



Universidad
de Navarra

Facultad de Medicina

TESIS DOCTORAL

**Utilidad de p16/ki67 para la detección de lesiones precursoras y
cáncer de cérvix en mujeres con VPH de alto riesgo en Navarra**

Carolina Areán Cuns

Directora:

Dra. María Dolores Lozano Escario

Codirectora:

Dra. Alicia Córdoba Iturriagoitia

Pamplona, 2021



Universidad
de Navarra

Facultad de Medicina

Dña. MARÍA DOLORES LOZANO ESCARIO, profesora titular del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, y Dña. ALICIA CÓRDOBA ITURRIAGAGOITIA, médico adjunto y colaboradora docente del Departamento de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Navarra,

CERTIFICAN:

Que el trabajo: *Utilidad de p16/ki67 para la detección de lesiones precursoras y cáncer de cérvix en mujeres con VPH de alto riesgo en Navarra*, presentado por Dña. Carolina Areán Cuns como tesis doctoral, ha sido realizado bajo su dirección en la Universidad de Navarra.

Y para que así conste, firman la presente:

Fdo. Dra. M.^a Dolores

Lozano Escario

Fdo. Dra. Alicia Córdoba

Iturriagoitia

Pamplona, 2021.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han ayudado a que esta tesis doctoral sea posible, en especial:

A Mercedes Santamaría, por su dedicación y su trabajo activo en la Sección de Citopatología del Complejo Hospitalario de Navarra, lo que ha hecho posible la elaboración de esta tesis doctoral.

A M.^a Dolores Lozano y Alicia Córdoba, por su activa colaboración y su excelente disposición para que el proyecto saliera adelante.

A María Mercado, Irene Paniello y Fermín Mallor, por su valiosa contribución en la elaboración de este trabajo.

A Elena Almudévar, Rosa Guarch, Óscar Manzanilla, por su oportuno asesoramiento.

A mis compañeros Teresa Íscar, Julián Sanz y Pilar Ferrer, por su ayuda, asesoramiento y palabras de ánimo en los momentos difíciles.

A los técnicos del Departamento de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Navarra, por su valiosa contribución con la preparación de las muestras.

A mi esposo, por su infinita paciencia y empatía.

Al resto de mi familia, por estar siempre.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	3
1.1.1. Epidemiología del cáncer de cérvix.....	3
1.1.2. Factores de riesgo.....	3
1.1.3. Generalidades de la infección por el VPH.....	3
1.1.4. Aspectos moleculares del VPH y de la evolución de la infección.....	5
1.1.5. Aspectos anatómicos e histológicos del cérvix y evolución de las LP.....	8
1.1.6. Aspectos citológicos.....	11
1.1.7. El cribado del CC.....	16
1.1.8. Prueba de tinción dual p16/ki67.....	20
1.2. Estado de la cuestión y práctica actual.....	23
2. Hipótesis.....	25
3. Objetivos.....	29
3.1. Objetivo principal.....	31
3.2. Objetivos secundarios.....	31
4. Material y métodos.....	33
4.1. Selección de casos.....	35
4.2. Recogida de información.....	35
4.3. Estudio citológico.....	36
4.3.1. Fase preanalítica.....	36
4.3.2. Fase posanalítica.....	37
4.4. Prueba de detección del VPH-AR.....	37
4.4.1. Fase preanalítica.....	37
4.4.2. Fase posanalítica.....	39
4.5. Estudio inmunocitoquímico TDC p16/ki67.....	41
4.5.1. Fase preanalítica.....	41
4.5.2. Fase posanalítica.....	42
4.6. Estudio histológico.....	42
4.6.1. Fase preanalítica.....	42
4.6.2. Fase posanalítica.....	43
4.7. Análisis estadístico.....	43
5. Resultados.....	45
5.1. Descripción general.....	47
5.1.1. Edad.....	48
5.1.2. Resultados citológicos globales.....	49

5.2. Mujeres con resultado positivo para la prueba de detección de ADN del VPH.....	50
5.2.1. Edad.....	50
5.2.2. Grupos/MIX del VPH.....	51
5.2.3. Resultados citológicos.....	52
5.3. Mujeres con resultado negativo para la prueba de detección de ADN del VPH	53
5.3.1. Edad.....	53
5.3.2. Resultados citológicos.....	53
5.4. Tinción dual citológica p16/ki67.....	54
5.4.1. Resultados generales	54
5.4.2. Edad.....	55
5.4.3. Resumen de resultados citológicos	55
5.5. Biopsia.....	57
5.5.1. Tiempo transcurrido entre el diagnóstico citológico inicial y el diagnóstico histológico.....	57
5.5.2. Edad.....	57
5.5.3. Diagnósticos histológicos.....	58
5.5.4. Diagnóstico citológico inicial.....	59
5.5.5. Resultados de la TDC p16/ki67 y categorización según grupos de edades.....	60
5.5.6. Mujeres con resultado histológico de NIC2+	61
5.5.6.1. Edad.....	61
5.5.6.2. Resultados citológicos iniciales.....	62
5.5.6.3. TDC p16/ki67	63
5.6. Resultados integrados de la TDC p16/ki67, biopsia y citología inicial, en el subgrupo de mujeres VPH-positivas.....	64
5.7. Resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos	65
5.7.1. Citología sola.....	65
5.7.2. TDC p16/ki67	65
5.7.2.1. TDC p16/ki67 según las categorías citológicas	65
5.7.2.2. TDC p16/ki67 según grupo de edad	66
5.7.2.3. TDC p16/ki67 según grupo de edad y categoría citológica.....	66
5.7.3. TDC p16/ki67 vs. citología sola	67
6. Discusión	69
6.1. Papel de la TDC p16/ki67 como método de triaje secundario en mujeres VPH- positivas, residentes en Navarra	71
6.1.1. Inmunoexpresión de la TDC p16/ki67, según las diferentes categorías citológicas e histológicas.....	71
6.1.2. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67	71
6.1.3. Derivaciones a colposcopia-biopsia, citología sola vs. TDC p16/ki67.....	73
6.1.4. Posible limitación técnica de la TDC p16/ki67	74
6.1.5. Limitaciones de la citología convencional, como método de triaje secundario, en el contexto específico de resultados citológicos de NILM. Posible papel protagónico de la TDC p16/ki67	74

6.1.6. Posible papel de la TDC p16/ki67 como herramienta complementaria a la citología, en mujeres menores de 30 años, con diagnóstico citológico de ASCUS y LSIL	75
6.1.7. Importancia del muestreo adecuado en la toma de biopsia	76
6.2. Edad e infección por el VPH	76
6.3. Subtipos de VPH	76
6.4. Mujeres con resultado negativo para la prueba de detección del VPH	77
6.5. Limitaciones del estudio	77
6.6. Planteamiento de futuras líneas de trabajo	78
7. Conclusiones	79
Referencias.....	83

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CBL	Citología en base líquida
CC	Cáncer de cérvix
CCE	Carcinoma de células escamosas
CDK4	Ciclina inhibidora de quinasa 4
EEUU	Estados Unidos de América
Fab'	Fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos
FOZ	Valor de señal a ruido
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
FP	Casos falsos positivos
FN	Casos falsos negativos
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
IC	Intervalo de confianza
LP	Lesiones precursoras
LSIL	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC1	Neoplasia intraepitelial cervical 1
NIC2	Neoplasia intraepitelial cervical 2
NIC3	Neoplasia intraepitelial cervical 3
NIC2+	Resultado en biopsia de lesión escamosa intraepitelial de alto grado o carcinoma de células escamosas
NILM	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad
OCE	Orificio cervical externo
OMS	Organización Mundial de la Salud
pRB	Proteína de retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico

SIL	Lesión escamosa intraepitelial
TDC	Tinción dual citológica
UEC	Unión escamo-columnar
VN	Casos verdaderos negativos
VP	Casos verdaderos positivos
VPH	Virus del papiloma humano
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
ZT	Zona de transformación

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida del VPH en el epitelio escamoso del cérvix	6
Figura 2.	Representación esquemática de la evolución de la infección por el VPH con cambios moleculares e histológicos	7
Figura 3.	Imagen colposcópica del ectropión.....	9
Figura 4.	Representación esquemática de la zona de transformación (ZT)	9
Figura 5.	Microfotografías de la secuencia de cambios histológicos en el epitelio escamoso cervical	10
Figura 6.	Imágenes citológicas de distintas categorías diagnósticas.....	15
Figura 7.	Imágenes citológicas de distintas categorías diagnósticas (continuación).....	15
Figura 8.	Esquema de cribado del CC, según la <i>Guía de cribado del Cáncer de Cuello de Útero en España</i> del año 2014	18
Figura 9.	Esquema de cribado del CC, según el <i>Boletín Oficial del Estado</i> emitido el 27 de abril de 2019	19
Figura 10.	Representación esquemática simplificada del mecanismo celular, en la infección transformante por VPH-AR, que explica el fundamento de la expresión inmunohistoquímica de p16.....	21
Figura 11.	Positividad para la tinción dual citológica p16/ki67	22
Figura 12.	Esquema de la prueba de detección del VPH-AR Cervista™	39
Figura 13.	Esquema con posibles resultados (prueba Cervista™).....	40
Figura 14.	Esquema del total de mujeres y pruebas realizadas	47
Figura 15.	Estratificación de la muestra según grupos de edades	48
Figura 16.	Resultados citológicos generales.....	49
Figura 17.	Estratificación según grupos de edades de las mujeres con resultado positivo para la prueba de detección del VPH	50
Figura 18.	Grupo (MIX) de VPH responsable de la infección.....	51
Figura 19.	Relación de resultados citológicos (normales vs. anormales) en mujeres VPH-positivas.....	52
Figura 20.	Resultados citológicos, según resultados de la prueba de detección de VPH.....	53
Figura 21.	Porcentaje de resultados de la TDC p16/ki67 en la muestra	54
Figura 22.	Diagnóstico citológico en mujeres VPH-positivas con TDC p16/ki67 disponible, según el grupo de edad.....	55
Figura 23.	Resultados de la TDC p16/ki67, según el diagnóstico citológico	56
Figura 24.	Incremento de la positividad para la TDC p16/ki67, según la gravedad del diagnóstico citológico.....	57
Figura 25.	Resultados de la biopsia, según el grupo de edad.....	58
Figura 26.	Correlación entre el diagnóstico citológico inicial y el diagnóstico histológico.....	59

Figura 27. Resultados de la TDC p16/ki67, según el grupo de edad	60
Figura 28. Estratificación de resultados de las biopsias, según NIC2+ o <NIC2+.....	61
Figura 29. Estratificación de resultados de los diagnósticos citológicos iniciales en mujeres con NIC2+	62
Figura 30. Resultados de la TDC p16/ki67 en mujeres con NIC2+.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Fórmula de la tinción de Papanicolaou.....	13
Tabla 2.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67 para la detección de NIC2+ en el triaje de las mujeres VPH-positivas, entre las diferentes series.....	23
Tabla 3.	Información recogida en cada caso	36
Tabla 4.	Interpretación de resultados (prueba Cervista™)	41
Tabla 5.	Resultados de la TDC p16/ki67, según el diagnóstico citológico	56
Tabla 6.	Diagnóstico citológico en correlación con la biopsia, en mujeres con resultado positivo para la TDC p16/ki67	64
Tabla 7.	Diagnóstico citológico en correlación con la biopsia, en mujeres con resultado negativo para la TDC p16/ki67	64
Tabla 8.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la citología, según grupo de edad.....	65
Tabla 9.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, según las categorías citológicas.....	66
Tabla 10.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, según grupo de edad.....	66
Tabla 11.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, en mujeres ³ 35 años, según categoría citológica	67
Tabla 12.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, en mujeres <35 años, según categoría citológica.....	67
Tabla 13.	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la citología y de la TDC p16/ki67.....	67

1. Introducción

1.1. Antecedentes

1.1.1. Epidemiología del cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix (CC) es la tercera neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial¹. En Europa, se estima que ocurren aproximadamente 34 000 casos nuevos y 13 000 muertes por esta enfermedad anualmente², con unas cifras aproximadas en España de 2511 casos nuevos y 848 muertes al año¹. En Navarra, su incidencia es más baja que en el resto de España, con una tasa de incidencia ajustada de $3,8 \times 100\,000$ habitantes/año³.

A pesar de su baja incidencia en nuestro país, el CC tiene una especial relevancia e interés en el ámbito de la salud pública, dado su carácter prevenible, siendo posible reducir su incidencia y mortalidad de forma importante.

1.1.2. Factores de riesgo

Actualmente, los factores de riesgo reconocidos para el desarrollo de CC, según datos del TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) son los siguientes:

- *El virus de papiloma humano (VPH)*: implicado como el agente infeccioso etiológico primario de la práctica totalidad de los casos de CC.
- *Inmunosupresión*: se asocia a un incremento del riesgo de CC.
- *Inicio de la actividad sexual a temprana edad y tener un alto número de parejas sexuales*: ambos se asocian a un incremento de riesgo de infección por el VPH y, en consecuencia, con el potencial desarrollo de CC.
- *Alta paridad, uso de anticonceptivos orales durante largos períodos de tiempo y exposición al tabaco (activa o pasiva)*: todos estos se asocian a un incremento de riesgo para el desarrollo de CC, en mujeres infectadas por el VPH.
- *Exposición a diethylstilbestrol (DES)*: se asocia a un incremento de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma de células claras de cérvix.

1.1.3. Generalidades de la infección por el VPH

La evidencia científica existente, acerca de la fuerte implicación del VPH en el CC y en sus lesiones precursoras (LP), es amplia y sólida, señalándose que esta infección es un factor necesario, pero no suficiente para su desarrollo, existiendo otros eventos adicionales que condicionan el proceso evolutivo de la enfermedad⁴.

La mayor incidencia de infección por el VPH ocurre durante la adolescencia tardía o adultez temprana, coincidiendo con el inicio de la actividad sexual, siendo común la presencia de infecciones múltiples, concurrentes y secuenciales, por diferentes tipos oncogénicos de VPH^{1,5}. A partir de los 30 años de edad, hay una clara disminución de su prevalencia (al igual que de las coinfecciones), lo cual se ha atribuido al desarrollo de respuesta inmunológica contra el virus, que trae como consecuencia que más del 90 % de estas infecciones sean *transitorias* o autolimitadas, y por tanto, irrelevantes desde el punto de vista tumoral^{1,6-8}.

En muchas poblaciones, existe un segundo pico en la prevalencia de la infección por el VPH, después de los 45 o 50 años de edad, coincidiendo con la etapa perimenopáusicas⁶⁻⁷. Aunque no se conoce la causa de este hecho, se ha atribuido a dos mecanismos, que no son mutuamente excluyentes⁷:

- 1) *Reactivación de infecciones latentes*: a causa de una pérdida gradual de la inmunidad específica (celular y humoral) contra los tipos de VPH que causaron la infección inicial. Además, como consecuencia del envejecimiento, existe menor producción hormonal por parte de los ovarios, induciendo atrofia del epitelio escamoso cervical, con pérdida de glucógeno intracitoplasmático, haciéndolo más frágil y disminuyendo su capacidad protectora, ante cualquier noxa.
- 2) *Adquisición de nuevas infecciones*: los hábitos sexuales de la población han cambiado en las últimas décadas, lo cual puede haber modificado la exposición al VPH, a través del contacto con nuevas parejas sexuales en etapas más avanzadas de la vida⁷.

Cuando a una mujer se le detecta el mismo tipo de VPH en dos o más ocasiones, usualmente con un intervalo mínimo de 6 meses, se dice que tiene una infección *persistente*⁸. Este concepto tiene crucial relevancia, dado que el nuevo modelo de carcinogénesis del CC está enfocado en el factor *persistencia* de la infección por el VPH, como un elemento fundamental para el desarrollo de CC¹. Hoy en día se sabe que las pacientes con infecciones por algún VPH *de alto riesgo* (VPH-AR) (véase más adelante), que no involucionan espontáneamente después de 1 o 2 años, corren mayor riesgo de desarrollar CC⁶.

1.1.4. Aspectos moleculares del VPH y de la evolución de la infección

Se trata de un virus de doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que infecta la piel y las superficies mucosas.

Su genoma codifica dos proteínas de nucleocápside (L1 y L2) y otras proteínas (E1, E2, E4 y E7), que permiten la replicación del ADN viral y el ensamblaje de las partículas víricas⁹.

Se han clonado más de 130 genotipos de VPH, a partir de lesiones clínicas, y su clasificación está basada en las similitudes genéticas de la secuencia de ADN de la proteína de nucleocápside L1.

Hay aproximadamente 40 tipos de VPH que infectan el aparato genital, y algunos de ellos han demostrado un importante potencial oncogénico (los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82), clasificándose como VPH-AR^{6,10}. El VPH 16 y el VPH 18 (o ambos) causan aproximadamente el 70 % de los CC y el 50 % de sus LP⁹.

El ciclo vital del VPH ocurre solamente en queratinocitos en fase de diferenciación. En la mayoría de los casos, la infección ocurre sin transformación maligna y el ADN viral se mantiene separado del ADN del huésped como un episoma. Por el contrario, en el subgrupo de infecciones por VPH que progresan a transformación maligna, el ADN viral está frecuentemente integrado en el genoma del huésped, durante la progresión de la LP a cáncer⁹ (ver explicación detallada en la figura 1).

Recientemente, se ha descubierto que existen varios eventos y procesos que contribuyen a la integración del VPH, existiendo varias etapas involucradas en el desarrollo de un sitio de integración. El evento de integración inicial probablemente tiene lugar en regiones donde el ADN del virus y el del huésped están muy cerca de las células basales proliferantes de una lesión. Así, el VPH toma ventaja del mecanismo de reparación de ADN del huésped, para replicar su propio ADN, en ciertas fases del ciclo celular. En segundo lugar, la región «objetivo» debe estar en una zona transcripcionalmente competente de la cromatina del huésped, que pueda soportar la expresión de los oncogenes virales. En la mayoría de los casos, el ARN mensajero de E6/E7 se expresa como una transcripción de fusión viral-huésped, y esto requiere la presencia cercana de un receptor de empalme celular y un sitio de poliadenilación. Finalmente, es probable que haya una modulación epigenética del sitio de integración (metilación del ADN y modificaciones de la cromatina) que determine si el sitio de integración está activo o silenciado. Es también probable que haya muchos eventos de integración sin salida, que

no sean capaces de producir suficientes oncoproteínas E6/E7 para impulsar la expansión clonal de la célula huésped¹¹.

La integración del genoma del VPH ha sido encontrada fundamentalmente en dos formas, como un único genoma integrado y como múltiples repeticiones en tándem del genoma viral dentro del genoma celular¹¹. Se han propuesto varios mecanismos de inserción y rotura para explicar el proceso a través del cual el VPH podría utilizar el proceso de reparación y replicación del ADN, para insertar su genoma en el del huésped. El modelo más aceptado es el denominado «de bucle», estableciendo que la integración del VPH está mediada por la replicación y recombinación del ADN, lo que puede dar lugar a concatémeros de ADN. Esto podría conducir a la interrupción de genes involucrados en la tumorigénesis, la amplificación de oncogenes, reordenamientos inter o intracromosómicos y/o inestabilidad genética¹².

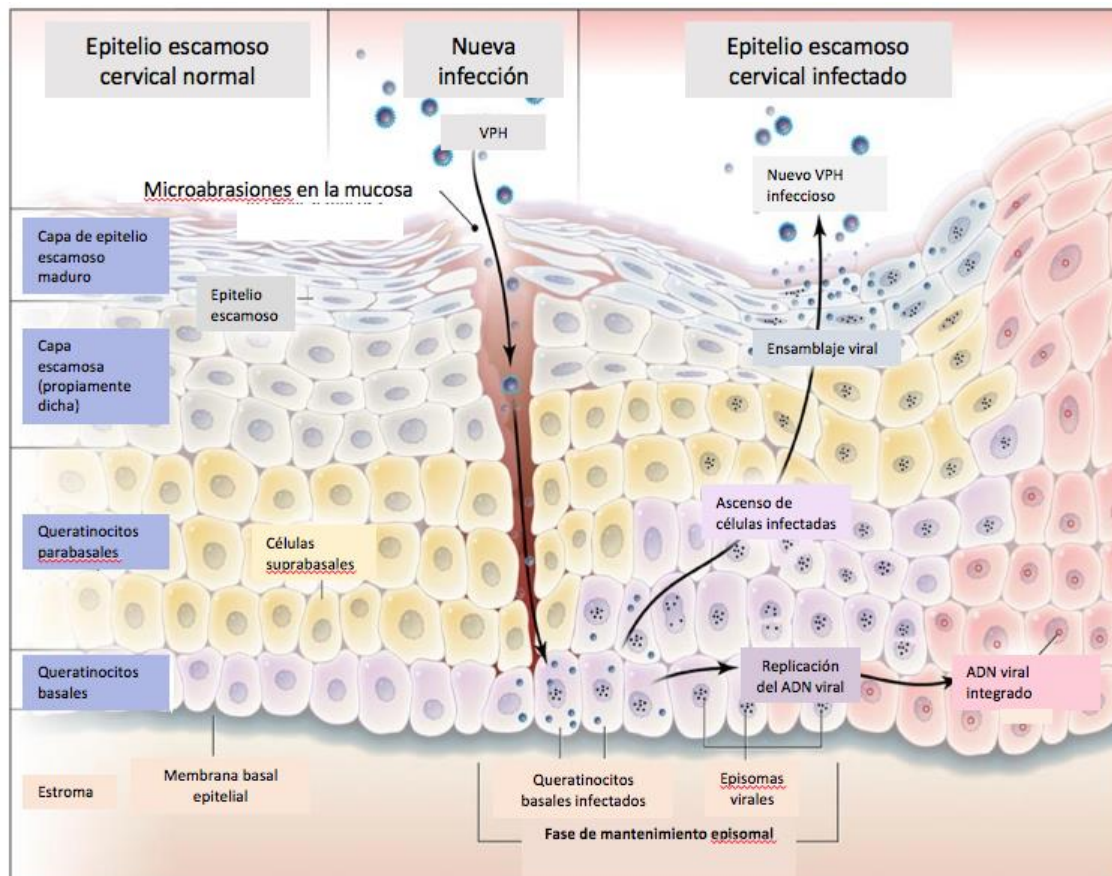


Figura 1. Ciclo de vida del VPH en el epitelio escamoso del cérvix

Fuente: figura extraída de Kahn (modificada y traducida al castellano)⁹

A través de microabrasiones, el VPH penetra la mucosa e infecta los queratinocitos basales, produciéndose la replicación del ADN viral. La inicial amplificación del genoma

se continúa con una fase de mantenimiento episomal. Las células basales infectadas van ascendiendo al compartimiento suprabasal, donde se produce una amplificación *productiva* del genoma, con un elevado número de copias, a nivel de los estratos más superiores. El ensamblaje viral ocurre en las capas más superficiales del epitelio, permitiendo la liberación de los viriones, que pueden infectar los tejidos adyacentes.

