



BÚSQUEDA DEL MARCADOR DE PROGRESIÓN p16INK4a EN LAS LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS CERVICALES EN MUJERES DE CARTAGENA DE INDIAS¹

SEARCH FOR THE PROGRESSION MARKER p16INK4a IN SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS, IN WOMEN FROM CARTAGENA DE INDIAS¹

Álvarez Coneo Álvaro²
 Barrios García Lía³
 Borré Arrieta Orlando⁴
 Arzuza Navarro Octavio⁵

Correspondencia: alalvcon@gmail.com

Recibido para evaluación: septiembre – 30 – 2010 – Aceptado para publicación: octubre – 30 – 2010

RESUMEN

Introducción y objetivo: numerosos marcadores han sido utilizados en el estudio de la displasia cervical, en este grupo se destaca p16INK4a, una proteína que inhibe las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 por lo que se considera supresor de tumores. Se ha observado inactivación de esta proteína en cánceres y se ha asociado su sobreexpresión en las lesiones cervicales precursoras. Este estudio busca demostrar la presencia del marcador p16INK4a en Lesiones Intraepiteliales Escamosas diagnosticadas por biopsia como indicador de riesgo de progresión, de las lesiones de bajo grado, a lesiones de alto grado y cáncer.

Materiales y métodos: fueron seleccionadas 37 biopsias de pacientes con Lesión intraepitelial escamosa de bajo o alto grado, que asistieron a consulta de colposcopia en la Clínica de Maternidad Rafael Calvo, con resultado de citología anormal, entre marzo 2006 - 2008, La colposcopia se realizó con el equipo MORREL con zoom de aumento de 4x a 40x y la biopsia se informó según Richard (NIC I-NIC II Y NIC III) homologada e.g. Bethesda 2001 (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado y de Alto Grado. LIE). Para la inmunohistoquímica, se tomaron cortes (4 µm) desparafinados a los que se agregó anticuerpo monoclonal anti- p16INK4a, dilución 1:20 (Clon E6H4, Dako Cytomation), y se reveló la reacción con un sistema de estreptavidina peroxidasa. El contraste se realizó con Hematoxilina. Se interpretó según los criterios de Klaes. Los datos fueron analizados con SPSS 12.0. X² se utiliza para determinar diferencias significativas entre los resultados de la colposcopia, la biopsia y la inmunohistoquímica.

Resultados: de los 37 casos, 24 fueron positivos al marcador (45,5%) en LIE de bajo grado y 93,3% en LIE alto grado. La presencia del marcador se correlacionó significativamente con las LIE alto grado evaluadas por biopsia (Gold-standard).

Conclusiones: p16INK4a se encuentra presente en el epitelio con displasia cervical,

¹ Trabajo realizado en conjunto por el Grupo de Microbiología Clínica y Ambiental y el Grupo de Histopatología. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

² Lic Biología y Lic Bacteriología, Universidad de los Andes. Médico General. Msc. Microbiología. Profesor Auxiliar Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia.

³ Médica. Patóloga. Profesora Asistente. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia.

⁴ Médico. Ginecólogo Obstetra. Profesor Titular. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia.

⁵ Biólogo. PhD. Parasitología. Profesor Asociado. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

sobre todo en las Lesiones de Alto Grado. Las Lesiones de bajo grado positivas para marcador p16 posiblemente tienen mayor riesgo de evolucionar a lesiones de alto grado y cáncer. **Rev.cienc.biomed.2010; 1 (2): 208 - 216**

PALABRAS CLAVES

p16INK4a. Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo y Alto Grado. Carcinoma de cervix. Virus del Papiloma Humano de alto riesgo VPH-AR.

SUMMARY

Introduction and objective: numerous markers have been used in the diagnosis of squamous intraepithelial lesion; in this group is included p16INK4a, an important protein that inhibits cyclins 4 and 6 dependant of kinases, reason it is considered a potent suppressor of tumors. Inactivación of this protein has been observed in patients with cancer and its overexpression has been related to improve prognosis and interpretation of the cervical biopsy.

