. Barcelona: Europa Press; 2014. Disponible en: <http://www.lainformacion.com>.
15. Spinoso V, Muniesa JA. El virus del papiloma humana: ¿un enemigo vencido?. *Boletín Oncológico.* 2008. Disponible en: <http://www.boloncol.com/boletin-25/el-virus-de-papiloma-humano-un-enemigo-vencido.html>
16. Muñiz N, Fernández E, Escobar J, González LO. Revisión de la categoría citológica “ASCUS” en el Hospital de Jove. En: VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet. Castilla La Mancha; 2005. Disponible en: http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajo=325.
17. Extraído de: Ciclo Formativo de Grado Superior en Anatomía. Disponible en: <https://www.flickr.com/photos/citologiaopsa/>.
18. Kabaca C et al. Is Cervical Punch Biopsy Enough for the Management of Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2014; 18 (3): 240-245.
19. Kumar et al. *Robbins Basic Pathology.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2009.
20. Gómez R. Virus Papiloma Humano VPH, cérvix. *Ginecoweb*; [acceso 3 mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.ginecoweb.com/0vphcervical.html>.
21. Torres Gómez FJ. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológica y en el manejo de las lesiones del cuello uterino. *Rev Esp Patol.* 2012; 45(2): 86-95.

22. Cavalcante DM et al. The utility of p16^{INK4a} and Ki-67 to identify high-grade squamous intraepithelial lesion in adolescents and young women. *Indian J Pathol Microbio.* 2012; 55 (3): 339-342.
23. Zhang H, Zhang S. The expression of Foxp3 and TLR4 in cervical cancer: association with immune escape and clinical pathology. *Arch Gynecol Obstet.* 2016; 295 (3): 705-712.
24. Fan Y, Chen J. Clinicopathological significance of survivin expression in patients with cervical cancer: A systematic meta-analysis. *Bioengineering.* 2016; 0(0): 1-13.
25. Agorastos T, Chatzistamatiou K, Katsamagkas T, Koliopoulos G, Daponte A, Constantinidis T, Constantinidis TC et al. Primary Screening for Cervical Cancer Based on High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Detection and HPV 16 and HPV 18 Genotyping, in Comparison to Cytology. *PLoS ONE.* 2014; 10 (3).
26. Alaghebandan R, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Lear A, Coutlee F, Raynam S. Performance of ProEx C and PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA Tests in Comparison With the Hybrid Capture 2 HPV DNA Test for Triaging ASCUS and LSIL Cytology. *Diagn Cytopathol.* 2013; 41(9): 767-775.
27. Blatt AJ, Kennedy R, Luff RD, Marshall R, Rabin DR. Comparison of Cervical Cancer Screening Results Among 256,648 Women in Multiple Clinical Practices. *Cancer Cytopathol.* 2015.
28. Mahmud SM, Sangwa-Lugoma G, Nasr SH, Kayembe Pk, Tozin RR, Drouin P, Lorincz A, Ferenczy A, Franco EL. Comparison of human papillomavirus testing and cytology for cervical cancer screening in a primary health care setting in the Democratic Republic of the Congo. *Gynecol Oncol.* 2012; 124: 286-291.
29. Nijhawan R, Mittal N, Suri V, Rajwansi A. Enhancing the Scope of Conventional Cervical Cytology for Detecting HPV Infection. *Diagn Cytopathol.* 2010; 38(9): 645-651.
30. Rodríguez-Manfredi A, Alonso I, del Pino M, Fusté P, Torné A, Ordi J. Predictors of absence of cervical intraepithelial neoplasia in the conization specimen. *Gynecol Oncol.* 2013; 128: 271-276.
31. Song SH et al. Clinical performance assessment of five human papillomavirus DNA tests using liquid-based cytology samples. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012; 38(2): 408-414.
32. Wojciech R et al. Comparison of the effectiveness of cytodiagnosics, molecular identification of HPV HR and CINtecPLUS™ test to identify LG SIL and HG SIL. *Ginekol.* 2012; 83: 894-898.
33. Jesdapatarakul S, Tangjitgamol S, Nguansangiam S, Manusirivithaya S. Liqui-Prep® Versus Conventional Papanicolaou Smear to Detect Cervical Cells Abnormality by Split-Sample Technique: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Diagn Cytopathol.* 2010; 39(1): 22-27.
34. Karimi-Zarchi M, Peighambari F, Karimi N, Rohi M, Chiti Z. A Comparison of 3 Ways of Conventional Pap Smear, Liquid-Based Cytology and Colposcopy vs Cervical Biopsy for Early Diagnosis of Premalignant Lesions or Cervical Cancer in Women with Abnormal Conventional Pap Test. *Int J Biomed Sci.* 2013; 9(4): 205-210.
35. Tanabodee J et al. Comparison of Efficacy in Abnormal Cervical Cell Detection between Liquid-based Cytology and Conventional Cytology. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(16): 7381-7384.
36. Basu P et al. Interobserver Agreement in the Reporting of Cervical Biopsy Specimens Obtained From Women Screened by Visual Inspection With Acetic Acid and Hybrid Capture 2. *Int J Gynecol Pathol.* 2013; 32 (5): 509-515.
37. Placidi A, Capparucci P, Di Luzio A, Manca G, Mania E, Filippini T, Rossi PG. Team Reading (Peer Review) of Suspicious/Positive Slides for Continuous Quality Improvement in Cervical-Vaginal Cytology: A Comparison between Methods and Indicators. *Acta Cytol.* 2016; 60: 458-464.
38. Stoler et al. The Interpretive Variability of Cervical Biopsies and Its Relationship to HPV Status. *Am J Surg Pathol.* 2015; 39: 729-736.
39. Belfort-Mattos PN et al. Immunohistochemical Expression of VEGF and Podoplanin in Uterine Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *Dis Markers.* 2016; 1-8.
40. Dang et al. High VEGFR1/2 expression levels are predictors of poor survival in patients with cervical cancer. *Medicine.* 2017; 96: 1.