Desde el punto de vista de la expresión genética del virus, se sabe que la fase de la infección denominada *transitoria*, *permissiva* o *productiva*, se caracteriza por un nivel de expresión de E6 y E7 muy bajo en las células basales y parabasales del epitelio escamoso. Sin embargo, la fase *transformante* se caracteriza por una sobreexpresión importante de los genes E6 y E7, también en las células escamosas basales y parabasales, que se han escapado del control regulatorio de la proteína E2, lo cual lleva a inestabilidad cromosómica y puede dar lugar a la selección de clones neoplásicos (a través de la inactivación de las proteínas supresoras de tumor p53 y la proteína de retinoblastoma (pRb)⁹), que eventualmente pueden progresar a carcinomas invasivos⁸ (ver figura 2).

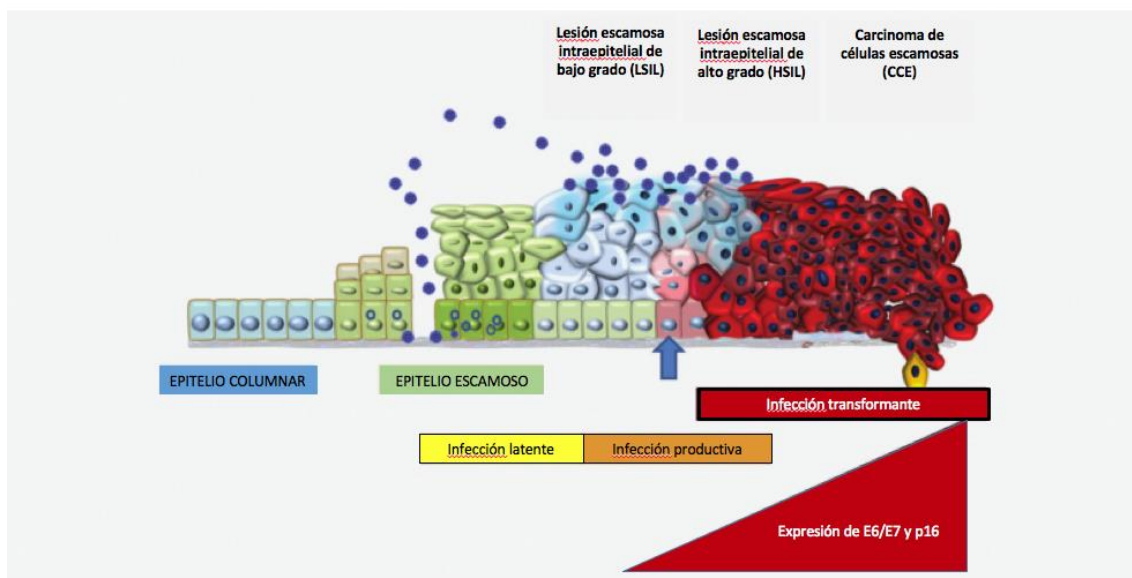


Figura 2. Representación esquemática de la evolución de la infección por el VPH con cambios moleculares e histológicos

Fuente: figura extraída de Bergeron *et al.* (modificada y traducida al castellano)⁸

La sobreexpresión de los oncogenes virales E6/E7 en la infección *transformante* altera el control del ciclo celular y puede derivar en lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) o carcinoma de células escamosas (CCE). Las infecciones *transformantes* también se caracterizan por sobreexpresión de p16INK4a.

1.1.5. Aspectos anatómicos e histológicos del cérvix y evolución de las LP

El cérvix es la porción más inferior del útero, que sobresale en la vagina superior. Mide 2,5-3 cm de largo en la mujer nulípara adulta, y cuando está posicionado normalmente, tiene un ángulo ligeramente hacia abajo y hacia atrás. La porción vaginal (*portio vaginalis*) del cérvix, también conocida como exocérvix, está delimitada por los fórnicos vaginales anterior y posterior, y tiene una superficie elíptica convexa. En el centro del exocérvix está el orificio cervical externo (OCE), que tiene forma circular en las nulíparas y hendida en las mujeres multíparas. El OCE está conectado al istmo del canal cervical (endocérvix). El canal cervical, a su vez, es una cavidad elíptica que mide 8 mm en su mayor diámetro y contiene crestas longitudinales de la mucosa, las *plicae palmatae*¹³.

La unión escamo-columnar (UEC) se define como el borde entre el epitelio escamoso estratificado del exocérvix y el epitelio glandular del endocérvix. Dicha unión está constantemente sujeta a influencias hormonales y, en consecuencia, su ubicación anatómica varía con la edad. Al nacer, la mayoría de las mujeres tienen epitelio endocervical en el exocérvix, debido a la exposición intrauterina a las hormonas maternas, pero rápidamente regresa al canal endocervical, hasta la menarquia. Durante la pubertad, el embarazo o la terapia con progesterona, la presencia de epitelio glandular endocervical en el exocérvix produce lo que clínicamente se conoce como eversión cervical fisiológica o ectropión (ver figura 3). A lo largo de los años reproductivos, el epitelio endocervical se reemplaza continuamente por epitelio escamoso metaplásico, debido a la exposición del ectropión al pH ácido de la vagina y otros factores ambientales. El grado de ectropión disminuye con el aumento de la edad y el tiempo desde el inicio de la actividad sexual. Durante la menopausia, la zona de transformación retrocede hacia el canal endocervical, y en las mujeres posmenopáusicas puede ubicarse completamente dentro del canal endocervical. Por lo tanto, la zona de transformación (ZT) es el área de remodelación del ectropión, que sufre una metaplasia escamosa activa y representa la región entre la UEC original y la funcional (ver figura 4). Es importante tener en cuenta que la zona de transformación es un área muy dinámica, que cambia continuamente según las influencias hormonales y ambientales. La remodelación del ectropión no ocurre de manera uniforme y, de hecho, la metaplasia escamosa a menudo se encuentra en cualquier lugar dentro del epitelio columnar endocervical, expuesto de manera irregular. Esta área es una de las más susceptibles a la infección por el VPH por varias razones, incluida una mayor susceptibilidad a la infección que presenta el borde de avance del epitelio escamoso inmaduro¹⁴.

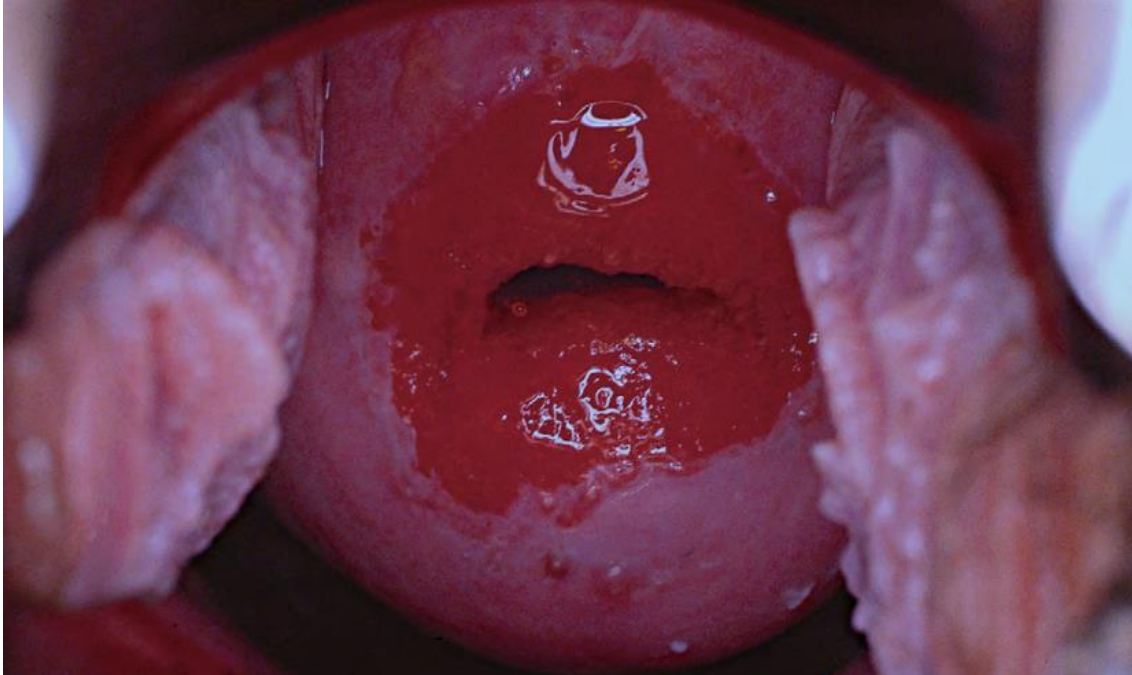


Figura 3. Imagen colposcópica del ectropión

Fuente: imagen extraída de Harmon *et al.*¹⁴

La mucosa endocervical tiene una superficie irregular y rojiza, a diferencia de la superficie lisa y rosada del epitelio escamoso nativo.

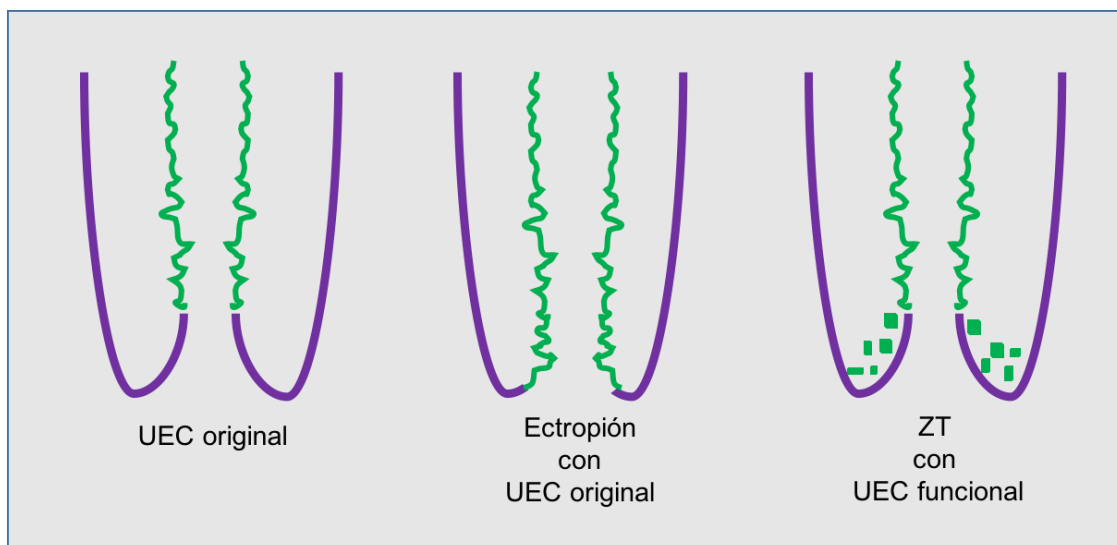


Figura 4. Representación esquemática de la zona de transformación (ZT)

Izquierda: esquema del exocérnix cubierto por epitelio escamoso nativo. La UEC está en el OCE. Centro: representa ectropión cervical, con UEC ubicada en el exocérnix, por debajo del OCE. Derecha: representa áreas de ectropión, que han sido cubiertas por epitelio escamoso metaplásico. Esta área es la ZT cervical. La UEC nueva o funcional de la ZT está en el OCE.

La progresión de la infección por el VPH a CC está acompañada por una secuencia de cambios histológicos en el epitelio escamoso cervical, que se han definido como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), considerándose como LP del carcinoma de células escamosas (CCE).

La NIC se clasifica en tres grados (ver figura 5):

- En la NIC grado 1 (NIC1): existe displasia leve con presencia de distorsión arquitectural y atipia citológica en el tercio inferior del epitelio cervical.
- En la NIC grado 2 (NIC2): la displasia es moderada con alteraciones citológicas que abarcan los 2/3 inferiores del epitelio cervical.
- En la NIC grado 3 (NIC3): la displasia es severa, con alteraciones citológicas que alcanzan el tercio superior del epitelio cervical, conservándose algo de maduración en superficie (con células orientadas horizontalmente y algunos núcleos picnóticos).

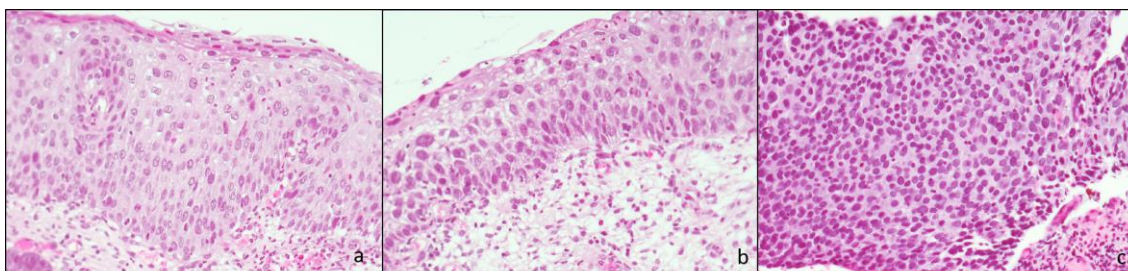


Figura 5. Microfotografías de la secuencia de cambios histológicos en el epitelio escamoso cervical

a) *NIC 1*: se observa distorsión arquitectural leve, restringida al tercio inferior del epitelio escamoso, con atipia citológica y alguna mitosis suprabasal (H-E 4X); b) *NIC 2*: alteraciones que incluyen los 2/3 inferiores del epitelio escamoso e imágenes de mitosis atípicas que respetan los estratos más superiores (H-E 10X); c) *NIC 3*: las alteraciones alcanzan el tercio superior del epitelio. Los núcleos se orientan de forma perpendicular a la membrana basal epitelial y son hiper cromáticos (H-E 10X).

Los datos acerca de la historia natural de la enfermedad indican que entre el 70 % y el 90 % de las NIC1 involucionan espontáneamente. En contraste, las tasas de persistencia o progresión hacia CC, entre las NIC2 y NIC3, se han estimado entre el 57 % y el 70 %, respectivamente⁹.

Por este motivo, en la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basa en un sistema de dos niveles para separar las LP escamosas¹⁵:

- Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL): definida como una lesión escamosa intraepitelial, que representa la manifestación clínica y morfológica de una infección por el VPH *productiva*, conllevando bajo riesgo de tener un CCE o

desarrollarlo en el futuro. Se incluyen dentro de esta categoría la NIC1 y cualquiera de los siguientes términos: displasia escamosa leve, condiloma, atipia coilocítica y coilocitosis.

- Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL): se define como una lesión escamosa intraepitelial que conlleva un riesgo significativo para desarrollar un CC, si no es tratada. Se incluyen dentro de esta categoría la NIC2, la NIC3 y cualquiera de los siguientes términos: displasia escamosa moderada, displasia escamosa severa y carcinoma escamoso *in situ*¹⁵.

Este sistema ha demostrado ser mucho más reproducible y con mayor relevancia biológica¹⁵.

1.1.6. Aspectos citológicos

En el año 1928, el anatomista George N. Papanicolaou informó que las células malignas del cérvix podían ser identificadas en frotis vaginales. Posteriormente, con la colaboración del ginecólogo Herbert Traut, quien le proporcionó un gran número de muestras clínicas, Papanicolaou publicó descripciones detalladas de lesiones cervicales preinvasivas. Tanto los médicos patólogos como los clínicos se mostraron inicialmente escépticos ante la técnica, pero a finales de los años cuarenta las observaciones de Papanicolaou fueron confirmadas por otros autores. Más adelante, el ginecólogo J. Ernest Ayre sugirió tomar muestras directamente desde el cérvix, con una espátula de madera (en lugar de la vagina con una pipeta, tal como describió originalmente Papanicolaou). Finalmente, los frotis citológicos fueron adoptados como una prueba de detección ideal para lesiones preinvasivas, que pueden tratarse, evitándose su progresión a cáncer invasivo¹⁶.

Existen dos métodos para la valoración de la citología:

1) Frotis convencional:

Los frotis convencionales se obtienen a menudo mediante la combinación de una espátula y un cepillo. Primero se usa la espátula, la cual se gira al menos 360°. Luego, se inserta el cepillo en el canal endocervical y se gira suavemente. Ambas muestras se deben extender en el portaobjetos y fijarse inmediatamente (con aerosoles a base de alcohol o en etanol al 95 %). Se pueden colocar en rápida sucesión, en dos mitades separadas del portaobjetos, o la muestra endocervical se puede extender sobre la muestra de la espátula, cubriendo el portaobjetos completo. También puede utilizarse un cepillo especial (*citobrush*), diseñado para el muestreo simultáneo de endocérvix y exocérvix, el cual debe

girarse de tres a cinco veces, transfiriendo posteriormente la muestra al portaobjetos, con movimientos horizontales, por cada lado del cepillo¹⁶.

2) Citología en base líquida (CBL):

En 1996, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) aprobó ThinPrep (Hologic, Marlborough, MA), como una alternativa al frotis convencional¹⁶.

La muestra se puede obtener con el *citobrush* o con la combinación de espátula/cepillo endocervical. El dispositivo de muestreo utilizado debe ser sumergido en una solución conservante a base de metanol (PreservCyt). Los glóbulos rojos se lisan con la solución. Los viales se colocan en el instrumento de ThinPrep, obteniéndose una extensión delgada de células, en un círculo de 20 mm de diámetro¹⁶.

Ambos métodos se consideran aceptables para el cribado de CC. A pesar de que varios estudios mostraron mayor detección de LSIL y HSIL citológico con la CBL, posteriores metaanálisis y ensayos aleatorizados prospectivos no pudieron demostrar una diferencia significativa entre esta técnica y el frotis convencional para la detección de HSIL histológica¹⁶.

No obstante, es indudable que la CBL presenta varias ventajas sobre los frotis convencionales, tales como:

- Permite realizar portaobjetos duplicados, e incluso preparaciones de bloques celulares, a partir de la muestra residual.
- Ofrece la posibilidad de obtener muestra adicional, para las pruebas de detección del VPH, clamidia y gonorrea, en caso de considerarse necesario.
- Permite la utilización de dispositivos de cribado automatizados.
- Facilita la valoración por parte de citotécnicos y patólogos¹⁶.

La tinción universal para las preparaciones citológicas obtenidas (a través de cualquiera de los dos métodos) es la tinción de Papanicolaou. Para esta técnica, se utiliza la hematoxilina de Harris, con la cual se obtiene una tinción nuclear óptima y la combinación de naranja G6 y EA 50, que le proporcionan una gama sutil de tonos verdes, azules y rosados al citoplasma celular (ver tabla 1)¹⁷.

Tabla 1. Fórmula de la tinción de Papanicolaou

Naranja G6
10 % de naranja G acuoso
Alcohol
Ácido fosfotúngstico
EA 50
0,04 M verde luminoso SF
0,3 M eosina Y
Ácido fosfotúngstico
Alcohol
Metanol
Ácido acético glacial

Con respecto a los informes citológicos, Papanicolaou ideó un sistema numérico, que originalmente tenía la intención de transmitir su grado de sospecha de cáncer:

- Clase I: ausencia de células atípicas o anormales.
- Clase II: atípica, pero sin evidencia de malignidad.
- Clase III: sugestiva, pero no concluyente de malignidad.
- Clase IV: muy sugestiva de malignidad.
- Clase V: concluyente de malignidad.

Sin embargo, con el tiempo, este sistema de clases sufrió muchas modificaciones y no se utilizó de manera uniforme, siendo reemplazado en muchos laboratorios por términos descriptivos¹⁶.

En el año 1989 se introdujo el sistema Bethesda, para estandarizar los informes de los resultados de la citología cervical e incorporar nuevos conocimientos adquiridos con el descubrimiento del VPH. El nombre otorgado al espectro de lesiones precursoras del CCE de cérvix fue cambiado a lesión escamosa intraepitelial (SIL), subdividida en dos grados solamente: bajo (LSIL) y alto (HSIL), basado en la comprensión en evolución de la biología del VPH¹⁶.

Al primer taller del sistema Bethesda (en 1988) le siguieron otros dos, en 1991 y 2001, que modificaron el marco y la terminología originales¹⁶. El sistema Bethesda 2001, como sus predecesores, recomienda un formato específico para el informe de citología, comenzando con una declaración explícita sobre la idoneidad de la muestra, seguida de una categorización general y una interpretación/resultado^{16,18}.

Las categorías que contempla, para las células escamosas, son las siguientes:

- *Negativo para lesión intraepitelial o malignidad (NILM)*: se utiliza esta categoría cuando no hay evidencia de neoplasia, independientemente de si se observan, o no, microorganismos u otros hallazgos no neoplásicos.
- *Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS)*: se trata de una «zona gris» donde no es posible precisar si se trata de cambios celulares benignos o lesión intraepitelial. Se define de la siguiente forma: «alteraciones citológicas sugestivas de lesión intraepitelial, pero cuantitativa y/o cualitativamente insuficientes para una interpretación definitiva».
- *Células escamosas atípicas, no puede excluirse HSIL (ASC-H)*: este término recoge aquellos casos en los que las alteraciones celulares son bastante acusadas, pero bien por las características de la extensión (inflamación, hemorragia, etc.) o por la escasez de estas células, no pueden considerarse totalmente concluyentes. Es decir, cuando hay alteraciones no concluyentes pero muy sugestivas de HSIL.
- *LSIL*: esta categoría se utiliza cuando se observan células escamosas, aisladas o en grupos poco cohesivos, con citoplasma de tipo superficial, de aspecto maduro, con núcleos agrandados (aproximadamente 3 veces mayores que el de una célula intermedia), irregularidad de la membrana nuclear, ausencia de nucléolo y frecuente coilocitosis y/o binucleación.
- *HSIL*: en esta categoría se observan células escamosas con importante aumento de la relación núcleo/citoplasma, cromatina de distribución irregular, hiper cromasia nuclear y membranas nucleares de contornos irregulares.
- *CCE*: estos frotis consisten de células francamente atípicas, que forman agregados sincitiales, con presencia de nucléolos prominentes, cromatina irregular y fondo necroinflamatorio^{16,18}.