Materials and methods: for this study 37 patients, with abnormal cytology, who attended consultation of colposcopy in the Clínica de Maternidad Rafael Calvo (CMRC) were selected, between March 2007 - 2008, for colposcopic, histological and immunohistochemical studies. For colposcopy MORREL equipment was used, with zoom lens of 4x to 15x and sample for the biopsy was reported according to Richard (CIN I-CIN II AND CIN III) accredited e.g. Bethesda: Squamous Intraepithelial Lesions of Low Degree and High Degree L-SIL and H-SIL. For immunohistochemical analysis, biopsy sample 4 µm sections desparafinized, treated with monoclonal antibody anti p16INK4a 1:20 dilution, were taken (Clone E6H4, Dako Cytomation). Reaction was revealed with a streptavidin peroxidase system. Contrastation was made with hematoxylin, Data were analyzed with SPSS 12.0. X² was used to determine significant differences between results of colposcopy, biopsy and immunohistochemical test.

Results: of the 37 cases, 24 were positive to the marker (45,5 %) in L-SIL and 93,3 % in H-SIL. The presence of the marker significantly correlated with the L-SIL diagnosed by Biopsia (Gold-standard) (p≤0.05).

Conclusions: p16INK4a is a useful marker in early prognosis of L-SIL that could progress to cancer.

KEYWORDS

p16INK4a. H-SIL. L-SIL. Cervical cancer. HR-HPV.

INTRODUCCIÓN

En cervix se han identificado marcadores funcionales como inhibidores dependiente de la ciclinquinasa -2A, p16INK4a y el RNA mensajero de los genes E6 y E7 (mRNA E6/E7), Ki-67, p53, pRb y citoqueratinas-14, -13 y laminina-5 (1, 2).

Los marcadores Ki-67 y p16INK4a utilizados en lesiones intraepiteliales cervicales pueden distinguir entre una lesión intraepitelial cervical y cambios reactivos celulares, constituyéndose en una herramienta de la patología quirúrgica (3, 4) y que la sobreexpresión de p16INK4a es de valor diagnóstico en las neoplasias intraepiteliales asociadas a VPH de alto riesgo (5, 6, 15,16). También se han descrito la expresión de p16INK4a, p14ARF y p53 como marcadores útiles en lesiones cervicales y cáncer (7). Varios estudios se refieren al valor de la detección por

inmunohistoquímica del marcador p16INK4a (5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14), como el marcador más útil en displasias y cáncer cervical.

La búsqueda de lesiones premalignas con la consiguiente prevención del cáncer cervical se hace con el tamizaje por citología, con posterior remisión a colposcopia con biopsia dirigida. Aunque las características citohistológicas y colposcópicas asociadas a infección por VPH se encuentran identificadas y bien descritas, son subjetivas en el diagnóstico (20). La variabilidad interobservador ha sido ampliamente definida sobre todo en lo que se refiere a las Lesiones de Bajo Grado, (21, 22, 23). La morfología no es una herramienta precisa y carece de valor predictivo en el desarrollo ulterior de cáncer. De igual manera ocurre con las imágenes colposcópicas. La biopsia es el *Gold standard* para el diagnóstico y toma

de decisiones en el tratamiento. El estudio colposcópico es de vital importancia para la localización de lesiones y toma de muestra para biopsia. Unido a esto la determinación inmunohistoquímica de p16INK4a más una tipificación con DNA de VPH de alto riesgo aportaría información de vital importancia para orientar el tratamiento de las lesiones con real riesgo de progresión.(24, 25,26,27, 28,29,30,31,16,17,18,19).

El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia del marcador de progresión p16INK4a, para determinar el riesgo de progresión en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (10, 12, 32, 33, 34,35).

METODOLOGÍA

Toma y procesamiento de muestras: área de estudio. Este proyecto fue desarrollado en la Costa Caribe colombiana en el departamento de Bolívar, tomando un total de treinta y siete (37) biopsias de cérvix de pacientes que acuden a la Unidad de Patología Cervical y Colposcopia de la de la Clínica Maternidad Rafael Calvo, durante el periodo comprendido entre enero de 2006–enero de 2008. El criterio de inclusión eran mujeres con citología anormal, a quienes se les realizó colposcopia con biopsia dirigida cuyo estudio histológico reportó Lie de Bajo Grado o Alto grado.