41. Zhang L, Chen Q, Hu J, Chen Y, Liu C, Xu C. Expression of HIF-2 α and VEGF in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance. *Biomed Res Int*. 2016.
42. Chen Y, Wang H, Lin W, Shuai P. ADAR1 overexpression is associated with cervical cancer progression and angiogenesis. *Diagn Pathol*. 2017; 12: 12.
43. Lee H, Lee H, Kyun Y. Cytokeratin7 and cytokeratin19 expression in high grade cervical intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma and their possible association in cervical carcinogenesis. *Diagn Pathol*. 2017; 12:18.
44. Paquette C, Mills AM, Stoler MH. Predictive Value of Cytokeratin 7 Immunohistochemistry in Cervical Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion as a Marker for Risk of Progression to a High-grade Lesion. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40(2): 236-243.
45. Benczik et al. Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res* 2015.
46. Bergueron et al. The clinical impact of using p16INK4a immunocytochemistry in cervical histopathology and cytology: An update of recent developments. *Int J Cancer*. 2015; 136: 2741-2751.
47. Indarti J, Fernando D. Comparison of p16INK4a Immunocytochemistry with the HPV Polymerase Chain Reaction in Predicting High Grade Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14 (9): 4989-4992.
48. Waldstrøm et al. Evaluation of p16INK4a/Ki-67 Dual Stain in Comparison With an mRNA Human Papillomavirus Test on Liquid-Based Cytology Samples With Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *Cancer Cytopathol*. 2012.
49. Myong NH. Altered expressions of Notch-1 signaling proteins and beta-catenin in progression of carcinoma *in situ* into squamous carcinoma of uterine cervix. *Indian J Pathol Microbio*. 2017; 60(1): 21-26.
50. Pan DH et al. Evaluation and clinical significance of cyclin-dependent kinase5 expression in cervical lesions: a clinical research study in Guangxi, China. *Eur J Med Res*. 2016; 21:28.
51. Tian T et al. S100A7 promotes the migration, invasion and metastasis of human cervical cancer cells through epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2017: 1-14.
52. Choi CH, Chung JY, Kim JH, Kim BG, Hewitt SM. Expression of fibroblast growth factor receptor family members is associated with prognosis in early stage cervical cancer patients. *J Transl Med*. 2016; 14:124.
53. Wang X-J, Xiong Y, Ma Z-B, Xia J-C, Li Y-F. The expression and prognostic value of protein tyrosine kinase 6 in early-stage cervical squamous cell cancer. *Chin J Cancer*. 2016; 35:54.
54. Benzerdjeb N, Garbar C, Camparo P, Sevestre H. Digital Holographic Microscopy as Screening Tool for Cervical Cancer Preliminary Study. *Cancer Cytopathol*. 2016.
55. Lee JD et al. Comparison of Diagnostic Cytomorphology of Atypical Squamous Cells in Liquid-Based Preparations and Conventional Smears. *Korean J Pathol*. 2012; 46: 365-369.