En las figuras 6 y 7, se pueden ver imágenes microscópicas de citologías en base líquida, teñidas con la tinción de Papanicolaou:

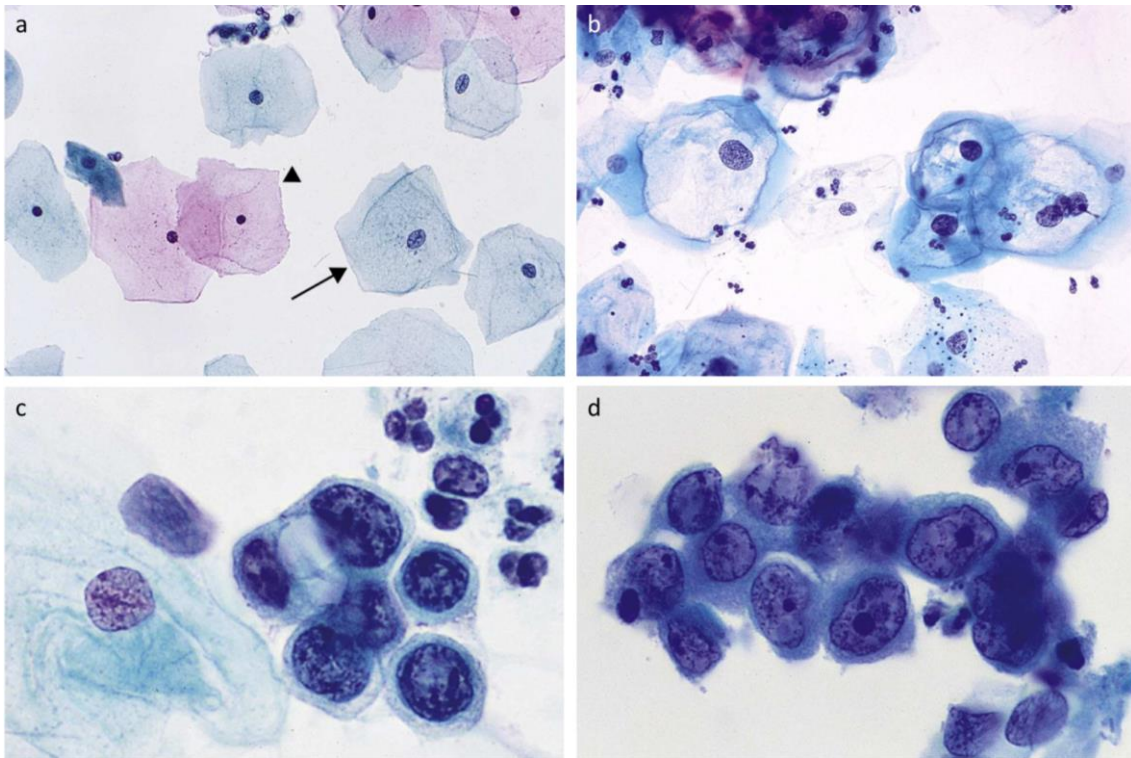


Figura 6. Imágenes citológicas de distintas categorías diagnósticas

a) *NILM*: se pueden observar células escamosas superficiales (flecha incompleta) e intermedias (flecha completa), de una citología normal; b) *LSIL*: coilocitos clásicos y frecuente binucleación; c) *HSIL*: células con importante atipia, aumento de la relación núcleo/citoplasma e hiper cromasia nuclear; d) *CCE*: ejemplo de un CCE no queratinizante, con células atípicas, con cromatina irregular y nucléolos prominentes. Fuente: imágenes extraídas de Cibas *et al.*¹⁶.

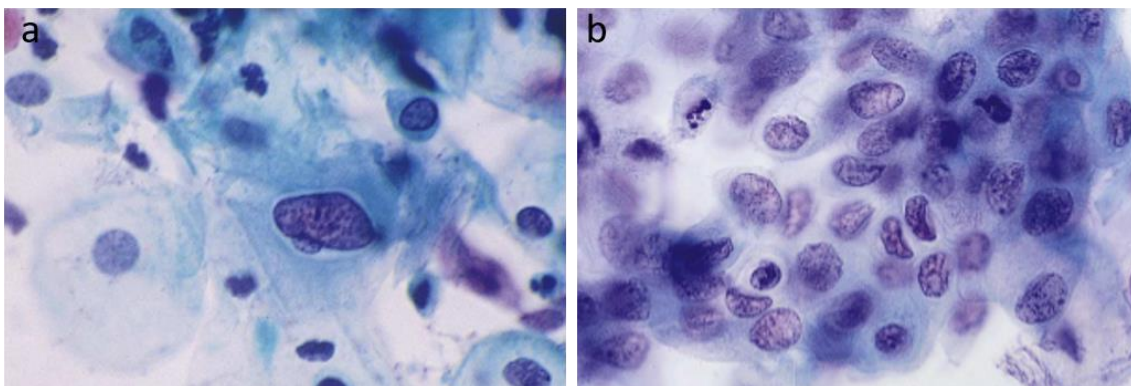


Figura 7. Imágenes citológicas de distintas categorías diagnósticas (continuación)

a) *ASCUS*: en este ejemplo de *ASCUS*, podemos observar una célula escamosa madura, con un núcleo significativamente agrandado e hiper cromático. Células como estas, sobre todo si se observan en escaso número, son sugestivas, pero no diagnósticas, de una lesión escamosa intraepitelial; b) *ASC-H*: en este ejemplo de *ASC-H*, se trata de células de metaplasia escamosa inmadura, que muestran atipia nuclear y plantean la posibilidad de *HSIL*; no obstante, el grado de aumento de tamaño nuclear, hiper cromasia e irregularidad de la membrana son insuficientes para emitir un diagnóstico concluyente. Fuente: imágenes extraídas de Cibas *et al.*¹⁶.

1.1.7. El cribado del CC

Históricamente, el principal objetivo de la prevención del CC ha sido el diagnóstico precoz de sus LP¹⁹. Por tal motivo, en las últimas décadas se ha llevado a cabo a nivel mundial un cribado basado en la prueba de Papanicolaou (citología). Si bien es cierto que con este método se ha logrado una importante disminución en la incidencia y mortalidad por CC en determinados países, la interpretación de la citología cervical tiene una elevada subjetividad interobservador, lo que hace que su sensibilidad sea muy variable y requiera estrictos controles de calidad²⁰⁻²².

Las principales debilidades de la citología como método de cribado primario se describen a continuación:

- En primer lugar, los resultados dependen de que la muestra recolectada sea de alta calidad (dependiente de la persona que realiza la toma).
- En segundo lugar, la prueba requiere la identificación de cambios morfológicos celulares, cuya interpretación es altamente subjetiva (dependiente del observador).
- Finalmente, es un método de detección particularmente repetitivo, lo que puede conducir a un mayor número de errores de interpretación²².

En un artículo publicado por Cuzick *et al.*, la sensibilidad promedio de la citología cervical para la detección de NIC2 fue del 53 %, presentando una enorme variabilidad (heterogeneidad $p < 0,001$), desde un 18,6 % hasta un 76,7 %, según los diferentes estudios, con una especificidad promedio de 96,3 %²². En otra serie estudiada por Nkwabong *et al.*, sus valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) fueron: 55,5 %, 75 %, 88,2 % y 33,3 %, respectivamente²³. Como consecuencia, en poblaciones con programas de cribado eficaces, esta baja sensibilidad de la citología se asocia a una alta proporción de CC, en mujeres aparentemente cribadas adecuadamente, conllevando serias implicaciones médicas, económicas y legales²².

La comprensión acerca de la infección *persistente* por cepas patógenas del VPH, como causa necesaria de casi todos los CC, ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias de cribado, como las pruebas de detección de VPH-AR, que tienen una mayor sensibilidad y valor predictivo negativo (VPN) para la detección de LP y CC, en comparación con la citología^{24,25}, siendo altamente reproducibles, objetivas y fáciles de realizar, supervisar y automatizar²². En el estudio llevado a cabo por Cuzick *et al.*, el nivel de sensibilidad estimada para la detección de CIN2+ y CIN3+ fue del 96,1 % en general (94,2-97,4 % y 93,6-97,6 %, respectivamente). Además, no se observó heterogeneidad en las diferentes

series, y dichos niveles de sensibilidad no se vieron afectados por la edad de las pacientes (a diferencia de la citología cervical, cuya sensibilidad fue sustancialmente mejor en las mujeres mayores de 50 años que en las mujeres más jóvenes —79,3 % vs. 59,6 %—)²².

Se ha demostrado que estas técnicas de detección del VPH proporcionan, en los casos que resultan negativos, una información fiable y prolongada del bajo riesgo de CC, permitiendo la extensión de los intervalos de tiempo entre las tomas de las muestras^{24,26}. Sin embargo, la especificidad de las mismas es limitada^{8,21,22,26}. Esto se debe a la alta frecuencia de las infecciones por el VPH, y a su resolución espontánea en la mayoría de los casos, sobre todo en mujeres jóvenes, debido a la respuesta inmune que desarrollan durante el curso de una infección^{8,24,26}. Por esta razón, no deben usarse para el cribado primario en mujeres menores de 30 años^{1,2,5,27}.

Las publicaciones científicas demuestran que los niveles de especificidad para estas pruebas de detección del VPH son variables. Una prueba de heterogeneidad, realizada en el estudio de Cuzick *et al.*, entre diferentes poblaciones, resultó estadísticamente significativa ($p < 0,001$); así como también las pruebas de tendencia, según los grupos de edad ($p < 0,001$). En general, en dicho estudio, el VPP de las pruebas de detección del VPH para CIN2+ fue del 15,5 % (14,2-16,8 %), siendo del 12,8 % (11,2-14,6 %) en mujeres de 35 años o más y del 17,8 % (16,0-19,8 %) en mujeres más jóvenes²². En una revisión sistemática y metaanálisis realizados por Mustafa *et al.*, la especificidad estimada de las mismas osciló entre el 56 % y el 93 %²⁸.

Dado que las pruebas de detección de ADN del VPH-AR no pueden predecir qué infecciones progresarán a CC, son necesarios otros métodos para seleccionar qué mujeres VPH-positivas necesitarán la realización de una colposcopia^{8,29,30}. Para este triaje secundario, se han estudiado algunas pruebas en los últimos años, tales como: citología, genotipado del VPH, prueba de tinción dual citológica p16/ki67 (TDC p16/ki67), metilación del huésped, metilación viral y proteína E6 del VPH^{31,32}.

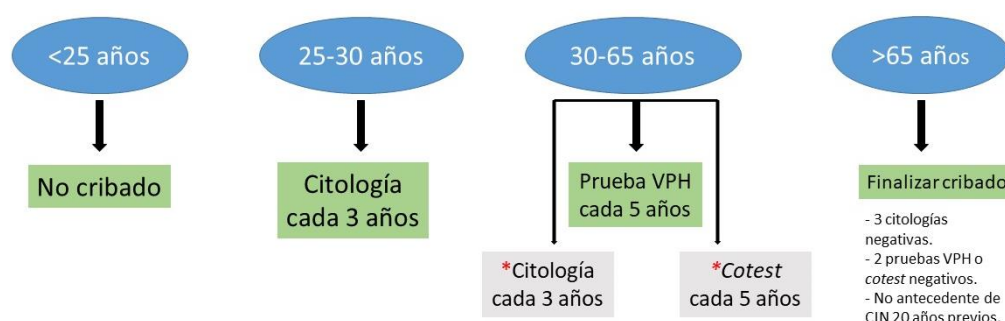
Una de las pruebas más prometedoras para este fin es la TDC p16/ki67^{24,30,33-36}. Datos procedentes de EEUU y de Italia sugieren que las mujeres VPH-positivas, que sean también positivas para la TDC p16/ki67, deben derivarse a colposcopia; mientras que en mujeres con resultado negativo para la TDC p16/ki67, podría ampliarse el intervalo del seguimiento³⁷. Sin embargo, esto no está bien establecido en las directrices europeas² y, hasta el momento, no se han publicado en nuestro país estudios que reflejen el rendimiento de la TDC p16/ki67, en este contexto.

A modo de resumen, podemos decir que existen actualmente tres opciones disponibles para la detección primaria del CC: citología, pruebas de detección de VPH-AR y el llamado cotest, que consiste en la realización de ambas pruebas³¹. En EEUU se acepta el cotest como la estrategia preferida³⁸⁻⁴⁰, mientras que en Europa la recomendación es la detección primaria basada en el VPH (en mujeres mayores de 35 años, en el contexto de un programa de cribado poblacional organizado)². Sin embargo, con respecto al triaje secundario de las mujeres que resulten positivas al cribado primario, todavía existe confusión sobre el mejor enfoque³¹.

En España, los programas de cribado de CC han sido heterogéneos en las diferentes comunidades autónomas¹.

Específicamente en Navarra, ha sido de tipo oportunista, y aunque ha tenido una alta cobertura (hasta el 73 %), esta ha sido desigual, con menor alcance en las zonas rurales⁴¹. Por otra parte, es importante comentar que, en esta comunidad autónoma, se inició el programa de vacunación anti-VPH en el año 2007, en niñas de 14 años de edad.

En el año 2014, la *Guía de cribado del Cáncer de Cuello de Útero en España*¹ recomendaba utilizar el cribado primario basado en citología en mujeres de entre 25 y 30 años (cada 3 años), y el cribado primario basado en el VPH-AR en mujeres de 30 a 65 años de edad (cada 5 años). La citología (cada 3 años) y el cotest (cada 5 años) también se consideraban opciones aceptables, de acuerdo con los recursos y la infraestructura de cada comunidad autónoma, al menos temporalmente¹ (ver figura 8).



*Opciones aceptables, de acuerdo con los recursos y la infraestructura de cada Comunidad Autónoma, siempre que se cumplan los controles de calidad. La transición a cribado con prueba VPH debería ser un objetivo alcanzable en el plazo de 3-5 años para todos los ámbitos del cribado primario de CC.

Figura 8. Esquema de cribado del CC, según la *Guía de cribado del Cáncer de Cuello de Útero en España* del año 2014

*Opciones aceptables, de acuerdo con los recursos y la infraestructura de cada comunidad autónoma, siempre que se cumplan los controles de calidad. La transición a cribado con prueba VPH debería ser un objetivo alcanzable en el plazo de 3-5 años para todos los ámbitos del cribado primario de CC.

No obstante, recientemente (el 27 de abril de 2019), el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social publicó en el *Boletín Oficial del Estado* (cve: BOE-A-2019-6277; verificable en <<http://www.boe.es>>) las modificaciones en el cribado del CC, que se citan textualmente a continuación (ver figura 9).

«El apartado 3.3.2.3. del anexo I queda redactado de la siguiente manera:

3.3.2.3. Cribado poblacional de cáncer de cérvix: con carácter general, se realizará aplicando los siguientes criterios:

- a) Población objetivo: mujeres con edades comprendidas entre 25 y 65 años.
- b) Prueba primaria de cribado e intervalo entre exploraciones:
 - 1.º Mujeres con edades comprendidas entre 25 y 34 años: citología cada tres años.
 - 2.º Mujeres con edades comprendidas entre 35 y 65 años: determinación del VPH-AR.
 - i. Si VPH-AR es negativo, repetir prueba VPH-AR a los cinco años.
 - ii. Si VPH-AR es positivo, triaje con citología. Si la citología es negativa, repetir VPH-AR al año».

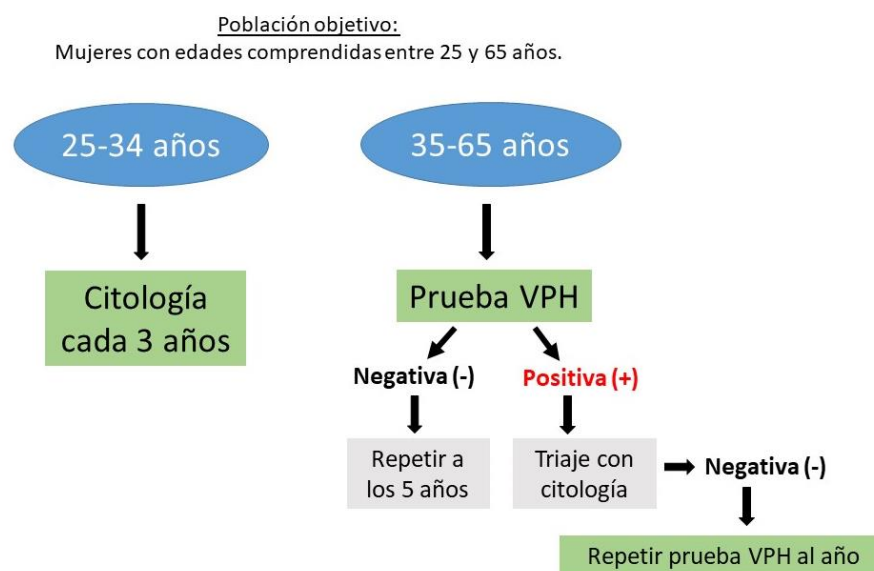


Figura 9. Esquema de cribado del CC, según el *Boletín Oficial del Estado* emitido el 27 de abril de 2019

Como se puede observar, de acuerdo a este nuevo programa de cribado de CC, el triaje secundario recomendado para mujeres que resulten VPH-AR positivas es la citología cervical (sola). Si dicha citología es anormal, la paciente debe derivarse a colposcopia¹. Por el contrario, si la citología es normal, debe repetirse la prueba de VPH-AR al año.

En la Guía de 2014¹ quedaba reflejado que no existe consenso sobre cuál es la mejor opción para las mujeres (VPH-positivas con citología normal), comentándose que las estrategias con mejores resultados son:

- Prueba VPH al año (*nivel de evidencia moderado, recomendación fuerte a favor*) (es la que finalmente se ha incorporado en el BOE de 2019).
- Estudio inmediato con técnicas moleculares, preferentemente realizado en el material de la toma previa en medio líquido (*nivel de evidencia bajo, recomendación fuerte a favor*), entre las cuales se incluyen: genotipado de ADN o ARN de los tipos 16 y 18 del virus, detección del ARNm de los genes virales E6 y E7 y la TDC p16/ki67.

En el caso de que la prueba de VPH al año o la técnica molecular realizada tuviesen un resultado positivo, la recomendación contemplada es remitir a colposcopia¹.

1.1.8. Prueba de tinción dual p16/ki67

La proteína p16INK4a es un inhibidor de quinasa que bloquea la fosforilación de varias ciclinas y contrarresta la fosforilación e inactivación de pRB. Su sobreexpresión generalmente ocurre en células de organismos envejecidos⁸.

Desde hace algunos años, se sabe que los altos niveles de expresión de E7 desencadenan señales de estrés celular e inducen remodelación epigenética, particularmente del locus CDKN2A (p16INK4a/ARF), que a su vez produce una sobreexpresión sustancial de la proteína p16INK4a, que puede ser detectada por inmunohistoquímica, y que actualmente se reconoce como el sello distintivo de la transformación inducida por el VPH⁸.

En la figura 10 se puede observar una representación esquemática del proceso, que se explicará de forma simplificada en los párrafos siguientes.

En las células somáticas normales, la sobreexpresión de p16INK4a da como resultado la parada inmediata del ciclo celular y la condensación irreversible de cromatina, protegiendo a las células de daños en su genoma, para que puedan producir proliferación y expansión. Las funciones inhibitoras del crecimiento de p16INK4a están mediadas predominantemente por su actividad quinasa dependiente de ciclina, que inhibe la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK 4), que esencialmente previene la hiperfosforilación y, por lo tanto, la inactivación de la proteína pRB.

En muchas neoplasias humanas, incluidas las de mama, páncreas, colon y melanomas, la función del gen p16INK4a se pierde por deleciones genéticas, mutaciones o

silenciamiento epigenético⁸. En otros tumores, su función de detención del crecimiento puede ser abolida inactivando las señales inhibitoras (por ejemplo, inactivando las funciones de pRB).

En el caso de la infección *transformante* por el VPH, los oncogenes virales E6 y E7 interfieren sustancialmente con la apoptosis y la regulación del ciclo celular, no siendo posible controlar dicho ciclo a través de la vía de pRB. Específicamente, E7 separa la pRb del factor de transcripción E2F, promoviendo la progresión del ciclo celular, un cambio molecular que usualmente es activado por CDK4/6. Como resultado, las células afectadas sobreexpresan p16 para contrarrestar la activación irregular del ciclo celular, pero como el E2F no es liberado a través de la acción de CDK4/6, sino por E7, dicha sobreexpresión no tiene ningún efecto en la inactivación de la proliferación celular, por lo cual el p16 se acumula progresivamente en el núcleo y citoplasma de las células afectas, donde es detectado con las técnicas de inmunohistoquímica (ver figura 10).

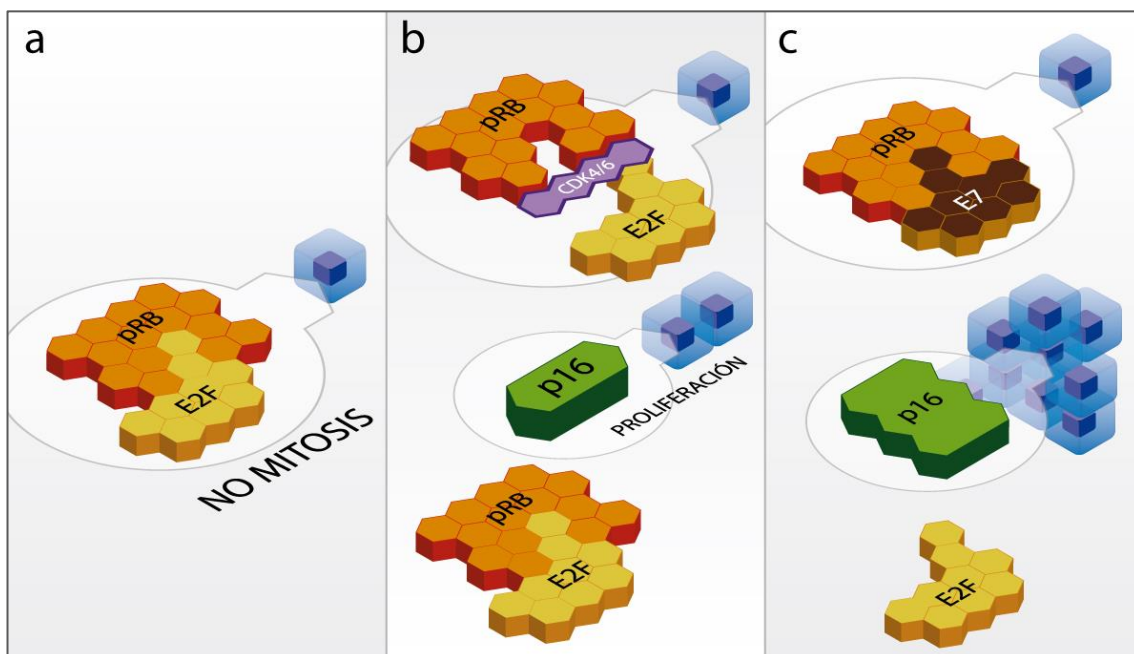


Figura 10. Representación esquemática simplificada del mecanismo celular, en la infección transformante por VPH-AR, que explica el fundamento de la expresión inmunohistoquímica de p16

a) En células somáticas normales, pRb se une a E2F. Esta unión bloquea la transcripción de genes que promueven el ciclo celular y, por tanto, la proliferación; b) la liberación de E2F, a través de CDK4/6, resulta en progresión del ciclo celular, replicación mitótica y activación del p16 en el cromosoma 9. Esto lleva a la producción de la proteína p16, que facilita la unión de pRb y E2F, llevando al freno del ciclo celular; c) si el oncogen viral E7 se une a pRB, no se detiene la proliferación y la célula prolifera constantemente. Se acumula p16 al no poder unirse a pRb-E2F.

Por otro lado, ki67 es un factor de proliferación celular que no puede estar presente si el ciclo celular ha sido bloqueado por p16. Es decir, son mutuamente excluyentes en una célula con un ciclo celular normal. Así, la presencia de estos dos marcadores en la misma célula es un signo específico de transformación neoplásica^{8,30}.

La infección *persistente* por el VPH induce cambios moleculares que conllevan a una coexpresión de ambos marcadores (p16 y ki67) en la misma célula^{8,34-36}. Esto representa el fundamento teórico de la prueba.

La TDC p16/ki67 presenta la principal ventaja de que no es necesaria la evaluación morfológica de las células positivas, por lo que tiene una muy buena reproducibilidad interobservador³⁵.

Con al menos una célula epitelial, con tinción citoplasmática para p16 (marrón) y tinción nuclear para ki67 (roja), se puede considerar una citología positiva para esta prueba^{25,26,30,31,34} (ver figura 11).