Toma de biopsias: las biopsias fueron obtenidas bajo visión colposcópica. Las muestras de las pacientes fueron registradas y enumeradas de acuerdo a protocolos de laboratorio. Para la recolección de las biopsias de las pacientes, este proyecto siguió lo estipulado en el Artículo 11 de la Resolución No. 008430 de 1993 Consentimiento Informado, de acuerdo con el formato por escrito, del sujeto de investigación, o su representante legal, con las excepciones dispuestas en dicha resolución y siguiendo de manera estricta los lineamientos contemplados en el Protocolo de Helsinki. Todas las pacientes del estudio fueron sometidas a un formulario encuesta, parte integral del estudio. A las pacientes con citología anormal se les practicó colposcopia y las muestras de tejido obtenidas por biopsia se conservaron en

formol tamponado y después se incluyeron en parafina. Posteriormente se practicaron cortes 4 micras y tinción con Hematoxilina y Eosina para evaluación y diagnóstico por patólogos institucionales.

Inmunohistoquímica: los cortes de 4 μ se desparafinaron y se les practicó recuperación antigénica con el target retrieval y la Cámara de Pascal, tratamiento con anticuerpo primario anti-p16, dilución 1:20, (Clon E6H4, Dako Cytomation), anticuerpo secundario biotinizado, streptavidina, *Cromógeno:* 1 ml de Buffer sustrato mas una gota de *diaminobencidina*, utilizando la técnica de Dako Cytomation, la cual colorea con rapé al marcador aumentado en concentración. Luego se analizaron las placas acorde con los parámetros de Klaes y Sano (8,33).

Análisis estadístico: los datos fueron almacenados y posteriormente analizados en el paquete estadístico SPSS 12.0. Se utilizó la prueba χ^2 para comprobar la relación entre las pruebas citológicas, colposcópica e histológicas.

RESULTADOS

Características de la población del estudio: el 69% de las pacientes estaban entre 21 y 45 años, sólo el 10% estaba entre 15 y 20 años y el 21% eran mayores de 46 años.

Resultados a la citología, colposcopia y biopsia: al analizar los resultados de la colposcopia, teniendo como prueba de referencia a la biopsia, de 7 lesiones de alto grado diagnosticadas por la colposcopia de ellas fueron diagnosticadas en el mismo sentido por la biopsia. Asimismo, de las 29 lesiones de bajo grado diagnosticadas por la colposcopia, 9 de ellas fueron clasificadas por la biopsia como lesiones de alto grado (31%). Mientras que 2 LIE de bajo grado habían sido diagnosticadas como cervicitis, por su aspecto a la colposcopia. Ver Tabla N° 1.

Las citologías reportaron: ASC-US 7(17,9%), ASC-H 1(2,6%), AGUS 1 (2,6%), LIEBG 23 (59%), LIEAG 7 (17.9%). Los diagnósticos

colposcópicas fueron: cervicitis 2 (5,1%), lesión oculta 1(2,6%), LIEBG 29 (74,4%), LIEAG 7 (17,9%). Las biopsias reportaron: LIEBG 23 (59%) y LIEAG 16 (41%). Ver tabla 4.

Análisis inmunohistoquímico: veinticuatro (24) biopsias de las 37, fueron positivas al marcador p16INK4a, distribuidos así: El 45,5% de las LIEBG y el 93,3% de las LIEAG. En 14/15 de las LIEAG, hubo correlación estadística significativa entre la positividad del marcador y el diagnóstico con Hematoxilina & Eosina, cuando $p \geq 0,05$. La mitad de las lesiones de bajo grado presentaron positividad al marcador (45.5%) Tabla N° 2.

Dentro de los patrones de expresión del marcador p16INK4a (8,33), se obtuvieron diversos patrones de lectura. Tabla N° 3

El 64.86%, de los pacientes reportados como LIE de bajo grado o LIE de alto grado, dieron positivos para p16INK4a.

La positividad del p16INK4a para los pacientes de LIE de alto grado, confirma el papel del p16INK4a como marcador de progresión. Se encontró asociación entre los resultados de la biopsia y la prueba inmunohistoquímica ($X^2 = 6.17, p < 0,05$).