ANEXO 1

Primera búsqueda realizada en enero de 2017:

(Biopsy OR colposcopy OR cervical conization OR conization) AND (Pap OR Papanicolaou* OR pap smear OR cervical smear) AND (squamous intraepithelial lesion* OR cervical dysplasia OR cervix dysplasia OR LSIL OR HSIL OR atypical squamous cells of cervix OR ASC-H OR ASC-US OR cervical intraepithelial neoplasia OR CIN I OR CIN II OR CIN III OR histopathology OR cytohistological) AND (correlation OR comparison)

Figura 1

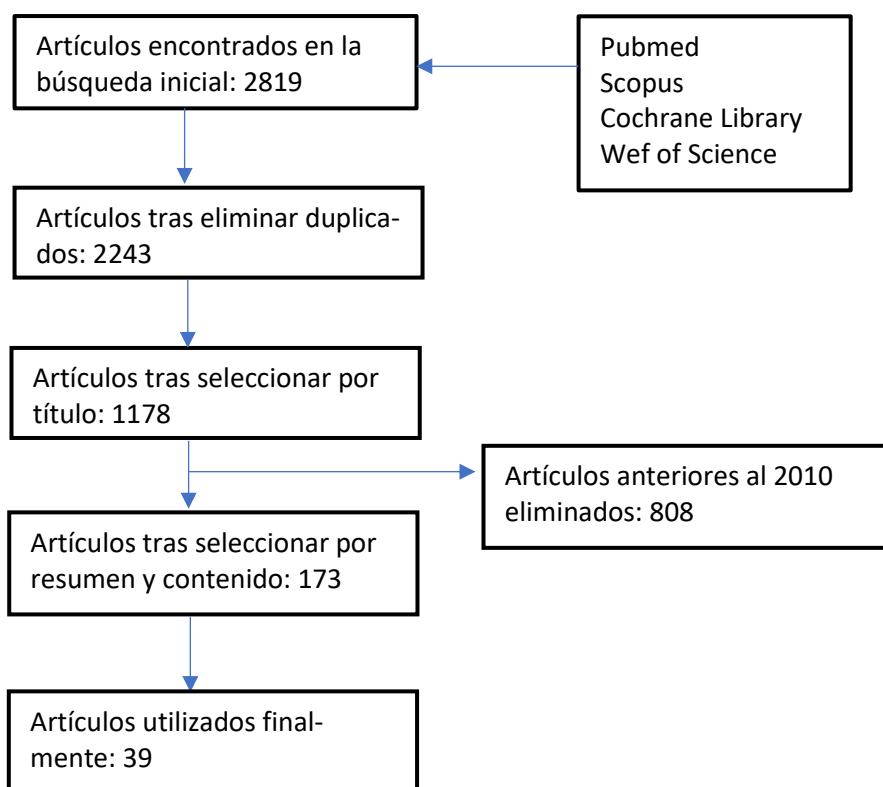


Figura 2

Segunda búsqueda realizada en marzo de 2017:

(p16INK OR immunohistochemistry OR survivin OR ADAR1) AND (cervical neoplasm OR premalignant cervical lesion)