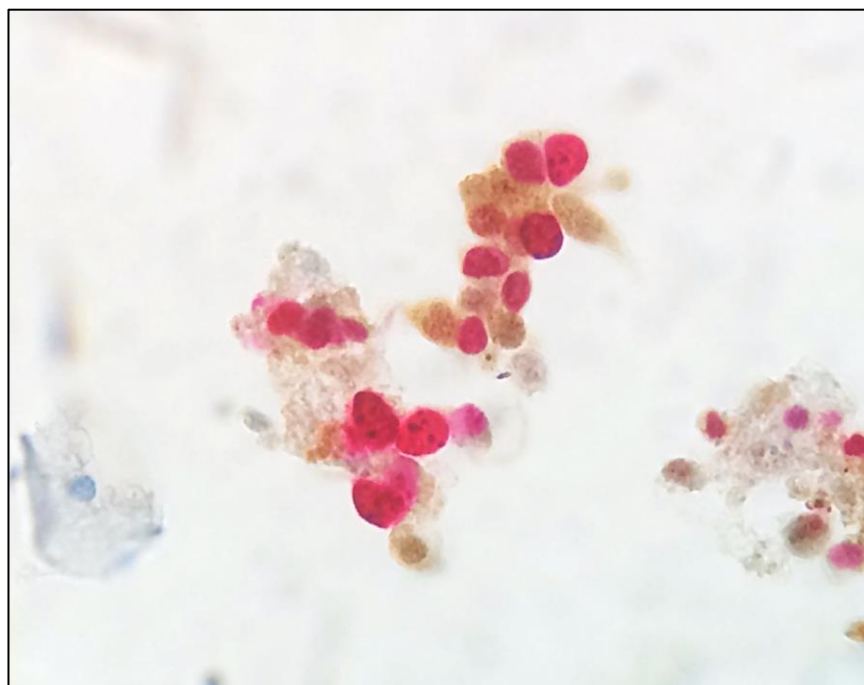


Figura 11. Positividad para la tinción dual citológica p16/ki67

Microfotografía de una TDC p16/ki67 positiva, donde se observa un grupo celular que muestra coexpresión de p16 (citoplasmática, marrón) y ki67 (nuclear, roja). En el lado izquierdo del campo se identifica una célula escamosa superficial, con ausencia de expresión para ambos marcadores.

La mayor objetividad que proporciona la TDC p16/ki67, como prueba adicional a la citología, la convierte en una opción prometedora como método de triaje secundario para las mujeres con resultado positivo en las pruebas de detección del VPH. Se ha sugerido

que utilizando la TDC p16/ki67 se podrían reducir las derivaciones a colposcopia hasta casi la mitad²⁶.

En la tabla 2 se pueden observar los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67 para la detección de NIC2+ en el triaje de mujeres VPH-positivas, según varios estudios realizados en diferentes países^{24,30,32,34,42-44}. Existe una importante variabilidad entre ellos, sobre todo en cuanto a especificidad y VPP, con cifras que oscilan entre el 21 % y el 76,9 %. En términos generales, los niveles de sensibilidad y VPN de la prueba son más elevados que los de especificidad y VPP, en todas las series estudiadas.

Tabla 2. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67 para la detección de NIC2+ en el triaje de las mujeres VPH-positivas, entre las diferentes series

p16/ki67	Sensibilidad (95 % CI)	Especificidad (95 % CI)	VPP (95 % CI)	VPN (95 % CI)
Ovestad <i>et al.</i> ³⁰	0,88 (0,79-0,94)	0,31 (0,23-0,40)	0,48 (0,40-0,56)	0,78 (0,63-0,89)
Luttmer <i>et al.</i> ³⁴	85,5 % (80,2-90,9)	60,0 % (54,3-65,7)	55,9 % (49,8-62,0)	12,5 % (7,8-17,2) ^a
Yu <i>et al.</i> ⁴²	92,7 % (88,4-95,4)	52,7 % (46,4-58,8)	63,5 % (58,1-68,6)	89,0 % (82,8-93,1)
Wentzensen <i>et al.</i> ²⁴	83,4 % (77,1-88,6)	58,9 % (56,2-61,6)	21,0 % (18,1-24,3)	96,4 % (94,9-97,6)
Ebisch <i>et al.</i> ³²	86 % (79-92)	73 % (65-81)	74 % (66-81)	86 % (78-92)
Zhang <i>et al.</i> ⁴³	91,3 % (85,9-94,8)	76,9 % (72,3-80,8)	62,8 % (56,5-68,8)	95,4 % (92,4-97,2)
Wright <i>et al.</i> ⁴⁴	70,3 % (65,3-74,9)	75,6 % (74,0-77,1)	26,2 % (23,5-29,1)	95,4 % (94,4-96,2)

Abreviaturas: VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CI: intervalo de confianza; ^a: valor predictivo negativo complementario (1-VPN).

En nuestro país no existen todavía estudios que reflejen la posible utilidad clínica de la TDC p16/ki67, en el contexto de cribado inicial con pruebas de detección del VPH.

En el presente trabajo, se intenta determinar si la TDC p16/ki67 podría ser una herramienta útil para el triaje secundario de mujeres VPH-positivas en nuestra población, pudiendo evitarse la realización de colposcopias innecesarias.

1.2. Estado de la cuestión y práctica actual

Desde hace algunos años, el cribado del CC a nivel mundial se encuentra en una etapa de transición entre los programas tradicionales basados en citología, los programas basados en la detección del VPH-AR y/o una combinación entre ambos métodos (cotest).

En España, se ha implementado recientemente el cribado primario con pruebas de detección del VPH-AR, en mujeres con edades comprendidas entre 35 y 65 años. Estas

pruebas tienen elevado VPN y sensibilidad, pero una especificidad limitada, dado que, en la mayoría de las mujeres, la infección por el VPH se resuelve espontáneamente, sin desarrollar enfermedad relevante. Por este motivo, se requieren métodos adicionales de triaje secundario, para determinar qué mujeres VPH-positivas tienen mayor riesgo de desarrollar CC, con la consecuente derivación a colposcopia y biopsia.

La recomendación actual en nuestro país, para la realización de dicho triaje, es el estudio citológico convencional. No obstante, existen datos en la literatura de que la TDC p16/ki67 es una técnica de fácil realización, que ofrece mayor objetividad para su interpretación, y que promete ser una herramienta útil para discernir entre las mujeres que tienen una infección transitoria y las que van a desarrollar LP y/o CC, pudiéndose reducir significativamente las derivaciones a colposcopia.

En la actualidad, no hay estudios previos realizados en España que describan la posible eficacia de la misma. Basándonos en la falta de consenso actual acerca del mejor abordaje, nuestro trabajo pretende determinar el posible papel de la TDC p16/ki67 para este fin, en la población de Navarra.

2. Hipótesis

La TDC p16/ki67 es una técnica útil para el triaje secundario en mujeres que residen en Navarra y hayan resultado positivas al cribado primario con pruebas de detección del VPH-AR, identificando a aquellas con mayor riesgo de progresión a CC y disminuyendo las derivaciones a colposcopia y biopsia.

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal

Determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la TDC p16/ki67 para la detección de HSIL y CCE en mujeres VPH-positivas que residen en Navarra.

3.2. Objetivos secundarios

- Comparar los resultados obtenidos con la TDC p16/ki67 con los del estudio citológico convencional.
- Evaluar la distribución de los hallazgos, según los grupos de edad previamente definidos.
- Analizar la asociación existente entre el diagnóstico citológico y el resultado de la TDC p16/ki67.
- Contrastar nuestros resultados con la literatura de referencia, para determinar si es posible establecer recomendaciones aplicables a las nuevas políticas sanitarias de prevención de CC en la población de Navarra.

4. Material y métodos

4.1. Selección de casos

Para la realización de este trabajo se seleccionaron 2970 mujeres que residen en Navarra, a quienes se les ha realizado toma de muestras de citología cervical y pruebas para determinación de ADN de VPH-AR. Las muestras fueron recibidas en la Sección de Citopatología del Complejo Hospitalario de Navarra (Sede A), entre enero del año 2010 y diciembre del año 2014.

Cabe destacar que la muestra seleccionada apenas representa un 4,4 % de las citologías recibidas en nuestro servicio, en el período en estudio.

Criterios de exclusión:

- Resultado negativo para la prueba de detección del VPH-AR.
- Citologías cervicales con resultados de atipia de células glandulares y/o adenocarcinoma.

Después de aplicar estos criterios, se incluyeron en el estudio, finalmente, 1945 mujeres, con citología cervical valorable (excluyéndose lesiones originadas en el epitelio glandular) y con resultado positivo para la determinación de ADN de VPH-AR.

4.2. Recogida de información

La recogida de información se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Navarra, elaborándose una base de datos completamente anónima a medida que se recibían las muestras. Por cada caso se han recogido al menos 6 parámetros clínico-patológicos (ver tabla 3).

Tabla 3. Información recogida en cada caso

Tipo de datos	Parámetros
Datos de filiación	N.º de identificación del caso
Datos clínicos	Edad de la paciente
Datos anatomopatológicos	<ul style="list-style-type: none"> Diagnósticos citológicos de todas las citologías realizadas (a cada paciente): 0: sin lesión 1: ASCUS 2: LSIL 3: HSIL 4: CCE Diagnóstico histológico de las pacientes a quienes se les ha realizado biopsia: 0: sin lesión 1: LSIL 2: HSIL 3: CCE
Datos de seguimiento	Fechas de las citologías y biopsias realizadas
Datos inmunohistoquímicos	TDC p16/ki67: 0: negativo 1: positivo

Se utilizó el sistema informático Novopath® 5.14.13R02 del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Navarra, cuando fue necesario consultar información adicional.

Se consultaron también informes anatomopatológicos de resultados de biopsias de cérvix realizadas en Pamplona, Estella y Tudela.

4.3. Estudio citológico

4.3.1. Fase preanalítica

La obtención de las citologías ginecológicas fue realizada de forma rutinaria, mediante la toma exocervical-endocervical, utilizando un cepillo especial (*citobrush*), y luego fueron transferidas a la solución PreservCyt® (HologicCorp).

La primera parte de la muestra fue utilizada para el análisis en base líquida ThinPrep (Hologic® ThinPrep Pap), con su posterior tinción con la técnica de Papanicolaou modificada, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.3.2. Fase posanalítica

Las preparaciones citológicas fueron observadas e interpretadas por citotécnicos experimentados, siendo categorizadas de acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda 2001⁴⁵, en:

- Negativo para lesión intraepitelial o malignidad (NILM).
- Atipia escamosa de significado incierto (ASCUS).
- Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL).
- Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL).
- Carcinoma de células escamosas (CCE).

Todos los frotis de citología anormales (ASCUS, LSIL, HSIL y CCE) fueron revisados por citopatólogos experimentados, así como el 10 % de citologías con resultado normal (NILM).

4.4. Prueba de detección del VPH-AR

4.4.1. Fase preanalítica

La prueba de detección del VPH-AR se realizó con 2 ml residuales de la muestra líquida, procedentes de la toma de citología. El método utilizado fue Cervista™ (REF: 95-438), realizado e interpretado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Esta es una prueba automatizada de diagnóstico, cualitativa, *in vitro*, para la detección de ADN de 14 tipos de VPH de alto riesgo, a saber, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Los resultados básicamente se distribuyen en tres grupos (MIX1: 51, 56, 66; MIX2: 18, 39, 45, 59, 68; y MIX3: 16, 31, 33, 35, 52, 58), no siendo posible determinar el tipo específico de VPH. Un resultado positivo indica que al menos uno de los 14 tipos de alto riesgo está presente en la muestra de ADN.

La prueba Cervista™ fue diseñada en el año 2008 para mejorar los métodos de detección de lesiones cervicales. Sus niveles descritos de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP para la detección de HSIL/CCE entre mujeres con diagnóstico citológico de ASCUS son: 92,8 %, 44,2 %, 99,1 % y 8,3 %, respectivamente.

Esta prueba utiliza la química Invader®, un método de amplificación de señal para la detección de secuencias específicas de ácido nucleico. Este método utiliza dos tipos de reacciones isotérmicas: una reacción primaria que se realiza en la secuencia de ADN diana y una reacción secundaria, que produce una señal fluorescente.

En la reacción primaria, dos tipos de oligonucleótidos específicos de secuencia (es decir, un oligonucleótido sonda y un oligonucleótido Invader[®]) se unen a la secuencia diana de ADN. Cuando estos oligonucleótidos se superponen, por al menos un par de bases en la secuencia diana, se forma una estructura invasiva que actúa como sustrato para la enzima Cleavase[®]. La enzima escinde la porción 5' de la sonda, en la posición del solapamiento. Las sondas están presentes en un gran exceso molar y ciclan rápidamente dentro y fuera de la secuencia diana, de modo que se generan muchos solapamientos 5' escindidos. Las secuencias cortadas, luego se unen a un oligonucleótido de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) de horquilla universal, creando otra estructura invasiva que la enzima Cleavase[®] reconoce como sustrato. La enzima escinde los oligonucleótidos FRET, entre el fluoróforo y la molécula inhibidora, produciendo una señal de fluorescencia, a medida que los solapamientos escindidos se encienden y apagan. Para cada copia de la diana, las reacciones primarias y secundarias combinadas dan como resultado una amplificación de la señal de 10^6 - 10^7 veces por hora. Las secuencias de solapamiento y los oligonucleótidos FRET son universales, ya que no son complementarios a la secuencia diana.

Los reactivos para esta prueba se proporcionan como tres mezclas de oligonucleótidos, que detectan los 14 tipos de VPH, agrupados según la relación filogenética, es decir, tipos virales con secuencias de ADN similares (grupos de VPH A5/A6, A7, A9). En estas tres mezclas de oligonucleótidos, también están presentes oligonucleótidos que se unen a la histona 2 humana gen (H2be, HIST2H2BE). De este modo, HIST2H2BE sirve como control interno que produce una señal del ADN genómico presente en la muestra. El formato de la prueba Cervista[™] VPH-AR permite la detección simultánea de secuencias de ADN de VPH y HIST2H2BE, en un solo pocillo, utilizando dos secuencias de colgajo 5', diferentes en las sondas, así como dos oligonucleótidos FRET diferentes, cada uno con un fluoróforo espectralmente distinto (FAM y rojo). Por diseño, los solapamientos de 5' liberados se unen solo a sus respectivos oligonucleótidos FRET, para generar una señal específica de la diana (ver figura 12).

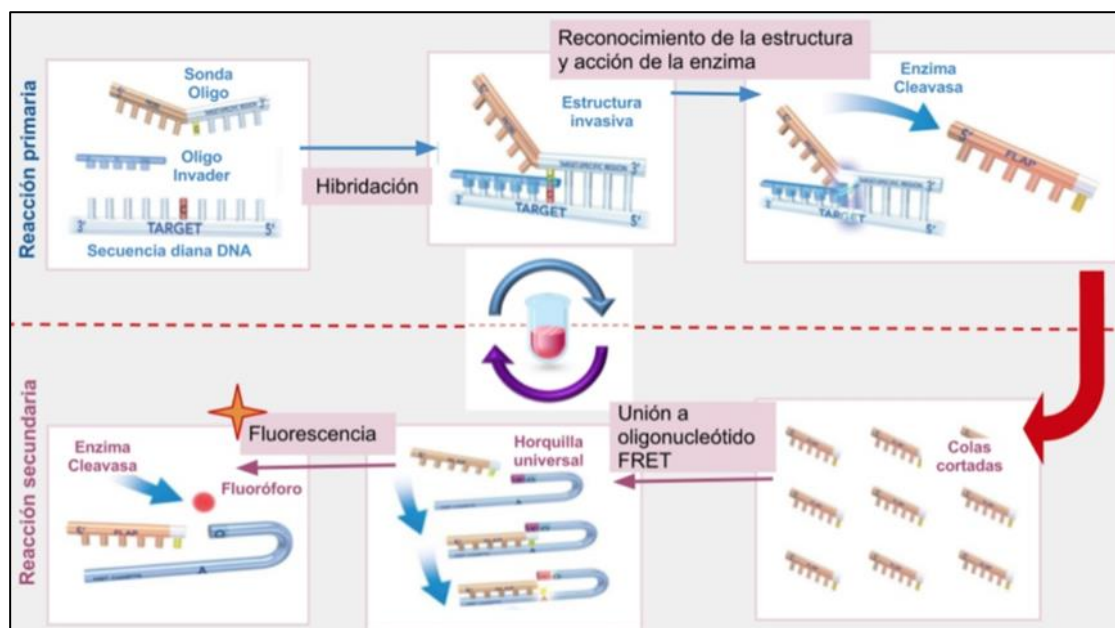


Figura 12. Esquema de la prueba de detección del VPH-AR Cervista™

Un resultado positivo indica que al menos uno de los 14 tipos de alto riesgo está presente en la muestra de ADN. Este resultado está representado por una señal fluorescente FAM, que se encuentra por encima de un valor de corte derivado empíricamente. Para cada reacción, un resultado negativo está representado por una señal fluorescente FAM que se encuentra por debajo de un valor de corte derivado empíricamente. Como medio para determinar la cantidad relativa de muestra de ADN en cada reacción, el HIST2H2BE humano se mide mediante una señal fluorescente roja, que se encuentra por encima de un valor de corte, derivado empíricamente en cada reacción. La medida de esta diana sirve como mecanismo de control de calidad, para confirmar que un resultado negativo no se debe a una muestra insuficiente. Esta diana de control interno también sirve como una medida de procesamiento para garantizar que el procedimiento de la prueba se haya realizado de manera adecuada.

4.4.2. Fase posanalítica

Con la prueba Cervista™ se genera un valor de señal a ruido (señal de la muestra, medida frente a la señal de un pocillo de reacción de control sin diana) para cada una de las tres reacciones. Este valor de señal a ruido se conoce como FOZ (*Fold Over Zero*). Se genera un resultado final positivo, negativo o indeterminado, para cualquier muestra en particular, basándose en el análisis de los tres pocillos de reacción separados. La relación entre los valores obtenidos de VPH y FOZ, generados por las tres mezclas de reacción, determina si una muestra es positiva. La relación VPH FOZ se calcula dividiendo el valor

más alto de VPH FOZ, de cualquiera de las tres mezclas de reacción, entre el valor más bajo de VPH FOZ de las tres. Cuando cualquier valor de FOZ es menor que 1, se redondea a 1 para el cálculo de la relación. Si la relación VPH FOZ es mayor o igual a 1,525, entonces la muestra es positiva para VPH. No obstante, en un subconjunto de infecciones mixtas, los tres pocillos de reacción pueden generar una señal mucho más alta que la de fondo. En algunos casos, estas infecciones mixtas pueden generar señales positivas de intensidad similar en los tres pocillos de reacción y, por lo tanto, una relación VPH FOZ de menos de 1,525. Para evitar la posibilidad de un falso negativo, debido al escenario triple positivo descrito anteriormente, se aplica un segundo cálculo de la siguiente manera: cuando la relación de FOZ es menor que 1,525, pero los tres valores de FOZ de reacción individuales son mayores que un segundo valor de corte de 1,93, la muestra es positiva para VPH. Se puede generar un resultado indeterminado, en tres escenarios diferentes: 1) cuando el % CV entre los valores de FOZ del ADNg es >25,0 % (% CV alto), 2) cuando los tres valores de FOZ del VPH son <0,7 (FOZ del VPH bajo), y 3) cuando el promedio FOZ de ADNg de una muestra negativa es <1,5 (ADNg bajo). De este modo, un resultado indeterminado indica una mezcla insuficiente, un error de pipeteo o un ADNg inadecuado en la muestra (ver figura 13).

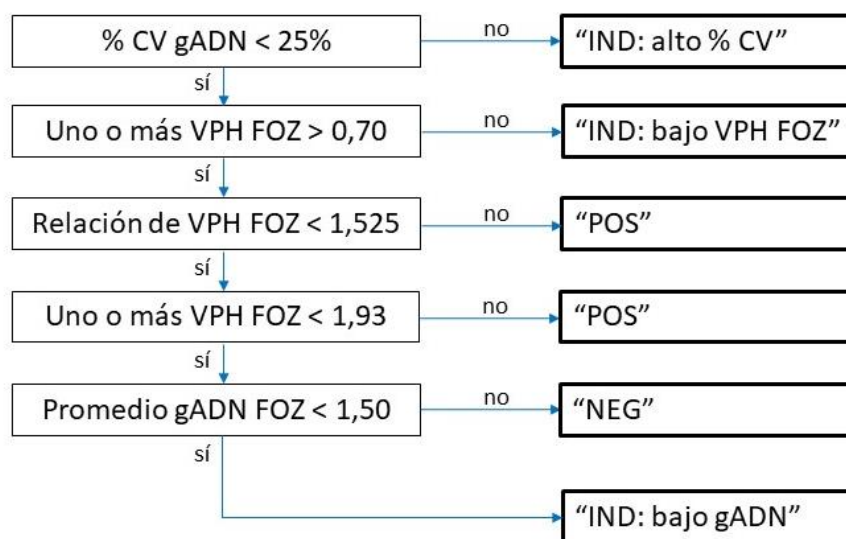


Figura 13. Esquema con posibles resultados (prueba Cervista™)

Posterior a la emisión del resultado automatizado, la interpretación del mismo, según las recomendaciones del fabricante, puede verse en la tabla 4.

Tabla 4. Interpretación de resultados (prueba Cervista™)

Resultados de la prueba Cervista™	Informe de resultados
POSITIVO	Se detecta alguno de los siguientes VPH-AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
NEGATIVO	No se detecta ninguno de los siguientes VPH-AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
INDETERMINADO	Estatus de VPH desconocido

4.5. Estudio inmunocitoquímico TDC p16/ki67

4.5.1. Fase preanalítica

El material residual final de la muestra citológica se utilizó para la técnica de inmunohistoquímica con la tinción dual p16INK4a/ki67 (CINtec® PLUS Cytology kit, Roche mtm laboratories AG, Mannheim, Germany), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El kit está diseñado para realizar un procedimiento de tinción inmunocitoquímica, en dos pasos, en preparaciones de citología cervical. Contiene un cóctel de anticuerpos primarios listos para usar, que consiste de un anticuerpo monoclonal de ratón (clon E6H4), dirigido a la proteína p16INK4a (p16) humana, y un anticuerpo monoclonal de conejo (clon 274-11 AC3), dirigido a la proteína humana ki67.

Se utilizaron otros reactivos listos para usar, constituidos por: 1) un reactivo polimérico conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno (Fab', por sus siglas en inglés *fragment antigen-binding*) de cabra antiratón, y 2) un reactivo polimérico conjugado con fosfatasa alcalina y Fab' de cabra anticonejo.

La conversión mediada por HRP del cromógeno de 3.3'-diaminobencidina (DAB) y la conversión mediada por fosfatasa alcalina del cromógeno «Fast Red» dan lugar a tinción marrón y roja, en los sitios de los antígenos p16 y ki67, respectivamente.

Después de la contratinción con hematoxilina (sin alcohol), fue aplicado un procedimiento de montaje de dos pasos: primero, utilizando un medio de montaje acuoso proporcionado por el kit, para evitar la decoloración de la señal «Fast Red» a base de alcohol, seguido de un paso de montaje permanente.

4.5.2. Fase posanalítica

La TDC p16/ki67 se consideró positiva cuando al menos una célula epitelial coexpresó tinción citoplasmática marrón para p16, junto con una tinción roja nuclear para ki67 (independientemente de su aspecto morfológico). Si este criterio no estaba presente, el resultado de la tinción se consideró negativo. Las preparaciones inmunocitoquímicas de la TDC p16/ki67 fueron evaluadas por técnicos experimentados en citología y revisadas posteriormente por patólogos expertos en citopatología.