TABLA 1. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA COLPOSCOPIA Y LOS RESULTADOS DE LA BIOPSIA

COLPOSCOPIA	BIOPSIAS				TOTAL
	LIE DE BAJO GRADO		LIE DE ALTO GRADO		
	N	%	N	%	
Cervicitis	2	100	0	0.0	2
Lesión oculta	0	0.0	1	100	1
LIE DE BAJO GRADO	20	69.0	9	31.0	29
LIE DE ALTO GRADO	1	14.3	4	85.7	5

TABLA 2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y LOS RESULTADOS DE LA BIOPSIA

BIOP-SIA	INMUNOHISTOQUÍMICA					
	NEGATIVO		POSITIVO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
LIE DE BAJO GRADO	12	54,5	10	45,5	22	100
LIE DE ALTO GRADO	1	6,7	14	93,3	15	100

TABLA 3. PATRONES DE RESULTADOS DE LA PRUEBA INMUNOHISTOQUÍMICA

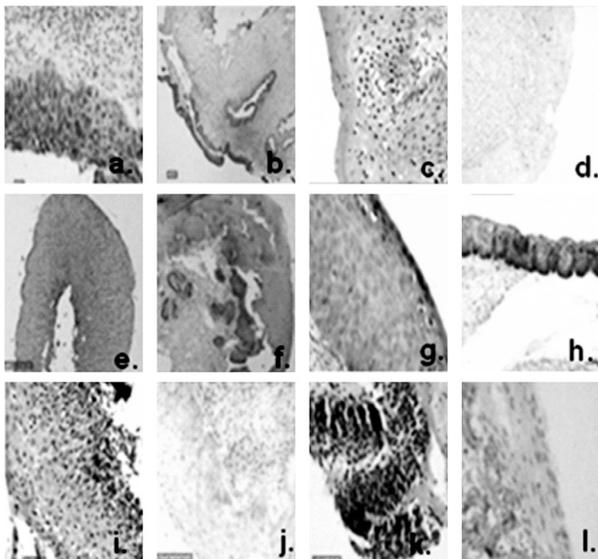
RESULTADOS	N	%
p16INK4a NEGATIVO EN LIE DE BAJO GRADO	5	13,5
p16INK4a NEGATIVO EN LIE DE ALTO GRADO	0	0,0
p16INK4a NEGATIVO (FOCAL <5% AISLADO) EN LIE DE BAJO GRADO	7	18,9
p16INK4a NEGATIVO (FOCAL <5% AISLADO) EN LIE DE ALTO GRADO	0	0,0
p16INK4a NEGATIVO (FOCAL <5% AISLADO) EN LIE NO GRADUABLE EN BAJO NI ALTO GRADO EN LA COLORACION DE H-E DE LA BIOPSIA	1	2,7
p16INK4a POSITIVO (PATRON DIFUSO INTENSO) EN LIE NO GRADUABLE EN BAJO NI ALTO GRADO EN LA COLORACION DE HE DE LA BIOPSIA	1	2,7
p16INK4a POSITIVO (PATRON DIFUSO INTENSO) EN LIE DE BAJO GRADO	7	18,9
p16INK4a POSITIVO (PATRON DIFUSO INTENSO) EN LIE DE ALTO GRADO	13	35,1
p16INK4a (FOCAL DISPERSO) EN LIE DE BAJO GRADO	3	8,1
p16INK4a (FOCAL DISPERSO) EN LIE DE ALTO GRADO	0	0,0
TOTAL	37	100

TABLA 4. CORRELACIÓN CITOLÓGICA CON COLPOSCOPIA, BIOPSIA Y P16INK4a DATOS PORCENTUALES

CITOLÓGIA	COLPOSCOPIA				BIOPSIA		P16INK4a	
	Cervicitis (%)	Lesión oculta (%)	LIEBG (%)	LIEAG (%)	LIEBG (%)	LIEAG (%)	Negativo (%)	Positivo (%)
ASCUS: 7(17,9%)	1(14,3)	0,0	6(85,7)	0,0	7(100)	0,0	3(42,9)	4(57,1)
ASC-H: 1(2,6%)	0,0	0,0	1(100)	0,0	0,0	1(100)	0,0	1(100)
AGUS: 1(2,6%)	0,0	0,0	1(100)	0,0	0,0	1(100)	0,0	1(100)
LIEBG: 23(59%) (2 no p16)	1(4,3)	0,0	21(91,3)	1(4,3)	16(69),6	7(30,4)	9(39,1)	12(52,2)
LIEAG: 7(17,9%)	0,0	1(14,3)	0,0	6(85,7)	0,0	7(100)	1(14,3)	6(85,7)

La Figura N° 1 presenta fotografías microscópicas de lesiones intraepiteliales negativas y positivas para p16INK4a y coloración hematoxilina eosina.