4.6. Estudio histológico

4.6.1. Fase preanalítica

De las 1865 mujeres incluidas en el estudio, se seleccionaron 304 que fueron sometidas a colposcopia y toma de biopsia, con la posterior revisión y registro de los resultados de dichos informes.

Las biopsias fueron realizadas durante los procedimientos de rutina de colposcopia. De forma general, y tomando en cuenta lo concerniente a nuestro estudio, los criterios de selección para colposcopia y biopsia en nuestro programa de cribado fueron:

- a) Mujeres con edad igual o mayor de 25 años, con citología anormal y resultado positivo para la determinación de VPH-AR.
- b) Mujeres menores de 25 años con diagnóstico de ASCUS o LSIL *persistentes* (al menos dos citologías con alguno de estos diagnósticos), con resultado positivo para la determinación de VPH-AR.
- c) Mujeres de cualquier edad, con citología de HSIL o CCE.

Algunas mujeres con citología negativa para lesión intraepitelial o malignidad (NLIM) también fueron sometidas a colposcopia y biopsia, basándose en la presencia de factores de alto riesgo, considerados por el médico responsable (a saber: inmunosupresión, inicio de las relaciones sexuales a edad temprana, múltiples parejas sexuales, etc.).

La toma de muestras se realizó con pinza de biopsia, mediante el procedimiento de colposcopia rutinario. Todas las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10 % y fueron embebidas en parafina mediante técnicas convencionales. Se realizaron secciones histológicas a 4-5 μ , que posteriormente fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

4.6.2. Fase posanalítica

Las preparaciones histológicas fueron evaluadas por patólogos expertos, que formaban parte de la plantilla fija del Complejo Hospitalario de Navarra.

Para el propósito de este estudio, los informes histológicos fueron categorizados según la clasificación de la OMS¹⁴, utilizando los términos de: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) y carcinoma de células escamosas (CCE). Hemos utilizado el término NIC2+ que se refiere a un resultado de HSIL y/o CCE en la biopsia. Para la evaluación de los resultados, en mujeres con más de una biopsia, fue tomado en cuenta el diagnóstico más severo durante el período de seguimiento.

4.7. Análisis estadístico

Tras la revisión y depuración de la base de datos, para la realización del análisis estadístico, se aplicaron principalmente técnicas descriptivas univariantes y bivariantes. El análisis descriptivo univariante de las variables cuantitativas incluyó el cálculo de medias, medianas y percentiles, así como el de medidas de dispersión (rango y desviación típica). En el caso de las variables cualitativas, estas se describieron utilizando tablas de frecuencias (absolutas y porcentajes, tanto relativos como acumulados).

El rendimiento de la citología sola y la TDC p16/ki67 para detectar NIC2+ entre las mujeres VPH-positivas se analizó mediante el cálculo de su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), con intervalos de confianza (IC) del 95 %. Se utilizó, además, la prueba de McNemar para comparar las diferencias en la detección de la enfermedad (NIC2+) entre la citología sola y la TDC p16/ki67. Un valor de p menor que 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

El análisis estadístico se realizó con Minitab 17 Statistical Software.

Los análisis estadísticos más relevantes se acompañan de representaciones gráficas que ilustran las distintas cuestiones abordadas. Para la obtención de dichas representaciones gráficas se utilizó Microsoft Office Excel, Microsoft PowerPoint y Microsoft Office Word.

5. Resultados

5.1. Descripción general

A continuación, se presenta un esquema (ver figura 14) que integra el total de mujeres y el número de ellas a las que se realizó cada prueba.

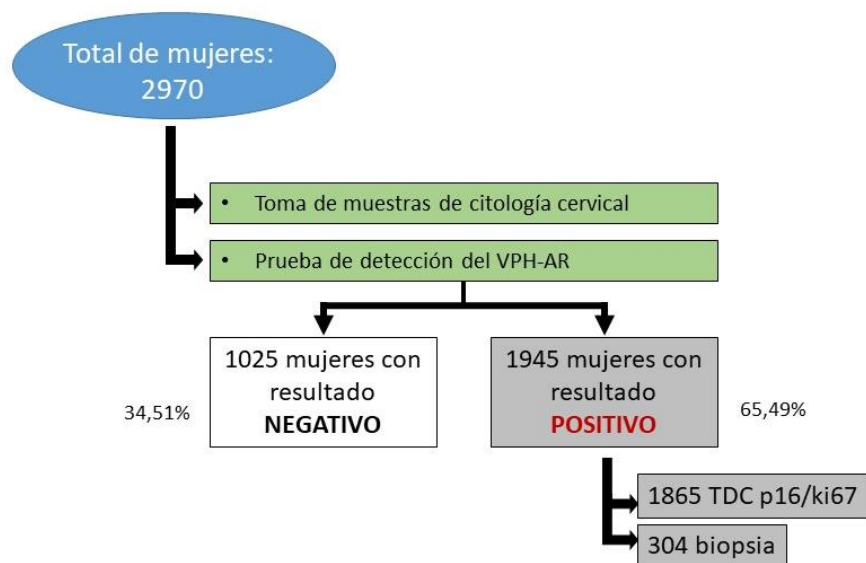


Figura 14. Esquema del total de mujeres y pruebas realizadas

5.1.1. Edad

De las 2970 mujeres seleccionadas inicialmente para el estudio, la edad promedio fue 32,78 años, con un rango entre 14 y 85 años. El número de mujeres ≥ 30 años (1680; 56,57 %) fue superior que las < 30 años (1290; 43,43 %), como se ve reflejado en la figura 15.

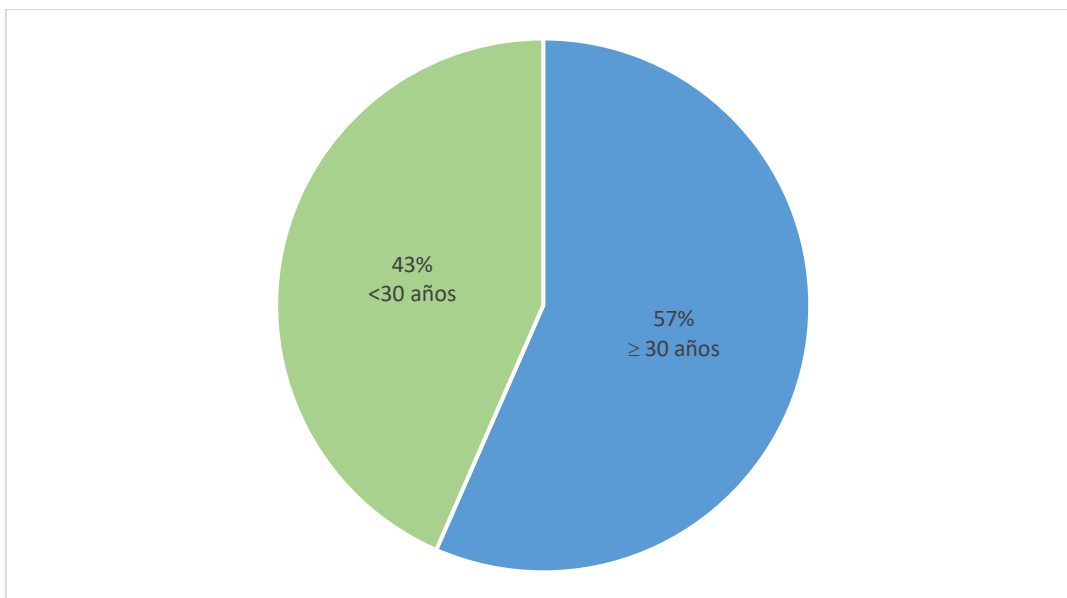


Figura 15. Estratificación de la muestra según grupos de edades

5.1.2. Resultados citológicos globales

El diagnóstico citológico más frecuente fue de LSIL en 1431 mujeres, seguido por: ASCUS (en 1213), NILM (en 202), HSIL (en 118) y CCE (en 6) (ver figura 16).

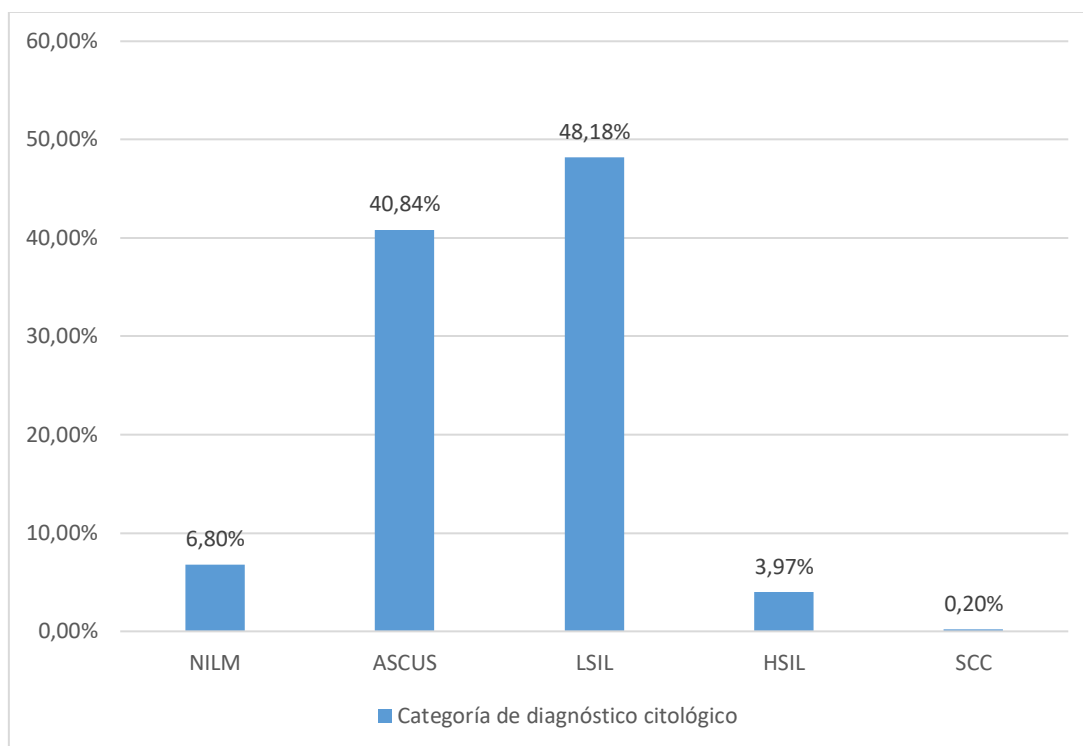


Figura 16. Resultados citológicos generales

Abreviaturas: NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

5.2. Mujeres con resultado positivo para la prueba de detección de ADN del VPH

5.2.1. Edad

Dentro del grupo de mujeres VPH-positivas, el 53,78 % tenían ≥ 30 años y el 46,22 % eran menores de 30 años. Al considerar como punto de corte la edad de 35 años (de acuerdo al reciente BOE), estos porcentajes cambian, observándose una mayoría de pacientes menores de 35 años, tal como se puede observar en la figura 17.

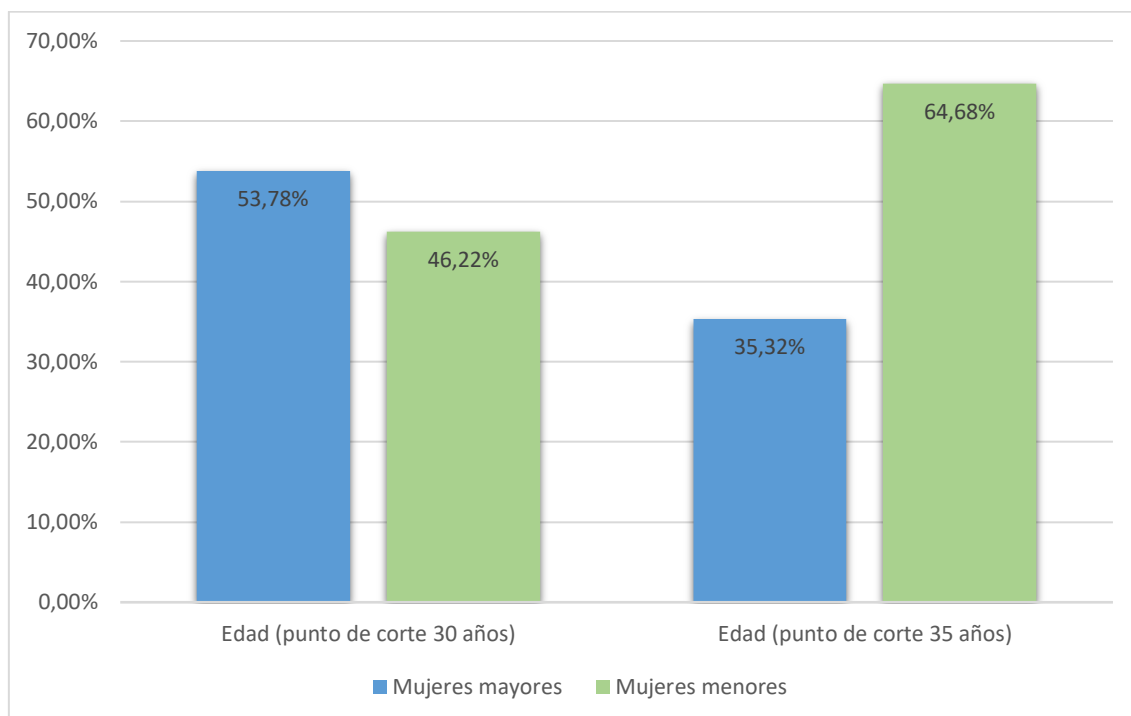


Figura 17. Estratificación según grupos de edades, de las mujeres con resultado positivo para la prueba de detección del VPH

5.2.2. Grupos/MIX del VPH

De todas las mujeres VPH-positivas (1945), se pudo determinar el grupo (MIX) de VPH responsable de la infección en 1940 de ellas. Como se ve reflejado en la figura 18, el más frecuente como grupo único fue el MIX3 (incluye VPH **16**, 31, 33, 35, 52 y 58), en el 31,60 % de los casos, seguido del MIX1 (incluye VPH **51**, 56 y 66) en el 24,33 %, y, por último, el MIX2 (incluye VPH **18**, 39, 45, 59 y 68) en el 10,62 %. En el resto de los casos, la infección estuvo causada por dos o más grupos/MIX de VPH.

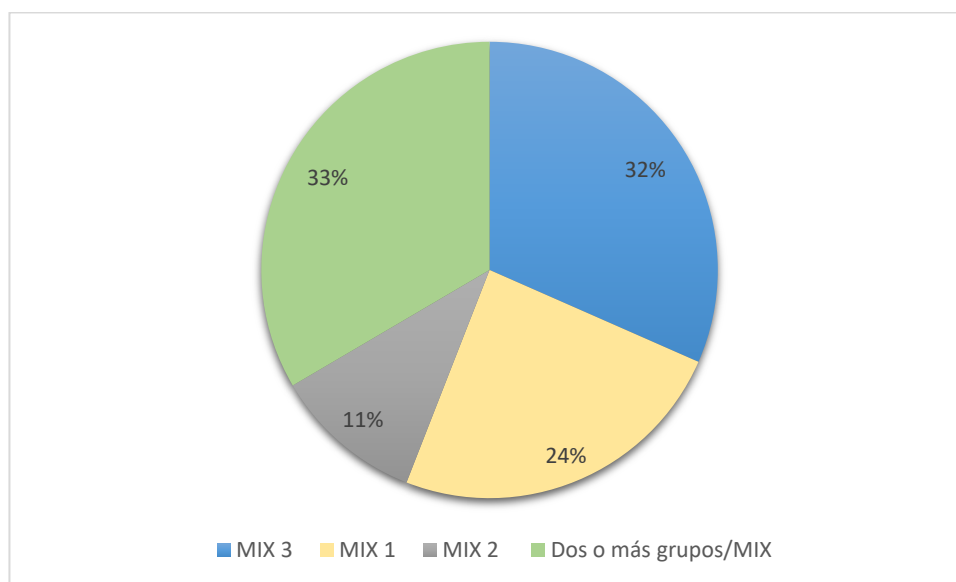


Figura 18. Grupo (MIX) de VPH responsable de la infección

5.2.3. Resultados citológicos

Con respecto al diagnóstico citológico inicial de las mujeres VPH-positivas, la tendencia de los resultados es similar a la del total de mujeres, pero con cifras más bajas; observándose que el 89,61 % de ellas tenían algún resultado anormal en la citología inicial, y el 10,39 % restante fueron NILM (ver figura 19).

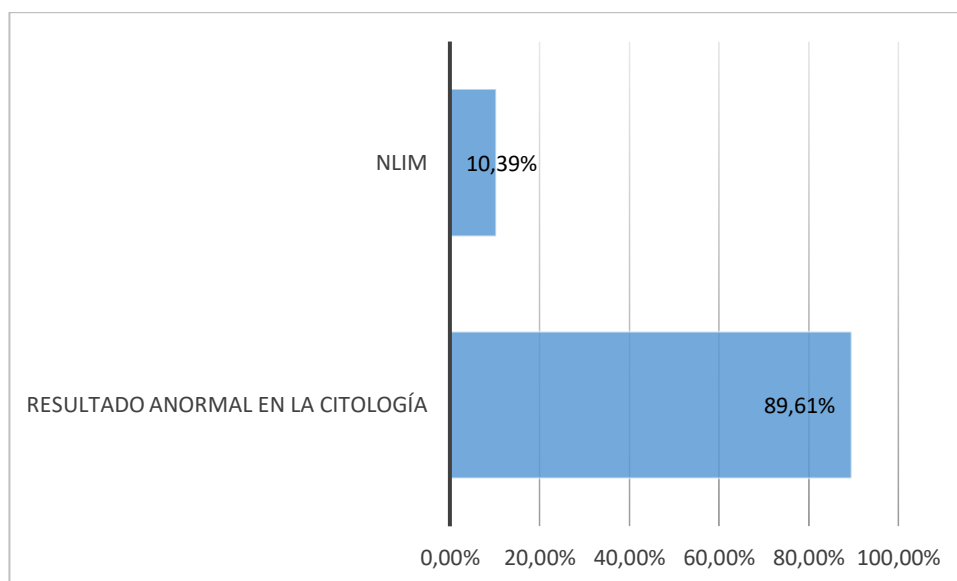


Figura 19. Relación de resultados citológicos (normales vs. anormales) en mujeres VPH-positivas
 Abreviatura: NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad.

El diagnóstico citológico más frecuente entre ellas fue LSIL, observado en 1081 mujeres (lo cual representa el 62,02 % de mujeres con alguna anomalía citológica). El segundo diagnóstico más frecuente fue ASCUS (en 545 mujeres), seguido por HSIL (en 111 mujeres) y CCE (en 6 mujeres) (para porcentajes, ver figura 20).

5.3. Mujeres con resultado negativo para la prueba de detección de ADN del VPH

5.3.1. Edad

El 61,85 % de las mujeres con resultado negativo para detección de ADN-VPH tenían edad igual o mayor a 30 años, y el 38,15 % restante eran menores de 30 años.

5.3.2. Resultados citológicos

El diagnóstico citológico más frecuente entre las mujeres VPH-negativas fue ASCUS (65,17 %), seguido de LSIL (34,15 %) y de HSIL (0,68 %). No hubo ningún caso de CCE ni de NILM (ver figura 20).

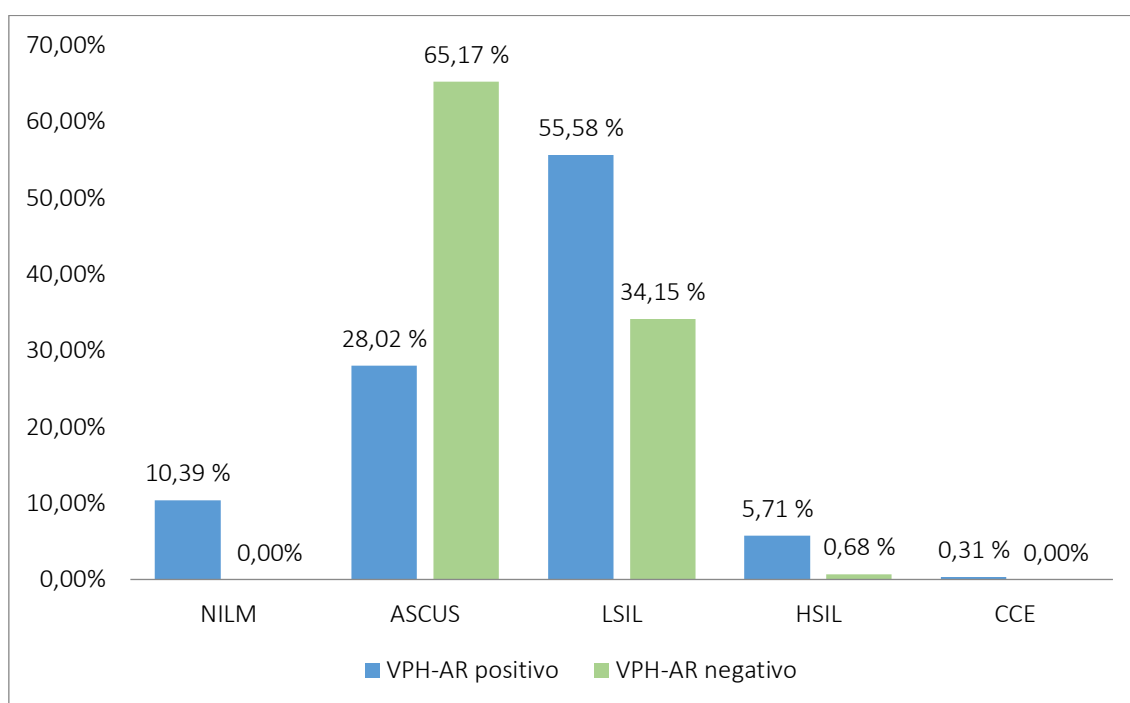


Figura 20. Resultados citológicos, según resultados de la prueba de detección de VPH

Abreviaturas: NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

5.4. Tinción dual citológica p16/ki67

5.4.1. Resultados generales

Del total de 1865 mujeres VPH-positivas, a quienes se les realizó la TDC p16/ki67, se observó que: el 60,91 % (1136) tuvo un resultado negativo para dicha tinción, y el 39,09 % de ellas resultaron positivas para la prueba (729) (ver figura 21).