FIGURA 1. TEJIDOS COLOREADOS CON HEMATOXILINA EOSINA Y P16INK4a



- a. y b. Control positivo difuso intenso 90%.
- c. y d. LIE DE BAJO GRADO. p16INK4a negativo.
- e. y f. LIE DE ALTO GRADO. p16INK4a positivo difuso intenso 95%.
- g. y h. LIE DE ALTO GRADO. p16 INK4a positivo difuso intenso 95%.
- i. y j. P16 INK4a focal disperso 70%.
- k. y l. H-E lesión dudosa. p16INK4a negativo. Lesión oculta a la Colposcopia.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de investigación descriptivo, realizado en el departamento de Bolívar, para establecer la presencia del marcador de p16INK4a, por técnicas inmunohistoquímicas, en lesiones intraepiteliales del cérvix como herramienta útil en el pronóstico de lesiones intraepiteliales. La comunidad presenta los factores de riesgo que pueden conducir a la contaminación con VPH-AR y a la aparición de LIEBG, LIEAG y su posterior evolución a cáncer cérvico-uterino. (37,38,39,40,41,42,43,44)

Al igual que lo que se reporta en la literatura y de acuerdo a la historia natural del Virus del Papiloma humano, observamos que las pacientes menores de 20 años presentaron sólo LIEBG, mientras que los LIEAG se presentaron en pacientes mayores.

El 64.86%, de las pacientes reportados como LIE de bajo grado o LIE de alto grado, dieron positivos para p16INK4a, es decir ya contenía células con transformación tumoral y por consiguiente su detección es muy temprana, tiempo de ganancia terapéutica. El alto porcentaje de positividad al p16INK4a para los pacientes con de LIE de alto grado, nos muestra concordancia en el hallazgo y confirma el papel del p16INK4a

como marcador de progresión. Se encontró asociación entre los resultados de la biopsia y la prueba inmunohistoquímica ($X^2 = 6.17$, $p < 0,05$). Las LIEAG deben tratarse como tal y no son motivo de conducta expectante. Hubo un caso con p16 negativo. Se sabe que hay un porcentaje de LIEAG que presentan regresión espontánea, en teoría, éstas deberían tener el p16INK4a negativo. El p16INK4a negativo o positivo en LIEAG serviría para determinar que lesiones tienen mayor riesgo de recidiva y de esta manera marcar el pronóstico para la curación definitiva.

La colposcopia, como método de apoyo diagnóstico, representa un paso fundamental en el estudio de toda paciente con reporte de citología anormal. La lesión oculta a la colposcopia pone de manifiesto que la citología y la colposcopia, son pruebas complementarias y no excluyentes. Efectivamente cuando comparamos las diferentes metodologías, como citología versus biopsia, el nivel de concordancia es mayor para las lesiones de alto grado, como se ha reportado en la literatura mundial (43,44,45,46,47). El diagnóstico definitivo y requisito indispensable para establecer un tratamiento, es el estudio histopatológico (48).

En el presente estudio podría sugerir que la positividad al p16INK4a se asocia con progresión en algunos casos de LIEBG (39,49) ya que se observó alta correlación entre el grado de displasia y el nivel de expresión del p16INK4a, como se aprecia en otros estudios (50).

En el caso de LIEAG, con p16INK4a negativo, corresponde a una paciente cuyo diagnóstico histológico con Hematoxilina -Eosina fue dudoso entre una cervicitis atrófica severa y una lesión de alto grado, demostrando en este caso la utilidad de este marcador en lesiones morfológicamente similares y de difícil diagnóstico (54,55)

Estudios realizados por algunos autores, apoyan el uso rutinario de la evaluación inmunohistoquímica del p16INK4a de los especímenes cervicales obtenidos con biopsia para una discriminación mejor de lesiones (51). Es importante decir que como

todas las proteínas reguladoras del ciclo celular, el papel como ayuda diagnóstica del p16INK4a es limitado (52) y faltan más evidencias; quizá por mucho tiempo seguirá siendo la prueba histológica (H-E) la prueba diagnóstica para las lesiones intraepiteliales escamosas cervicales.

Sin embargo se propone fuertemente la detección inmunohistoquímica de p16INK4a como un complemento a los análisis histopatológicos con H-E, de manera similar a lo reportado (53). Su uso sería de gran utilidad en diferenciar lesiones que simulen displasia y como una herramienta de alto valor para el pronóstico de las lesiones premalignas.

Es necesario realizar nuevos estudios con detección molecular del VPH asociado a la presencia o ausencia de positividad del marcador, hacerlo en poblaciones más grandes y evaluar su valor predictor de progresión en estudios de seguimiento.

CONCLUSIÓN

En el diagnóstico de las lesiones intraepiteliales escamosas del cervix, continúan vigentes el uso de la citología, la colposcopia y la histopatología.

Sin embargo en los casos en que no sea concluyente la evaluación histológica, el marcador p16INK4a podría ser útil para excluir lesiones no asociadas a riesgo de cáncer. Además, en LIEBG, su positividad o negatividad serviría para la toma de decisiones en tratar o no tratar, una vez conocido su riesgo de progresión. En LIEAG sería útil para determinar pronóstico de las recaídas o de curación definitiva.

ABREVIATURAS

ASCUS: células Escamosas Atípicas de Significancia indeterminada

LIEBG: lesión Intraepitelial escamosa de Bajo Grado

LIEAG: lesión Intraepitelial escamosa de Alto Grado

VPH AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo

AGRADECIMIENTOS:

Doctor César Redondo, Unidad de Patología Cervical y Colposcopia. Dr Sergio Giraldo, Ginecólogo, Clínica de Maternidad Rafael Calvo. Elvira Mercado e Isis Buelvas: Citohistotecnólogas, Gregorio Young, Martha

Puello, Ketty Mendoza y Alexandra Martínez. Profesionales. Facultad de Medicina.

CONFLICTOS DE INTERESES: ninguno que declarar.

FINANCIACIÓN: vicerrectoría de investigaciones. Universidad de Cartagena.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Puig-Tintoré LM, et al . La infección por Papilomavirus. Documentos de Consenso SEGO 2002. <http://www.aepcc.org/congreso/pdf/CONSENSO-VPH.pdf>
2. P. Kohlberger, Ch. et al . Immunohistochemical expression of laminin-5 in cervical intraepithelial neoplasia-*Gynecologic Oncology* 2003; **89**,(3): 391-394.
3. Baldin V, et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1.-..*Genes and Develop* 1993; **7**: 812-821.
4. Qiao, X; Bhuiya, Tawfiqul A. Spitzer, M. Differentiating High-Grade Cervical Intraepithelial Lesion from Atrophy in Postmenopausal Women Using Ki-67, Cyclin E, and p16INK4a Immunohistochemical Analysis. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2005. **9**(2):100-107.
5. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. 2001 *Int J Cancer*; **92**: 276-84.
6. Tringler B, Gup CJ, Singh M, et al.. Evaluation of p16INK4aINK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol*; 2004a **35**:689-96.
7. Wang J. Predictive Significance of the Alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. 2004. *Clinical Cancer Research* Vol. (10), 2407-2414.
8. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, et al. Expression status of p16INK4aI protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*, 1998. **153**: No.6, Dec 741-8,
9. Keating, Jt; Cviko, A; Riethdorf, S; et al Ki-67, Cyclin E and p16INK4 are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 2001. **25**(7): 884-891.
10. Bibbo M, Klump W, Dececco J, Kovatich A. Procedurefor inmunocytochemical detection of p16INK4a antigen in Thin-Layer liquid-based specimens. 2002. *Act Cytol.*, (46) 25-29.
11. Schorge, J; Lea, J; Elias, K; Rajanbabu, R; Coleman, R; Miller, D; Ashfag, R. p16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet and Gynecol.* . 2004 , (190): 668-673.
12. Trunk M, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Ulrich K, et al.. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Act Cytol.*, 2004, (48):771-782.
13. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A , Rivasi F, Girlando S, Mian C. and Egarter-Vigl E. P16^{INK4a} expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Archiv* 2004.Issue: Volume 445,(6,) : 616 - 620 .
14. Finegan M. p16 Expression in Squamous Lesions of the Female Genital Tract *Journal of Molecular Histology*. 2004. Volume 35, Number 2 Pages: 111 - 114.
15. Agoff SN, Lin P, Morihara J, et al. p16INK4a Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Mod Pathol* 2003; **16**: 665-673.
16. Schneider V. Tissue Microarrays for Testing Molecular Biomarkers of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Acta Cytol.* 2006.; **50** No. 2
17. Medina M. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia 1990, 1, Instituto Nacional de Cancerología; 1994:76-77.
18. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisan P. Estimating the World cancer burden: Globocan. *Int J CWancer*; 2001. **94** (2):153-156.
19. (19).Redondo Cesar, Herrera Sandra. 2004. Registro poblacional de Cáncer en Colombia. Instituto Nacional de Cancerología. 2004.Comunicación personal.
20. Jovanovic AS, Mclachlin CM, Shen L, Welch WR, Crump CP.. Post-menopausal scuamous atipia. A spectrum including "pseudo-koilocytosis". *Mod. Pathol*, 1995, **8**:408-412.
21. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, et al. Newcombe R Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement, *Histopathology*. 1990, Apr; **16** (4):371-6.
22. Lie AK, Isaksen CV, Skarsvag S, Haugen OA. Human papillomavirus (HPV) in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) detected by morphology and polymerase chain reaction (PCR): a cytologic correlation of 277 cases treated with laser conization. *Cytopathology* 1998; **10**: 112-121.