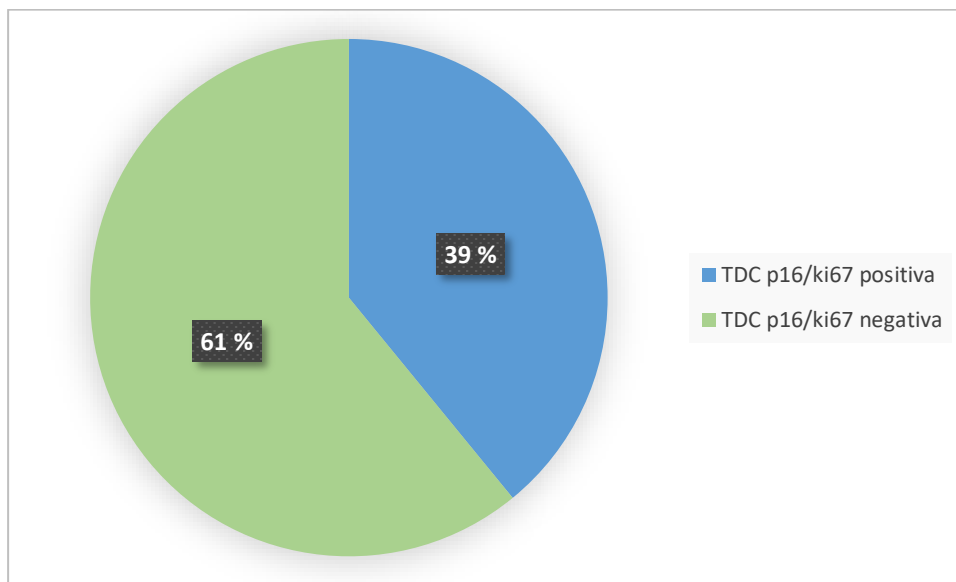


Figura 21. Porcentaje de resultados de la TDC p16/ki67 en la muestra

5.4.2. Edad

El porcentaje de mujeres ≥ 30 años (53,24 %) fue ligeramente superior que las < 30 años (46,76 %), similar a lo observado en el grupo de mujeres VPH-positivas (figura 17).

5.4.3. Resumen de resultados citológicos

Tanto en las mujeres con TDC p16/ki67 positiva, como en el grupo de mujeres con resultado negativo para dicha prueba, el diagnóstico citológico más frecuente fue de LSIL, seguido de ASCUS.

En el grupo de mujeres ≥ 30 años, el porcentaje de HSIL en la citología inicial fue de 8,36 %, con 4 casos (0,40 %) de CCE. En el grupo de < 30 años, el porcentaje de HSIL como diagnóstico citológico inicial fue de 2,87 %, sin categorizarse ningún caso como CCE (ver figura 22).

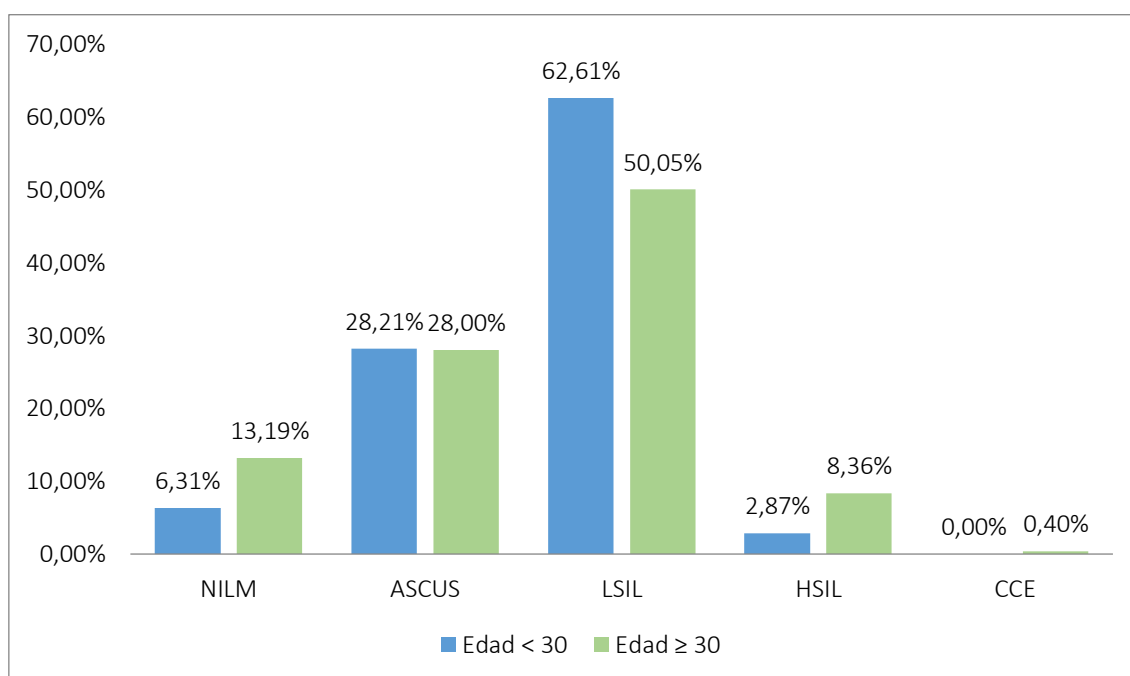


Figura 22. Diagnóstico citológico en mujeres VPH-positivas con TDC p16/ki67 disponible, según el grupo de edad

Abreviaturas: NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

En la tabla 5 y en la figura 23 se ven reflejados los resultados de la TDC p16/ki67, en relación con los resultados citológicos. El aspecto más importante a mencionar es que en el grupo de mujeres con TDC p16/ki67 negativas, no hubo ningún caso de CCE y el

porcentaje de HSIL fue realmente bajo (2,11 %), comparado con el grupo de mujeres con TDC p16/ki67 positivas (11,52 %).

Tabla 5. Resultados de la TDC p16/ki67, según el diagnóstico citológico

TDC p16/ki67	NILM n.º (%)	ASCUS n.º (%)	LSIL n.º (%)	HSIL n.º (%)	CCE n.º (%)	TOTAL n.º (%)
Positiva	23 (12,37 %)	137 (26,15 %)	481 (46,12 %)	84 (77,78 %)	4 (100 %)	729 (39,09 %)
Negativa	163 (87,63 %)	387 (73,85 %)	562 (53,88 %)	24 (22,22 %)	0 (0,00 %)	1136 (60,91 %)
TOTAL	186 (100 %)	524 (100 %)	1043 (100 %)	108 (100 %)	4 (100 %)	1865 (100 %)

Abreviaturas: TDC: tinción dual citológica; NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

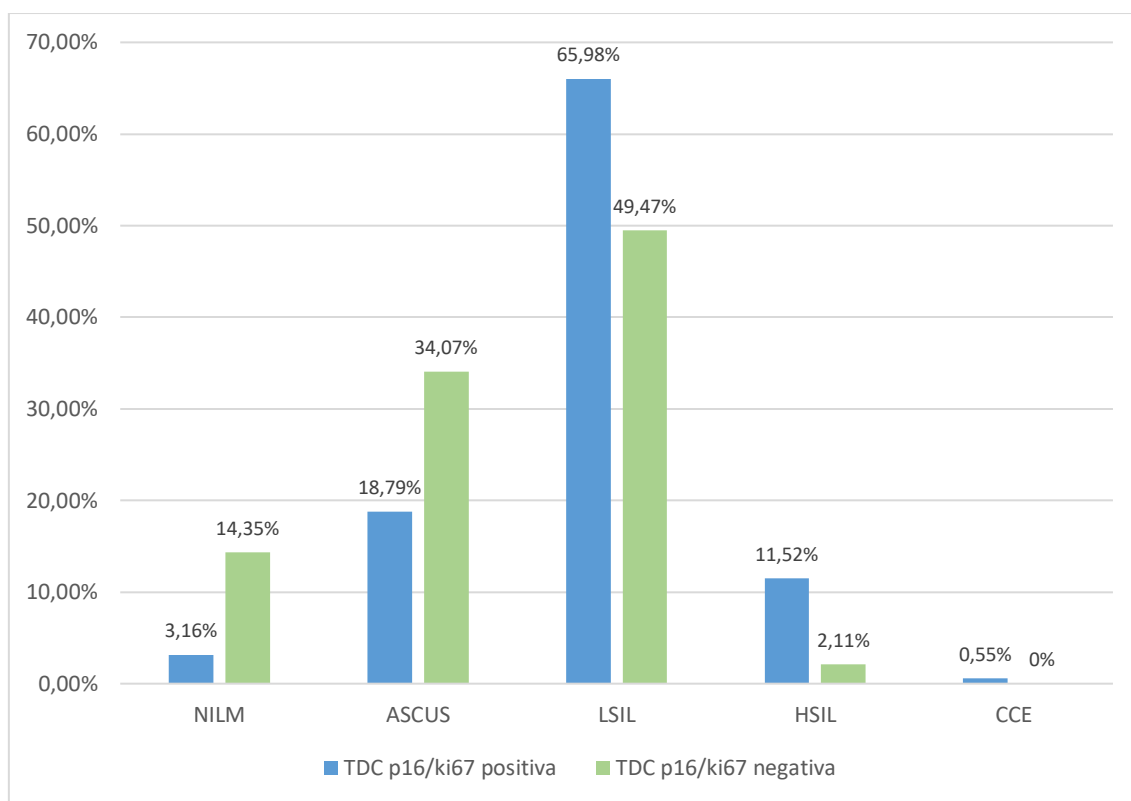


Figura 23. Resultados de la TDC p16/ki67, según el diagnóstico citológico

Como se destaca en la figura 24, se observó que el porcentaje de mujeres positivas para la TDC p16/ki67 se va incrementando en categorías citológicas de mayor gravedad, a saber: 12,4 % en NILM, 26,2 % en ASCUS, 46,1 % en LSIL, 77,8 % en HSIL y 100 % en CCE.

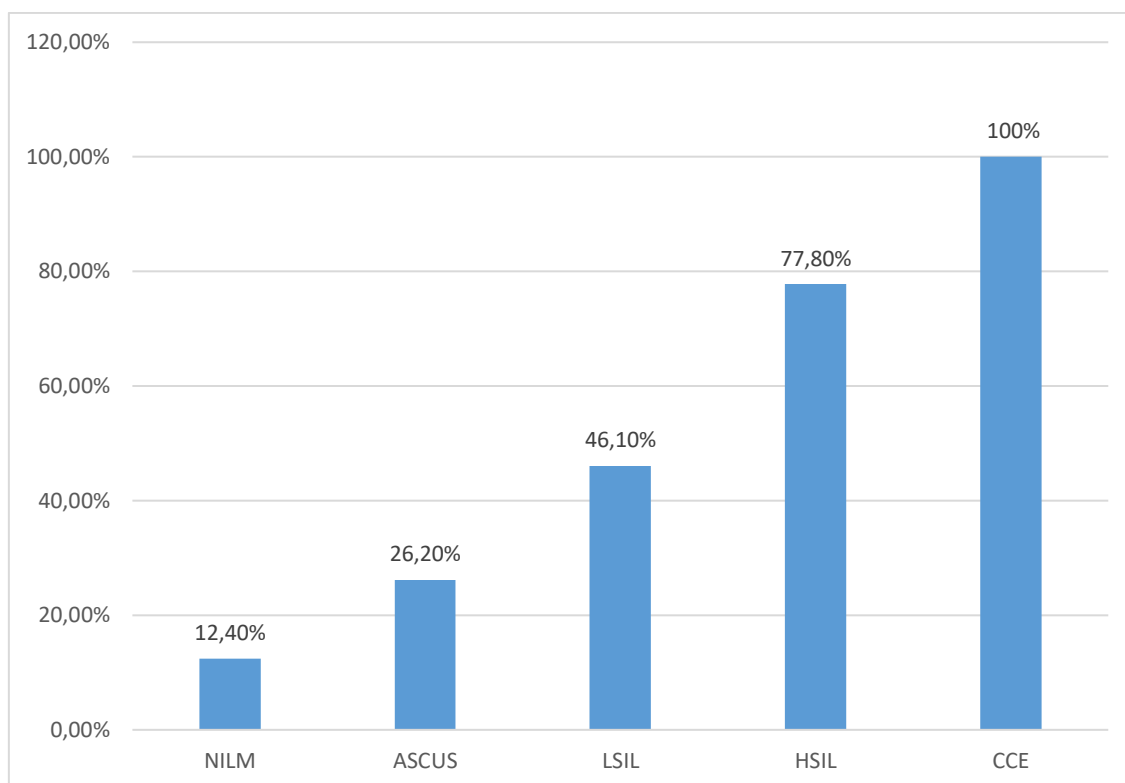


Figura 24. Incremento de la positividad para la TDC p16/ki67, según la gravedad del diagnóstico citológico

5.5. Biopsia

5.5.1. Tiempo transcurrido entre el diagnóstico citológico inicial y el diagnóstico histológico

Los diagnósticos histológicos se emitieron en un promedio de 274,5 días (IC 95 %, 243,90-305,04) (rango 0-1502 días), después del diagnóstico de la citología inicial.

5.5.2. Edad

Dentro del grupo de mujeres que fueron referidas a colposcopia y biopsia, la edad promedio fue 33,67 años, con un rango de entre 15 y 85 años (desviación estándar de 10,90). El 57,38 % de estas mujeres tenían ≥ 30 años y el 42,62 % < 30 años. Si tomamos en cuenta como punto de corte la edad de 35 años, tenemos que: el 57,89 % de las mujeres tenían < 35 años de edad y el 42,11 % ≥ 35 años.

5.5.3. Diagnósticos histológicos

Se observó un resultado anormal en la biopsia en el 83,88 % del total de estas mujeres. El 50,33 % tuvo LSIL, el 31,91 % HSIL y el 1,64 % CCE. En la figura 25 se detallan los resultados de la biopsia, según el grupo de edad.

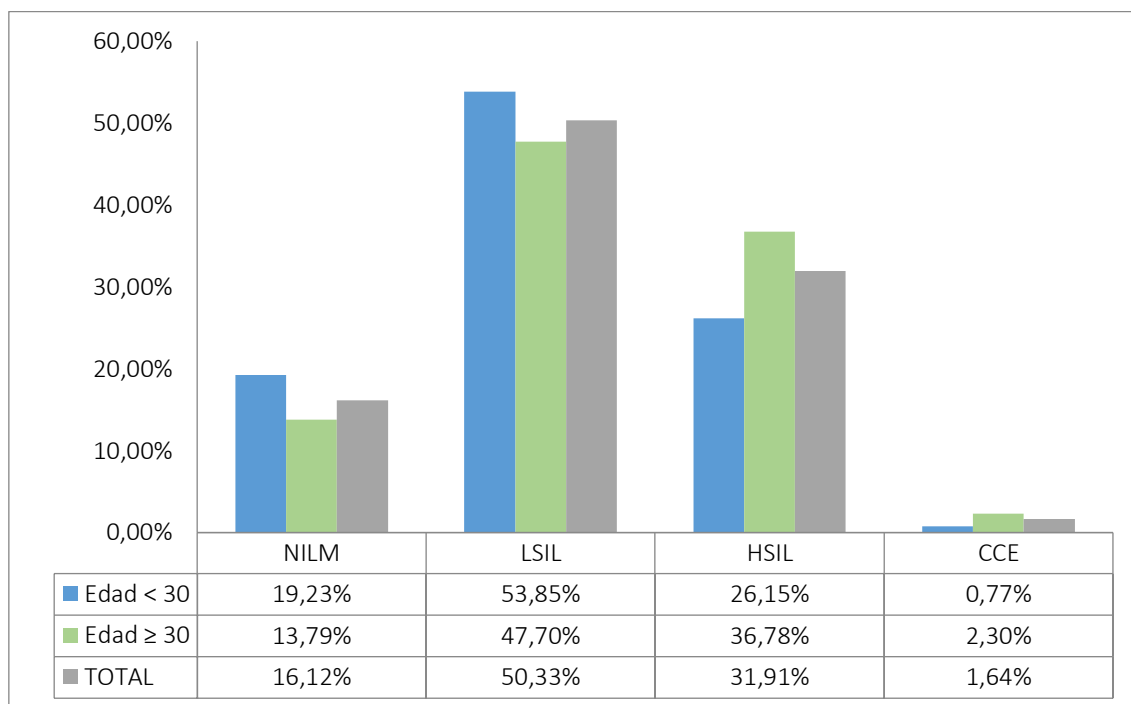


Figura 25. Resultados de la biopsia, según el grupo de edad

Abreviaturas: NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

5.5.4. Diagnóstico citológico inicial

Con respecto al diagnóstico citológico inicial de las mujeres que fueron biopsiadas, tenemos que el 78,62 % (239) tuvo un resultado citológico inicial de ASCUS y/o LSIL. De ellas, solo el 25,10 % (60) tuvo CIN2+ en la biopsia. Un 16,45 % (50) tuvo resultado citológico inicial de HSIL y/o CCE. De ellas, el 82 % tuvo CIN2+ en la biopsia. El 4,93 % restante (15) tuvo resultado citológico inicial de NILM. De ellas, solo una paciente tuvo CIN2+ en la biopsia (6,67 %) (ver figura 26).

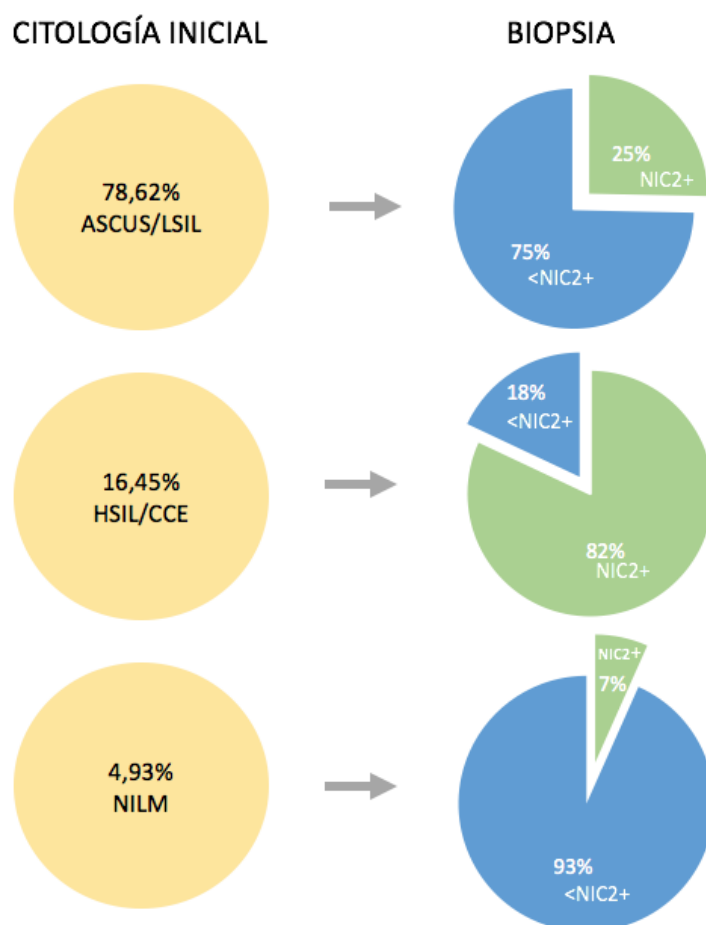


Figura 26. Correlación entre el diagnóstico citológico inicial y el diagnóstico histológico

Abreviaturas: NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas; NIC2+: resultado en biopsia de lesión escamosa intraepitelial de alto grado y/o carcinoma de células escamosas.

5.5.5. Resultados de la TDC p16/ki67 y categorización según grupos de edades

El 73,36 % de las mujeres a quienes se les realizó biopsia (223/304) tuvo un resultado positivo para la TDC p16/ki67. El 55,16 % de ellas tenían edad igual o mayor a 30 años y el 44,84 % tenían menos de 30 años.

El 26,64 % restante (81 mujeres) tuvo un resultado negativo. El 62,96 % de ellas tenían 30 años de edad o más, y el 37,04 % eran menores de 30 años.

En la figura 27 se puede observar la distribución de los resultados de la TDC p16/ki67, según los grupos de edad.

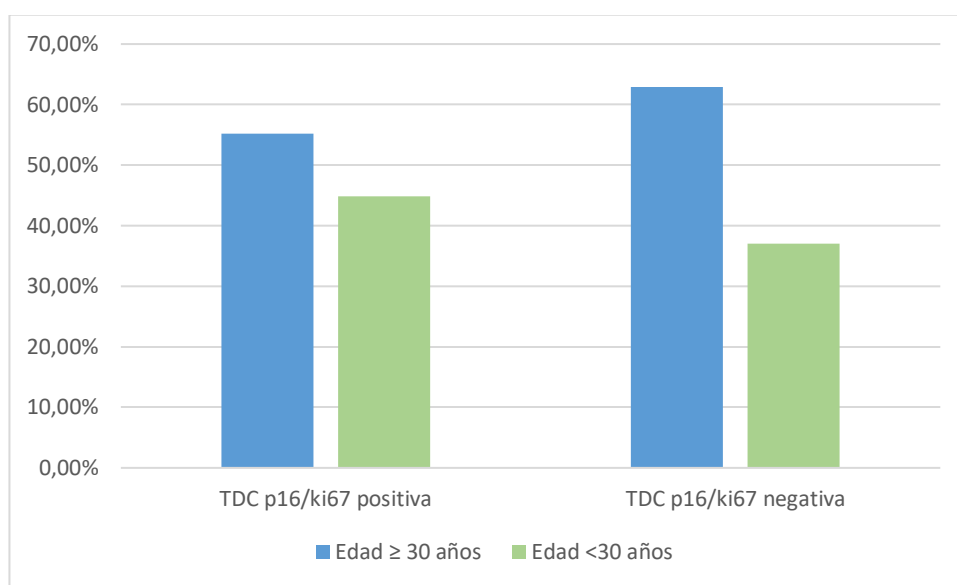


Figura 27. Resultados de la TDC p16/ki67, según el grupo de edad

5.5.6. Mujeres con resultado histológico de NIC2+

Solamente el 33,55 % del total de mujeres biopsiadas (102/304) tuvo un resultado en la biopsia de HSIL/CCE (ver figura 28).

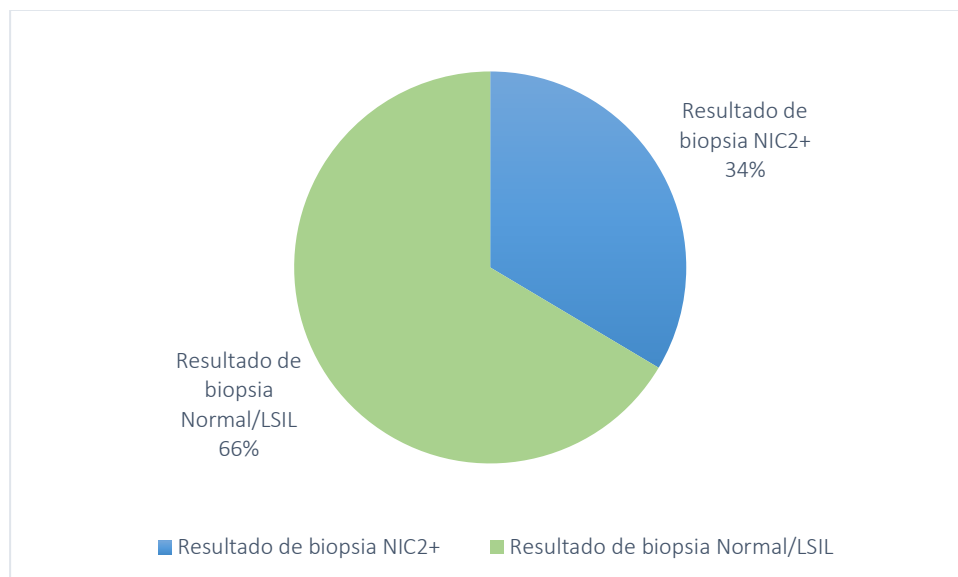


Figura 28. Estratificación de resultados de las biopsias, según NIC2+ o <NIC2+

5.5.6.1. Edad

La edad promedio entre ellas fue de 33,90 años, con un rango entre 19 y 85 años (desviación típica de 10,39 años). El 65,69 % tenían ≥ 30 años y el 34,31 % < 30 años. Si tomamos en cuenta como punto de corte los 35 años de edad, tenemos que: el 43,14 % tenían ≥ 35 años y el 56,86 % < 35 años.