23. Isaksen Lie AK, Isaksen CV, Skarsvag S, Haugen OA: Human papillomavirus (HPV) in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) detected by morphology and polymerase chain reaction (PCR): a cytohistologic correlation of 277 cases treated by laser conization. *Cytopathology* 1999, 10:112-121.
24. Apgar B.S. Colposcopia. Principios Y Práctica. Editorial McGraw-Hill. 1ª edición (27-Nov 2002) pp 200-201.
25. Illescas L, Dain N, Dino A. Epitelio blanco al ácido acético. El diagnóstico diferencial. *Colposcopia*; 1996. 7:141.
26. Molano M *et al.* Low grade squamous intraepithelial lesions in Colombian women *British Journal of Cancer*; 2002. 87: 1417 – 1421.
27. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world-wide. *J Pathol* 1999; 189: 12 – 19.
28. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, *et al.* cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*; 1992. 327: 1972-8.
29. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst*; 1999. 91: 954-60.
30. Nobbenhuis MAE, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001; 358: 1782-83.
31. Matsuura Y, Kawagoe T, Toke N, *et al.* The clinical course of LGSIL correlates well with HPV infection. *Acta Cytol* 1998. May;42(3):625-630.
32. McCluggage, W.G. Immunohistochemical and Functional Biomarkers of Value in Female Genital Tract Lesions. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2006. 25(2):101-120.
33. Klaes R, Benner A, Friedrich T, *et al.* p16INK4a Immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1389-1399.
34. Agoff SN, Mendellin JE, Grieco VS, García RI. Unexpected gynecologic neoplasms in patients with proven or suspected 13 RCA-1 or mutations, implications for gross examination, cytology and clinical follow up. *Am J. Pathol.* 2002 26:171-178.
35. Márcia C.M. Guimarães, Maria Alice G. Gonçalves, *ET al.* Immunohistochemical Expression of p16^{INK4a} and bcl-2 According to HPV Type and to the Progression of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2005. Volume 53 (4): 509-516.
36. Apgar B.S. Colposcopia. Principios y Práctica. Editorial McGraw-Hill. 2005. 1ª edición (27-Nov 02). 200-201.
37. Reeves *et al.*, Reeves WC, Brinton LA, Garcia M, *et al.* Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Eng J Med* 1989 320:1437-1441.
Reeves WC, Rawls WE and Brinton LA: Epidemiology of genital papillomaviruses and cervical cancer. *Rev Infect Dis* 1989 11(3):426-439.
38. Posso V Hector J., Liga Contra El Cancer Bogota. Universidad Militar Nueva Granada.. Vph Y Cancer Cervicouterino: El Papel De Los Factores Ambientales Y Quimicos. Vii Congreso Latinoamericano De Mutagenesis, Carcinogenesis Y Teratogenesis Ambiental. Cartagena De Indias, 2007. Agosto 28-31.
39. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, *et al.* Role of P16(INK4a) expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred to colposcopy after abnormal cytology. *Cancer* 2006;108:119–23. [Medline]
40. Howard M, Sellors J, Kaczorowski J. Optimizing the hybrid capture II human papillomavirus test to detect cervical intraepithelial neoplasia. *Obstetrics & Gynecology*. 2002;100:982-980
41. Sankaranarayanan R, Gaffikin L, Jacob M, Sellors J, Robles S. A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *International Journal of Gynaecological Obstetrics*. 2005;89(S2):S4–S12.
42. Puig Tintoré LM. Detección colposcópica de la neoplasia cervical intraepitelial en mujeres con citología negativa. *Avances en Obstetricia y Ginecología*. Salvat Ed. Barcelona. ; 1984 8: 5-12.
43. Wright Jr ,Thomas C., MD; L. Stewart Massad, *et al.* For the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology–sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ october 2007 *American Journal of Obstetrics & Gynecology*.2006 www.ajog.org.
44. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, *et al.* Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003; 362: 1871-1876.
45. OMS. Control del cancer de cervix. 2007.
46. Wright T, Lox J, Mossad L, *et al* Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. *Jama* 2002; 287: 2120-2129.
47. Wright Jr ,Thomas C., MD; L. Stewart Massad, MD; *et al.* For the 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology–sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or