5.5.6.2. Resultados citológicos iniciales

De las 102 mujeres con NIC2+, solo una de ellas tuvo citología inicial de NILM (0,98 %). La distribución de los diagnósticos citológicos iniciales en el resto de mujeres con NIC2+ se refleja en la figura 29 y se detalla a continuación: LSIL en un 47,06 %, HSIL en un 38,24 %, ASCUS en el 11,76 % y CCE en el 1,96 %.

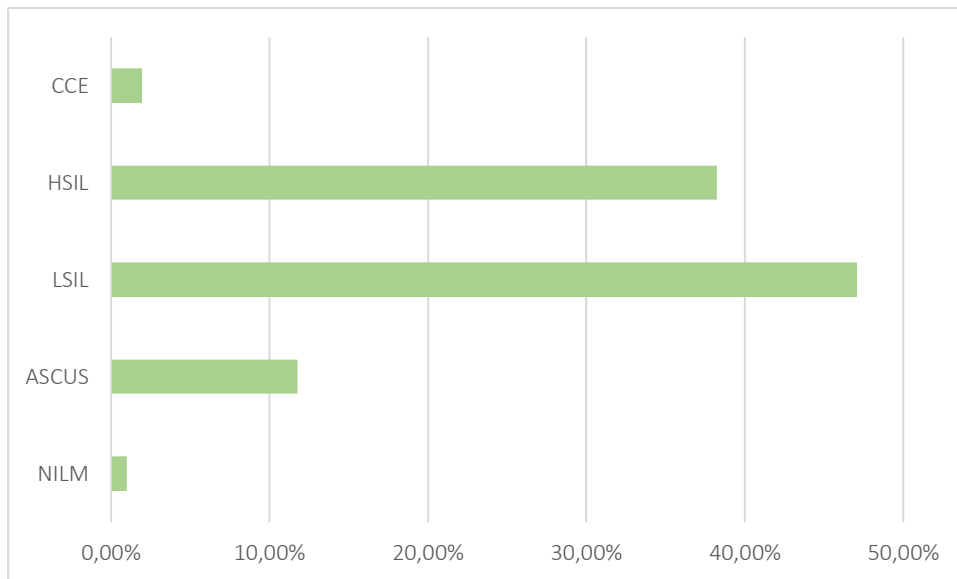


Figura 29. Estratificación de resultados de los diagnósticos citológicos iniciales en mujeres con NIC2+

5.5.6.3. TDC p16/ki67

El 98,04 % de las mujeres con NIC2+ (100/102) tuvo un resultado positivo para la TDC p16/ki67, como se puede observar en la figura 30.

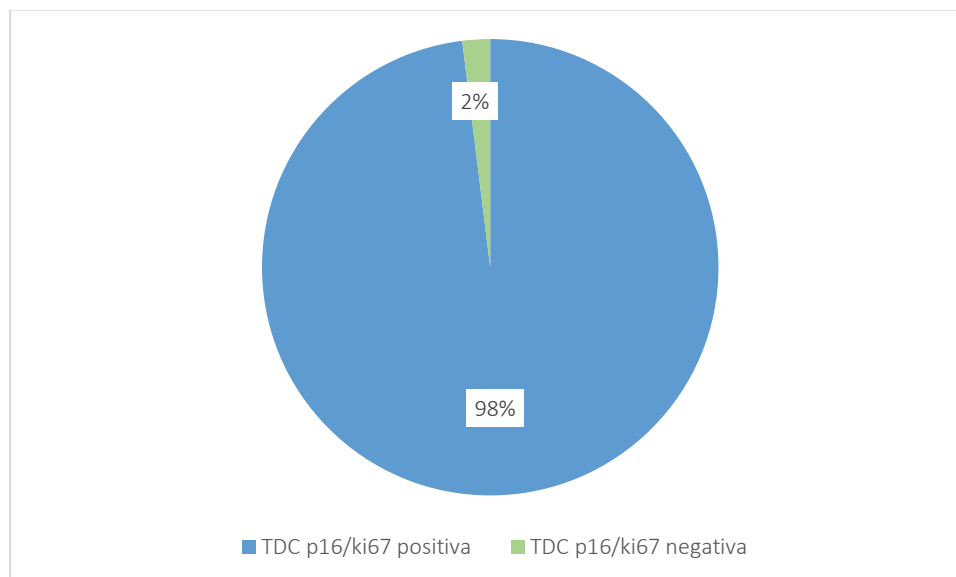


Figura 30. Resultados de la TDC p16/ki67 en mujeres con NIC2+

5.6. Resultados integrados de la TDC p16/ki67, biopsia y citología inicial, en el subgrupo de mujeres VPH-positivas

En las tablas 6 y 7 se puede observar el diagnóstico citológico inicial de las mujeres sometidas a biopsia, de acuerdo con los resultados de la TDC p16/ki67 y el punto final histológico.

Tabla 6. Diagnóstico citológico en correlación con la biopsia, en mujeres con resultado positivo para la TDC p16/ki67

Citología	TDC p16/ki67 POSITIVA				
	Biopsia				Total n.º (%)
	Normal n.º (%)	LSIL n.º (%)	HSIL n.º (%)	CCE n.º (%)	
NILM	1 (3,70 %)	3 (3,13 %)	1 (1,05 %)	0 (0 %)	5 (2,24 %)
ASCUS	4 (14,81 %)	11 (11,46 %)	11 (11,58 %)	0 (0 %)	26 (11,66 %)
LSIL	18 (66,67 %)	79 (82,29 %)	46 (48,42 %)	1 (20 %)	144 (64,57 %)
HSIL	4 (14,81 %)	3 (3,13 %)	36 (37,89 %)	3 (60 %)	46 (20,64 %)
CCE	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (1,05 %)	1 (20 %)	2 (0,90 %)
Total	27	96	95	5	223

Abreviaturas: TDC: tinción dual citológica; NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

Tabla 7. Diagnóstico citológico en correlación con la biopsia, en mujeres con resultado negativo para la TDC p16/ki67

Citología	TDC p16/ki67 NEGATIVA				
	Biopsia				Total n.º (%)
	Normal n.º (%)	LSIL n.º (%)	HSIL n.º (%)	CCE n.º (%)	
NILM	6 (27,27 %)	4 (7,02 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	10 (12,35 %)
ASCUS	5 (22,73 %)	11 (19,30 %)	1 (50 %)	0 (0 %)	17 (20,99 %)
LSIL	11 (50 %)	40 (70,18 %)	1 (50 %)	0 (0 %)	52 (64,20 %)
HSIL	0 (0 %)	2 (3,51 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (2,47 %)
CCE	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Total	22	57	2	0	81

Abreviaturas: TDC: tinción dual citológica; NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CCE: carcinoma de células escamosas.

Desde una perspectiva general, y a modo de resumen, se destaca que:

- El 44,8 % de las mujeres con resultado positivo para la TDC p16/ki67 tuvo NIC2+.

- El 2,9 % de las mujeres con resultado negativo para la TDC p16/ki67 tuvo NIC2+ (ambas con resultado de HSIL; no hubo CCE). Los resultados citológicos iniciales de estas mujeres fueron ASCUS y LSIL, respectivamente.

5.7. Resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos

5.7.1. Citología sola

En la población estudio, la citología tuvo una alta sensibilidad (99,02 %) y un alto VPN (93,33 %) para la detección de NIC2+ entre las mujeres VPH-positivas, con una especificidad y un VPP bajos (6,93 % y 34,95 %, respectivamente).

En la tabla 8 se pueden observar los datos obtenidos para la citología, según el grupo de edad, tomando en cuenta como puntos de corte los 30 y los 35 años.

Tabla 8. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la citología, según grupo de edad

Edad	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
≥35 años	100 %	8,33 %	100 %	36,36 %
<35 años	98,28 %	5,93 %	87,5 %	33,93 %
≥30 años	98,51 %	6,54 %	87,5 %	39,76 %
<30 años	100 %	7,37 %	100 %	28,46 %

Abreviaturas: VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

5.7.2. TDC p16/ki67

La TDC p16/ki67 tuvo también una sensibilidad alta (98,04 %) en la población en estudio, con un alto VPN (97,53 %), observándose una especificidad del 39,11 % y un VPP del 44,84 %, respectivamente.

5.7.2.1. TDC p16/ki67 según las categorías citológicas

La mayor sensibilidad y VPN de la TDC p16/ki67 para predecir NIC2+ se observó entre las mujeres con citología NILM, seguido de LSIL y ASCUS. Los resultados de los valores predictivos, sensibilidad y especificidad de la TDC p16/ki67 (para detectar NIC2+), de acuerdo con las categorías citológicas, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, según las categorías citológicas

p16/ki67	VP	FP	VN	FN	Sensibilidad % (95 % IC)	Especificidad % (95 % IC)	VPP % (95 % IC)	VPN % (95 % IC)
NILM	1	4	10	0	100 % (50-100)	71,42 % (41,9-91,6)	20,00 % (0,51-71,6)	100 % (74,1-100)
ASCUS	11	15	16	1	91,67 % (61,5-99,8)	51,61 % (33,1-69,8)	42,31 % (23,4-63,1)	94,12 % (71,3-99,9)
LSIL	47	97	51	1	97,92 % (88,9-100)	34,46 % (26,8-42,7)	32,64 % (25,1-40,9)	98,08 % (89,7-100)

Abreviaturas: VP: casos verdaderos positivos; FP: casos falsos positivos; VN: casos verdaderos negativos; FN: casos falsos negativos; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CI: intervalo de confianza.

5.7.2.2. TDC p16/ki67 según grupo de edad

En la tabla 10 se pueden observar los datos de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de la TDC p16/ki67, según el grupo de edad, tomando en cuenta ambos puntos de corte (30 y 35 años). La mayor sensibilidad y VPN se observó en las mujeres de menor edad (independientemente del punto de corte), con mayor especificidad y VPP en mujeres ≥ 30 años.

Tabla 10. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, según grupo de edad

Edad	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
≥ 35 años	95,45 %	41,67 %	94,59 %	46,15 %
<35 años	100 %	37,29 %	100 %	43,94 %
≥ 30 años	97,01 %	45,79 %	96,08 %	52,84 %
<30 años	100 %	31,58 %	100 %	35 %

Abreviaturas: VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

5.7.2.3. TDC p16/ki67 según grupo de edad y categoría citológica

En las tablas 11 y 12 se reflejan los datos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, en los subgrupos de mujeres con edad mayor o igual a 35 años y <35 años, respectivamente.

Tabla 11. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, en mujeres ≥ 35 años, según categoría citológica

Categoría citológica	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
NLIM	0 %	57,4 %	100 %	0 %
ASCUS	80 %	60 %	85,71 %	50 %
LSIL	94,74 %	37,7 %	95,83 %	32,14 %

Abreviaturas: VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

Tabla 12. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67, en mujeres < 35 años, según categoría citológica

Categoría citológica	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
NLIM	100 %	85,71 %	100 %	50 %
ASCUS	100 %	47,62 %	100 %	38,89 %
LSIL	100 %	32,18 %	100 %	32,95 %

Abreviaturas: VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

5.7.3. TDC p16/ki67 vs. citología sola

La TDC p16/ki67 tuvo una sensibilidad ligeramente menor que la citología sola para la detección de NIC2+ en mujeres VPH-positivas (98,04 % vs. 99,02 %), con un VPN y una especificidad más altos (97,53 % vs. 93,33 % y 39,11 % vs. 6,93 %, respectivamente). Esto se puede observar en detalle en la tabla 13.

Tabla 13. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la citología y de la TDC p16/ki67

Test	VP	FP	VN	FN	Sensibilidad % (95 % CI)	Especificidad % (95 % CI)	VPP % (95 % CI)	VPN % (95 % CI)
Citología	101	188	14	1	99,02 % (94,7-100)	6,93 % (3,8-11,4)	34,95 % (29,5-40,8)	93,33 % (68,1-99,8)
p16/ki67	100	123	79	2	98,04 % (93,1-99,8)	39,11 % (32,3-46,2)	44,84 % (38,2-51,6)	97,53 % (91,4-99,7)

Abreviaturas: VP: casos verdaderos positivos; FP: casos falsos positivos; VN: casos verdaderos negativos; FN: casos falsos negativos; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CI: intervalo de confianza.

En este estudio, la diferencia entre la citología convencional y la TDC p16/ki67, para detectar NIC2+, fue estadísticamente significativa ($p = 0,000$) (IC del 95 %: 0,1563-0,2648). Por lo tanto, podemos decir con una confianza del 95 % que la TDC p16/ki67 tuvo entre un 15,63 % y un 26,48 % más de coincidencias con el criterio de valoración de referencia (biopsia) que la citología. En esta cohorte de mujeres, hubo un 21,05 % más de coincidencias entre la TDC p16/ki67 y la biopsia que entre la citología y la biopsia.

Visto de otra forma, la TDC p16/ki67 coincidió con la biopsia en 179 de las 304 mujeres (58,88 %) y con la citología en 115 de 304 (37,83 %).

6. Discusión

En la actualidad, muchos países se encuentran en la transición entre el cribado primario de CC basado en citología hacia las pruebas de detección de VPH-AR, o una combinación de ambas (cotest).

La mayoría de las mujeres con resultados positivos para el VPH eliminan el virus de forma espontánea, y no desarrollan enfermedad cervical clínicamente relevante²¹, por lo que no todas ellas deben ser derivadas a colposcopia¹⁸. Es necesario un sistema adicional de triaje para identificar el subgrupo de mujeres VPH-positivas que desarrollarán NIC2+, y de ese modo, reducir el riesgo de sobrediagnóstico, derivaciones innecesarias y tratamientos excesivos^{12,20,29}.

En España, actualmente, el método de triaje secundario recomendado por el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social es la citología cervical. Sin embargo, existen datos en la literatura de que la TDC p16/ki67 es una técnica más objetiva y de fácil realización, que puede ser de gran valor para este fin.

A continuación, iremos comentando y discutiendo los puntos más importantes de los resultados encontrados en nuestro estudio, contrastándolos con los datos de la literatura.

6.1. Papel de la TDC p16/ki67 como método de triaje secundario en mujeres VPH-positivas, residentes en Navarra

En el presente estudio se observó que la TDC p16/ki67 es una herramienta útil que mejora significativamente el rendimiento de la citología para detectar NIC2+, en las mujeres VPH-positivas de nuestro medio.

6.1.1. Inmunoexpresión de la TDC p16/ki67, según las diferentes categorías citológicas e histológicas

En concordancia con otras series^{26,33,43}, nuestros resultados mostraron que la proporción de mujeres positivas para la prueba se incrementa en categorías citológicas de mayor gravedad (figura 24). Esta observación se repitió en el subgrupo de mujeres sometidas a biopsia, y de igual forma con las categorías histológicas⁴².

6.1.2. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la TDC p16/ki67

En la población estudiada, la TDC p16/ki67 tuvo una elevada sensibilidad y VPN para la detección de NIC2+ en mujeres VPH-positivas, con una especificidad y VPP superiores a los de la citología sola (tabla 13).

Estos valores de especificidad y VPP fueron aún superiores en el grupo de mujeres ≥ 35 años, que son las que tendrían indicación de cribado primario con estudios de detección de VPH-AR, según los nuevos programas aprobados en nuestro país. Si tomamos como punto de corte a las mujeres ≥ 30 , estas cifras se incrementan aún más (tabla 10).

Varios estudios realizados en diferentes países, a lo largo de los últimos años, han evaluado el rendimiento de la TDC p16/ki67 para determinar NIC2+^{24,30,32,34,42-44}. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos obtenidos en estos estudios presentan una importante variabilidad entre ellos (tabla 2). Esto puede deberse, entre otras cosas, a diferencias en el tipo de población cribada, el tamaño de la muestra y a la duración del seguimiento.

Si comparamos las cifras de dichos estudios con los resultados obtenidos en el presente trabajo, observamos que, en nuestra población en estudio, la TDC p16/ki67 tuvo la más alta sensibilidad y VPN. Dado que, desde el punto de vista fisiopatológico y molecular, la coexpresión de p16 y ki67 en la misma célula representa un signo específico de transformación neoplásica^{8,30}, entendemos que los resultados más bajos de sensibilidad y VPN, observados en las otras series, probablemente se deban a celularidad insuficiente y/o a fallos técnicos, tanto en el procesamiento de la muestra como en la interpretación de la técnica.

Por ejemplo, en algunas series como en la de Wright *et al.*⁴⁴, donde se observó la menor sensibilidad de la TDC p16/ki67 (70,3 % vs. 98,04 % en nuestra serie), las muestras para la realización de la prueba fueron almacenadas durante años, lo cual consideramos que pudo haber afectado la antigenicidad de las células, resultando en mayor cantidad de casos falsos negativos. Por otra parte, la interpretación de las laminillas en dichos estudios fue realizada por citotécnicos y no por patólogos expertos.

Con respecto a los valores de especificidad, las cifras obtenidas en nuestro estudio se encuentran dentro del rango de las otras series referidas, pero cerca del extremo inferior. Consideramos que esto puede deberse a la ausencia de mujeres VPH-negativas en nuestra cohorte. Esta explicación está respaldada en varios estudios previos^{30,42}, en los cuales la especificidad de la TDC p16/ki67 para detectar NIC2+, en el subgrupo de mujeres VPH-positivas, fue del 52,7 %, pero se incrementó al 80 % cuando el subgrupo de mujeres VPH-negativas fue incluido.

Además, otra posible causa de la baja especificidad de la TDC p16/ki67 encontrada en este estudio puede ser la corta duración del período de seguimiento, ya que observamos un número significativo de mujeres TDC p16/ki67 positivas (123), con citologías de

LSIL, que fueron categorizadas como casos falsos positivos (FP). Probablemente, si el período de seguimiento del estudio hubiese sido más largo, observaríamos el desarrollo de NIC2+ en algunas de ellas.

El estudio que tuvo los valores de especificidad más bajos, de todas las series contrastadas, fue el de Ovestad *et al.*³⁰, con niveles inferiores, pero comparables a los obtenidos en nuestro trabajo (31 % vs. 39,11 %). En el caso de dichos autores, la TDC p16/ki67 tuvo mayor sensibilidad, pero menor especificidad que la citología sola para predecir NIC2+ (lo que contrasta con nuestros resultados). No obstante, dadas las similitudes en los valores de especificidad, nos parece importante resaltar la recomendación realizada por ellos de la ventaja que supone utilizar ambas pruebas en conjunto (citología convencional + TDC p16/ki67), para aumentar la especificidad o sensibilidad de ambos métodos realizados individualmente³⁰.

6.1.3. Derivaciones a colposcopia-biopsia, citología sola vs. TDC p16/ki67

En este estudio, se observó que solo un tercio de las mujeres VPH-positivas, a las que se realizó colposcopia y biopsia, tuvo resultado de NIC2+, lo que respalda el hecho de que, en la mayoría de las mujeres con infección por VPH (incluso a pesar de la mayor edad de las pacientes de nuestra cohorte), se trataba de una infección transitoria, que generó derivaciones innecesarias a colposcopia, como se ha informado previamente en la literatura^{34,47}. Este hallazgo se repite en el grupo de mujeres ≥ 35 años.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos afirmar que, en la hipotética situación de que nuestra cohorte de mujeres con edad ≥ 35 años hubiera sido sometida a un cribado primario basado en una prueba de detección del VPH, y se hubiese utilizado la citología sola como herramienta de triaje secundario, como se recomienda en el BOE de 2019 (figura 9), se habría derivado a colposcopia y biopsia al 84,63 % de las mujeres. Sin embargo, si se hubiese utilizado como prueba de triaje secundario la TDC p16/ki67, esta prueba habría seleccionado el 36,53 % de mujeres VPH-positivas para colposcopia, lo que supone una reducción del 48,1 % en las derivaciones. Este porcentaje es similar al observado por Wentzensen *et al.*, en cuya publicación se informó una reducción de casi el 50 %²⁶.

Nuestros resultados muestran que, si las mujeres VPH-positivas con NIC2+ hubieran sido sometidas a un triaje secundario con citología convencional, solo el 40,2 % de ellas habría tenido un resultado de citología de HSIL o SCC (38,2 % y 2 %, respectivamente), con una indudable indicación para realización de colposcopia y biopsia. Sin embargo,

más de la mitad de ellas (el 59,8 %) se habrían clasificado como LSIL, ASCUS o NILM, con una indicación menos clara. Si, por el contrario, se hubiese realizado un triaje secundario con la TDC p16/ki67, la mayor parte de ellas (98,0 %) habría tenido un resultado positivo para esta prueba, con una más acertada derivación a colposcopia y biopsia.

En vista de nuestros resultados, podemos decir que, en nuestro entorno, la referencia a colposcopia y biopsia no se debería recomendar en mujeres VPH-positivas/TDC p16/ki67 negativas, tal y como se ha sugerido previamente en la literatura^{37,46}.

6.1.4. Posible limitación técnica de la TDC p16/ki67

En nuestra cohorte, el 2,5 % de las mujeres TDC p16/ki67 negativas tuvo NIC2+. Una posible explicación para estos dos casos con resultados falsos negativos podría ser la pérdida de células representativas en el segundo ciclo de centrifugación de la muestra en base líquida, necesaria para realizar la TDC p16/ki67.

6.1.5. Limitaciones de la citología convencional, como método de triaje secundario, en el contexto específico de resultados citológicos de NILM. Posible papel protagónico de la TDC p16/ki67

Actualmente existe cierta confusión en cuanto al manejo terapéutico de las mujeres VPH-positivas con citología NILM. Sabemos que estas mujeres tienen un mayor riesgo de enfermedad y no pueden volver al cribado de detección primaria regular, pero el riesgo es insuficiente para su derivación a colposcopia³¹.

En nuestro estudio se observó que una de las mujeres que fue sometida a biopsia, con citología previa NLIM, tuvo NIC2+ (esto representa el 6,7 % de todas las mujeres con resultado citológico de NLIM que fueron sometidas a biopsia). Lo interesante es que esta mujer tuvo un resultado positivo para la TDC p16/ki67 (sensibilidad y VPN del 100 %, con una especificidad del 71,4 %). Estos resultados son más altos que los informados por Uijterwaal *et al.*⁴⁸, pero comparables a los resultados de Petry *et al.*⁴⁹. En este último estudio, el cribado primario de CC fue «oportunistas» y la TDC p16/Ki67 se realizó mediante citología de base líquida (al igual que en el presente estudio), mientras que, en la serie de Uijterwaal *et al.*⁴⁸, el cribado primario era de tipo «organizado» y se realizó en frotis de citología convencional. Nuestro estudio presenta la limitación de que el número de mujeres que fueron sometidas a biopsia, con resultado citológico previo de NLIM, es muy escaso (15).

No obstante, recomendamos la TDC p16/ki67 como herramienta complementaria para el programa de cribado de CC basado en la detección de VPH, ya que permite la identificación temprana de las mujeres que se beneficiarían más de la colposcopia inmediata, como ha sido observado en nuestro estudio (pese a sus limitaciones) y como ha sido sugerido anteriormente por otros autores^{24,49}.

6.1.6. Posible papel de la TDC p16/ki67 como herramienta complementaria a la citología, en mujeres menores de 30 años, con diagnóstico citológico de ASCUS y LSIL

Algunos estudios previos, llevados a cabo en el contexto de un cribado primario basado en citología^{25-26,29,46,50-55}, han evaluado la eficacia de la TDC p16/ki67 en el triaje de ASCUS y LSIL, con el objetivo de compararla con las pruebas de detección de VPH.

La sensibilidad observada en dichos estudios con la TDC p16/ki67, para detectar NIC2+ en la categoría citológica de ASCUS, varió de 0,64 a 0,94, y en la categoría de LSIL de 0,86 a 1,00; similar a lo observado en nuestra serie (0,92 en ASCUS y 0,98 en LSIL). En estos estudios, el rango de especificidad tuvo mayor variabilidad, oscilando entre 0,53 y 0,81 para la categoría de ASCUS, y entre 0,43 y 0,68 para LSIL. En el presente estudio observamos que la especificidad de la TDC p16/ki67 para la categoría citológica de ASCUS se situó en el mismo rango (0,52), pero resultó algo más baja en la categoría citológica de LSIL (0,34).

No obstante, según la mayoría de los estudios referidos^{25-26,46,51-54,56}, la especificidad de la TDC p16/ki67 para las categorías citológicas de ASCUS y LSIL es mayor que la de las pruebas de detección de ADN del VPH, lo cual es relevante en nuestro país, donde aún se recomienda el cribado primario basado en citología para mujeres menores de 35 años, ya que mejoraría notablemente el rendimiento de la citología convencional. Dado que los resultados de este estudio son comparables a los de la literatura, consideramos que la TDC p16/ki67 tiene una utilidad en la población de Navarra, en este escenario.

En un estudio realizado por Ordi *et al.*, se demostró que la especificidad de la TDC p16/ki67 mejora significativamente mediante la evaluación morfológica de las células positivas, utilizando un umbral basado en la morfología de HSIL²¹. Esto podría ser tomado en cuenta en caso de adoptar la TDC p16/ki67 como método de triaje secundario en Navarra.

6.1.7. Importancia del muestreo adecuado en la toma de biopsia

En nuestra cohorte, cuatro mujeres con citología de HSIL y con TDC p16/ki67 positiva tuvieron un resultado de biopsia normal (tabla 6). Esto podría deberse a un error de muestreo, suponiendo que el foco de HSIL era pequeño, no detectándose en la colposcopia, resultando en una toma de biopsia en una zona sana.

6.2. Edad e infección por el VPH

Del total de mujeres seleccionadas para el estudio, en base a la disponibilidad de resultados para el test de detección de ADN del VPH-AR, se observó que el 65,49 % de ellas tuvieron un resultado positivo para dicha prueba.

Si tomamos en cuenta como punto de corte la edad de 30 años, el aspecto más importante a resaltar es que el 53,8 % de las mujeres VPH-positivas tienen una edad igual o mayor a 30 años, lo que es discordante de los resultados de otros países europeos, donde la prevalencia de la infección por VPH es mayor en edades más tempranas y disminuye con la edad^{1,2,50}.

No obstante, si tomamos como punto de corte la edad de 35 años (en lugar de 30 años), tenemos que el 64,68 % de las mujeres estudiadas en nuestra cohorte son <35 años, acorde con los resultados de la literatura^{1,2,50,57}.

6.3. Subtipos de VPH

Como se ha comentado previamente, el VPH 16 y el 18 se han identificado en la mayoría de los CC en todo el mundo^{58,59}. Por tal motivo, de acuerdo a las guías de la FDA para el cribado primario con pruebas de detección del VPH, a las mujeres con resultados positivos para VPH 16 y 18 se las refiere a colposcopia, mientras que a las mujeres negativas para dichos subtipos virales se las evalúa con citología⁶¹.

En concordancia con la literatura, en nuestro trabajo, el grupo/MIX del VPH que incluye el VPH 16 (MIX3) fue el más frecuentemente observado en la población en estudio, siendo además el grupo/MIX más frecuentemente asociado a NIC2+. Sin embargo, como hallazgo interesante, fue seguido en frecuencia por el grupo/MIX que incluye el VPH 51 (MIX1) y no por el grupo/MIX que incluye el VPH 18 (MIX2).

En esta serie, el grupo/MIX1 (que incluye el VPH 51) estuvo presente en el 21,43 % de todas las mujeres con NIC2+, solo o en combinación con otros grupos/MIX, y estuvo

presente, además, como el único subtipo en el 5,10 % de las mujeres con HSIL y en un caso de CCE, sugiriendo su papel en la patogénesis de esta enfermedad.

Este resultado tiene implicaciones, ya que las vacunas profilácticas actuales para el VPH incluyen principalmente los subtipos VPH 16 y 18 (bivalente 16/18, cuadrivalentes 6/11/16/18^{2,9} y Gardasil-9[®] —VPH 6/11/16/18/31/33/45/52/58—)⁵⁸ y el VPH 51 no está incluido en ninguna de ellas. Además, es importante destacar que algunas de las estrategias actualmente propuestas para evaluar a las mujeres VPH-positivas solo incluyen el genotipado para los virus VPH 16 y 18, como se ha comentado previamente^{31,61}.

Se requieren estudios adicionales para evaluar la posible causa de este hallazgo. Hemos excluido la posible influencia del efecto de la vacuna en nuestra serie (en el sentido de que la protección a las mujeres contra los subtipos VPH 16 y 18 haya podido causar un aumento relativo de otros subtipos menos frecuentes), ya que la mayoría de las mujeres infectadas por VPH 51, con resultados disponibles de biopsia, tenían 30 o más años de edad (61,9 %), lo que significa que no habían sido vacunadas. Esta reflexión surge de que, en Navarra, la vacunación anti-VPH comenzó en el año 2007, en niñas de 14 años de edad. Por lo tanto, en el año 2010 (cuando iniciamos el estudio) estas niñas tenían 17 años y, en el año 2014 (cuando finalizamos el período de estudio), tenían 21 años.

6.4. Mujeres con resultado negativo para la prueba de detección del VPH

Con respecto al grupo de mujeres VPH-negativas, como era de esperar, no hubo ningún caso de CCE; esto se explica por la estrecha relación causal del VPH y el CC, que ya ha sido comentada.

El hecho de no observarse ningún caso con citología NLIM obedece a la metodología del estudio, ya que la prueba de detección del VPH se realizó en mujeres con alteraciones citológicas o aquellas que tuvieran algún criterio clínico que hubiese considerado el médico responsable.

6.5. Limitaciones del estudio

- El corto período de seguimiento del estudio (4 años) podría explicar el hecho de que solo el 44,8 % de mujeres con TDC p16/ki67 positiva tuvo NIC2+ en la biopsia. Nos atrevemos a sugerir que, con un mayor seguimiento en el tiempo, se podría demostrar el desarrollo de NIC2+ en estas mujeres.

- Debido a la metodología del estudio, el número de mujeres con citología normal (NILM) que fueron sometidas a biopsia es escaso, limitando la interpretación de los resultados.
- Consideramos que pudo existir un error de muestreo en 4 mujeres con resultado citológico de HSIL y TDC p16/ki67 positivo, que tuvieron un resultado de biopsia normal.
- En nuestro estudio, el test utilizado para la detección del VPH (Cervista™) es menos específico que otros test, sobre todo el recientemente aprobado por la FDA, que detecta RNA mensajero de E6/E7, en lugar de ADN⁶⁰.

6.6. Planteamiento de futuras líneas de trabajo

- Se requieren futuros estudios en la población de Navarra para valorar el impacto económico (relación coste-beneficio) que podría representar la implementación de la TDC p16/ki67 como método de triaje secundario complementario a la citología convencional, tomando en consideración el ahorro en tiempo por consulta médica, la disminución de listas de espera, los insumos para toma de muestras, el procesamiento de biopsias, etc.
- Se requieren nuevos estudios para comparar la utilidad de las pruebas de metilación con la TDC p16/ki67 como método de triaje secundario de mujeres VPH-positivas, en nuestro medio.
- Dado que la mayoría de algoritmos de trabajo en los programas de detección de CC se han llevado a cabo tomando en cuenta la enfermedad causada por VPH 16 y 18, con la eliminación de estos subtipos virales por las vacunas, la TDC p16/ki67 posiblemente tendrá un papel fundamental, dado que no depende del genotipado⁶². Son necesarios nuevos estudios que tengan como objetivo analizar el efecto actual de las vacunas y el papel patogénico del VPH 51 y otros subtipos virales menos frecuentes, en la población de Navarra.

7. Conclusiones

De acuerdo con los objetivos propuestos, se han obtenido las siguientes conclusiones del estudio:

- La TDC p16/ki67 tuvo una elevada sensibilidad y VPN para la detección de NIC2+ en mujeres VPH-positivas que residen en Navarra. Estas cifras fueron las mayores observadas entre todas las series contrastadas en la literatura.
- La especificidad y VPP de la TDC p16/ki67 para detectar NIC2+ fueron superiores a los de la citología convencional, con una diferencia estadísticamente significativa, lo que demuestra que la TDC p16/ki67 es útil como método complementario a la citología. Su implementación podría suponer una reducción cercana al 50 % (48,1 %) en las derivaciones innecesarias a colposcopia y biopsia en nuestro medio.
- La superior especificidad y VPP de la TDC p16/ki67, sobre la citología, fue observada en todos los grupos de edades.
- Las mayores cifras de sensibilidad y VPN de la TDC p16/ki67 para predecir NIC2+ fueron observadas en los subgrupos de mujeres de menor edad (tomando en cuenta cualquier punto de corte <30 o <35 años).
- Las cifras más elevadas de sensibilidad y VPN de la TDC p16/ki67 para predecir NIC2+ se observaron en mujeres con resultado citológico normal (NILM), seguidas de las mujeres con resultados citológicos de LSIL y ASCUS.
- En concordancia con otras series, la proporción de mujeres positivas para la TDC p16/ki67 se incrementó en categorías citológicas e histológicas de mayor gravedad.
- En nuestra población, el grupo/MIX3 (que incluye VPH 16) fue el más frecuentemente observado y el más asociado a NIC2+, en concordancia con la literatura. Sin embargo, fue seguido en frecuencia por el grupo/MIX1 (que incluye VPH 51) y no por el grupo/MIX2 (que incluye VPH 18), lo que es discordante con estudios previos. La implicación de estos resultados tiene que ver con las vacunas profilácticas actuales, que no incluyen este subtipo viral, siendo probable su necesaria incorporación en futuras vacunas. Adicionalmente, algunas de las estrategias actualmente propuestas para evaluar a las mujeres VPH-positivas solo incluyen el genotipado para los virus VPH 16 y 18.

- Los resultados obtenidos y la evidencia existente en la literatura permiten establecer las siguientes recomendaciones de políticas sanitarias para la Comunidad Foral de Navarra:
 1. Realizar la determinación de la TDC p16/ki67 como triaje secundario en los siguientes escenarios:
 - Mujeres ≥ 35 años, que resulten positivas para el cribado primario con la prueba de detección del VPH.
 - Mujeres < 30 años, sometidas a un cribado primario con citología, cuyo resultado citológico sea NILM, LSIL o ASCUS.
 2. La referencia a colposcopia y biopsia no se recomienda en mujeres VPH-positivas/TDC p16/ki67 negativas.

Referencias

1. Torné Bladé A, Saladrígues MP, Cusidó Gimferrer M, Alameda Quíllet F, Andia Ortiz D, Castellsagué Piqué X, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Progresos Obstet y Ginecol.* 2014; 57(1): 1-53. doi: 10.1016/S0304-5013(14)73068-7.
2. Von Karsa L, Dillner J, Suonio E, Tönberg S, Anttila A, Ronco G, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. 2.^a ed. Luxemburgo: Publications Office of the European Union; 2015. doi: 10.2875/93363.
3. Registro de Cáncer de Navarra. 2008-2011.
4. Anton G, Plesa A, Bleotu C, Botezatu A, Anton M, Brasoveanu L, et al. Human Papillomaviruses Oncoproteins. En: Siregar Y, editora. *Oncogene and Cancer. From Bench to Clinic.* Rijeka, Croacia: IntechOpen; 2013. p. 183-206. doi: 10.5772/55342.
5. Wright TC, Schiffman M. Adding a Test for Human Papillomavirus DNA to Cervical-Cancer Screening. *N Engl J Med.* 2003; 348(6): 489-90. doi: 10.1056/nejmp020178.
6. De Brot L, Pellegrini B, Teixeira Moretti S, Carraro DM, Soares FA, Malagoli Rocha R, et al. Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Cytopathol.* 2017; 125(2): 138-43. doi: 10.1002/cncy.21789.
7. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, Costa M, Sobrinho J, Prado J, et al. HPV infection and re-infection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res.* 2010; 70(21): 8569-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0621.
8. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16INK4a immunochemistry in cervical histopathology and cytology: An update of recent developments. *Int J Cancer.* 2015; 136(12): 2741-51. doi: 10.1002/ijc.28900.
9. Kahn JA. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 2009; 361(3): 271-8. doi: 10.1056/NEJMct0806938.
10. Boyle P, Levin B. *World Cancer Report 2008.* Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer; 2007.

11. McBride A, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017; 13(4): e1006211. doi: 10.1371/journal.ppat.1006211.
12. Oyervides-Muñoz M, Pérez-Maya A, Rodríguez-Gutiérrez H, Gómez-Macías G, Fajardo-Ramírez O, Treviño V, et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infect Genet Evol.* 2018; 61:134-144. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.003.
13. Wright T, Ronnett B, Ferenczy A. Benign diseases of the cervix. En: Kurman, Hedrick L, Ronnett B, editores. *Blaustein's pathology of the female genital tract.* Nueva York, Estados Unidos: Springer; 2011. p. 156-91.
14. Harmon M, Cooper K. Cervical neoplasia. En: Nucci M, Oliva E, editores. *Gynecologic pathology.* Londres, Reino Unido: Churchill Livingstone; 2009. p. 141-96.
15. Stoler M, Bergeron C, Colgan T, Ferenczy A, Herrington C, Kim K, Loening T, et al. Squamous cell tumours and precursors. En: Kurman R, Carcangiu M, Herrington S, Young R, editores. *WHO classification of tumours of female reproductive organs.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. p. 172-82.
16. Cibas E. Cervical and vaginal cytology. En: Cibas E, Ducatman B, editores. *Cytology: diagnostic principles and clinical correlates.* Philadelphia, Estados Unidos: Elsevier; 2014. p. 1-57.
17. Bancroft J, Layton C. The hematoxilins and eosin. En: Suvarna S, Layton C, Bancroft J, editores. *Bancroft's Theory and practice of histological techniques.* 7.^a ed. Oxford, Reino Unido: Churchill Livingston Elsevier; 2013. p. 173-186.
18. Lacruz C. Nomenclatura de las lesiones cervicales. En: Lacruz C, Fariña J, editores. *Citología ginecológica: de Papanicolaou a Bethesda.* Madrid, España: Editorial Complutense; 2003. p. 27-34.
19. Carozzi FM. Combined analysis of HPV DNA and p16INK4a expression to predict prognosis in ASCUS and LSIL pap smears. *Coll Antropol.* 2007; 31 Suppl 2: 103-6. Citado en PubMed PMID: 17598511.
20. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology. *Cancer.* 2006; 111(1): 58-66. doi: 10.1002/cncr.22420.

21. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodríguez-Carunchio L, Torné A, Del Pino M. Usefulness of p16/ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol.* 2014; 122(3): 227-35. doi: 10.1002/cncy.21366.
22. Cuzick J, Clavel C, Petry K, Meijer C, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 2006; 119: 1095-101. doi: 10.1002/ijc.21955.
23. Nkwabong E, Bessi L, Sando Z. Pap smear accuracy for the diagnosis of cervical precancerous lesions. *Trop Doct.* 2019; 49(1): 34-9. doi: 10.1177/0049475518798532.
24. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(12): djv257. doi: 10.1093/jnci/djv257.
25. Waldstrøm M, Christensen R, Ornskov D. 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.* 2013; 121(3): 136-45. doi: 10.1002/cncy.21233.
26. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(15): 4154-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0270.
27. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV Screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med.* 2009; 360(14): 1385-94. doi: 10.1056/NEJMoa0808516.
28. Mustafa R, Santesso N, Khatib R, Mustafa AA, Wiercioch W, Kehar R, et al. Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy. *Int J Gyn Obst.* 2016; 132(3): 259-65. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.07.024.
29. Kissler A, Zechmeister-Koss I. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2015; 122(1): 64-70. doi: 10.1111/1471-0528.13076.
30. Ovestad IT, Dalen I, Hansen E, Loge JLD, Dybdahl BM, Dirdal MB, et al. Clinical value of fully automated p16/Ki-67 dual staining in the triage of HPV-

- positive women in the Norwegian Cervical Cancer Screening Program. *Cancer Cytopathol.* 2017; 125(4): 283-91. doi: 10.1002/cncy.21807.
31. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol.* 2016; 76 Suppl 1(Suppl 1): S49-S55. doi: 10.1016/j.jcv.2015.11.015.
 32. Ebisch R, van der Horst J, Hermsen M, Rijstenberg L, Vedder JEM, Bulten J, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Mod Pathol.* 2017; 30(7): 1021-31. doi: 10.1038/modpathol.2017.16.
 33. Rossi P, Borghi L, Ferro R, Mencarelli R. A population of 1136 HPV DNA-HR positive women: Expression of p16 INK4a/Ki67 dual-stain cytology and cytological diagnosis. Histological correlations and cytological follow up. *Pathologica.* 2015; 107(3-4): 185-91. Citado en PubMed PMID 26946874.
 34. Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJF, Berkhof J, van Kemenade FJ, Rozendaal L, et al. p16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. *Mod Pathol.* 2016; 29(8): 870-8. doi: 10.1038/modpathol.2016.80.
 35. Benevolo M, Allia E, Gustinucci D, Rollo F, Bulletti S, Cesarini E, et al. Interobserver reproducibility of cytologic p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining in human papillomavirus-positive women. *Cancer Cytopathol.* 2017; 125(3): 212-20. doi: 10.1002/cncy.21800.
 36. You K, Guo Y, Geng L, Qiao J. Correlation of cervical intraepithelial neoplasia with expressions of p16 and Ki67 in exfoliated cervical cells in fluid-based thin-layer samples. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2013; 34(6): 535-9.
 37. Wentzensen N, Arbyn M, Berkhof J, Bower M, Canfell K, Einstein M, et al. Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *Int J Cancer.* 2017; 140(10): 2192-200. doi: 10.1002/ijc.30579.
 38. Blatt A, Kennedy R, Luff R, Austin R, Rabin D. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices. *Cancer Cytopathol.* 2015; 123(5): 282-8. doi: 10.1002/cncy.21544.
 39. Tracht J, Davis A, Fasciano D, Eltoum I. Discrepant HPV/cytology cotesting results: Are there differences between cytology-negative versus HPV-negative cervical intraepithelial neoplasia? *Cancer Cytopathol.* 2017; 125(10): 795-805. doi: 10.1002/cncy.21905.

40. Guo M, Khanna A, Wang J, Dawlett MA, Kologinczak TL, Lyons GR, et al. Three-year risk of high-grade CIN for women aged 30 years or older who undergo baseline Pap cytology and HPV co-screening. *Cancer Cytopathol.* 2017; 125(8): 644-51. doi: 10.1002/cncy.21877.
41. Ascunce N, Barcos A, Ederria M, Erdozain N. Citologías ginecológicas en Navarra 2001-2007. Instituto de Salud Pública-Sección Detección Precoz. 2008: 1-89.
42. Yu L-L, Chen W, Lei X-Q, Qin L, Wu Z-N, Pan Q-J, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. *Oncotarget.* 2016; 7(16): 21181-9. doi: 10.18632/oncotarget.8307.
43. Zhang S-K, Jia M-M, Zhao D-M, Wu Z-N, Guo Z, Liu Y-L, et al. Evaluation of p16/Ki67 dual staining in the detection of cervical precancer and cancer in China. *Cancer Epidemiol.* 2019; 59: 123-8. doi: 10.1016/j.canep.2018.12.013.
44. Wright T, Behrens C, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler M, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol.* 2016; 144(1): 51-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.10.031.
45. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287: 2114-9. doi: 10.1001/jama.287.16.2114.
46. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: A prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14(2): 168-76. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70529-6.
47. Uijterwaal MH, Polman N, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and longitudinal data. *Int J Cancer.* 2015; 136(10): 2361-8. doi: 10.1002/ijc.29290.
48. Uijterwaal MH, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, et al. Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. *Br J Cancer.* 2014; 110(6): 1579-86. doi: 10.1038/bjc.2014.34.

49. Petry K, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, et al. Gynecologic Oncology Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16 / Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011; 121(3): 505-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.033.
50. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(20): 1550-7. doi: 10.1093/jnci/djt235.
51. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol*. 2011; 119(3): 158-166. doi: 10.1002/cncy.20140.
52. Killeen J, Dye T, Grace C, Hiraoka M. Improved abnormal pap smear triage using cervical cancer biomarkers. *J Low Genit Tract Dis*. 2014; 18(1): 1-7. doi: 10.1097/LGT.0b013e31828aeb39.
53. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol*. 2015; 123(6): 373-81. doi: 10.1002/cncy.21542.
54. Loghavi S, Walts A, Bose S. CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol*. 2013; 41(7): 582-7. doi: 10.1002/dc.22900.
55. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui M. Evaluation of CINtec PLUS® testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed SurePath® preparations. *Diagn Cytopathol*. 2013; 41(1): 35-40. doi: 10.1002/dc.21757.
56. White C, Bakhiet S, Bates M, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, et al. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*. 2016; 27(4): 269-76. doi: 10.1111/cyt.12317.
57. Mercado Gutiérrez M, Arean Cuns C, Gómez Dorronsoro ML, et al. [Influence of Age in the Prevalence of High-Risk Human Papiloma Virus in Women with Pre-Neoplastic Cervical Lesions in Navarra, Spain]. *Rev Esp Salud Publica*. 2017; 91: :e201702018. Citado en PubMed PMID 28181989.

58. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, Sanjosé S, Fakhry C, Monk B, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 16086. doi: 10.1038/nrdp.2016.86.
59. Duncan L, Jacob S, Hubbard E. Evaluation of p16INK4a as a diagnostic tool in the triage of pap smears demonstrating atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer*. 2008; 114(1) 34-48. doi: 10.1002/cncr.23255.
60. Iftner T, Becker S, Neis K-J, Castanon A, Iftner A, Holz B, et al. Head-to-head comparison of the RNA-based aptima human papillomavirus (HPV) assay and the DNA-based hybrid capture 2 HPV test in a routine screening population of women aged 30 to 60 years in Germany. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(8): 2509-16. doi: 10.1128/JCM.01013-15.
61. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki67 dual-staining cytology in cervical cancers. *Journal of Cancer*. 2019; 10(12): 2654-60. doi: 10.7150/jca.32743.
62. Stoler M, Baker E, Boyle S, Aslam S, Ridder R, Hu W, et al. Approaches to triage optimization in HPV primary screening: Extended genotyping and p16/Ki67 dual-stained cytology. Retrospectives insights from ATHENA. *Int J Cancer*. 2020; 146: 2599-607. doi: 10.1002/ijc.32669.