- adenocarcinoma in situ october 2007 American Journal of Obstetrics & Gynecology. www.ajog.org
48. Karla R. Dzul-Rosado, Marilyn Puerto-Solís, et al. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev Biomed* 2004; 15:233-241.
 49. Monsonego, Joseph MD*; Pollini, Giuseppe MD*; et al. Detection of Human Papillomavirus Genotypes Among High-Risk Women: A Comparison of Hybrid Capture and Linear Array Tests. *Sexually Transmitted Diseases*: 2008 - Volume 35 - Issue 5 - pp 521-527.
 50. Jović Milena, Nenadić Dane, Magić Zvonko, et al. Pouzdanost CIntec™ p16INK4a citološkog imunohistohemijskog testa u skriningu prekanceroznih lezija grlića materice. *Vojnosanitetski pregled - jezik rada: srpski originalan članak*. 2008, vol. 65, br. 3, str. 211-219.
 51. Rachel Redman, Irina Rufforny, Chen Liu, et al The Utility of p16 in Discriminating Between Cervical Intraepithelial Neoplasia 1 and Nonneoplastic Equivocal Lesions of the Cervix. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: 2008, Vol. 132, No. 5, pp. 795-799.
 52. Nicholas J. Mulvany^{1†}, David G. Allen² and Sharyn M. Wilson¹, Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies 2008, Vol. 40, No. 4 , Pages 335-344.
 53. Horn, Lars-Christian MD. Immunostaining for p16INK4a Used as a Conjunctive Tool Improves Interobserver Agreement of the Histologic Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *American Journal of Surgical Pathology*: 2008 - Volume 32 - Issue 4 - pp 502-512.
 54. Alexandra N Kalof and Kumarasen Cooper. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix *Journal of Clinical Pathology* 2007;60:449-455.
 55. Qiao, X; Bhuiya, Tawfiqul A. Spitzer, M.. Differentiating High-Grade Cervical Intraepithelial Lesion from Atrophy in Postmenopausal Women Using Ki-67, Cyclin E, and p16INK4a Immunohistochemical Analysis. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. April 2005. 9(2):100-107.



GRUPO DE INVESTIGACIÓN: HISTOPATOLOGÍA

LÍNEAS: Cáncer. Enfermedades Ambientales. Histología Básica
Email: liabarriosg@yahoo.es