

# CORRELACIÓN ENTRE EL GRADO DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL Y LA EXPRESIÓN DUAL DE p16 Y ki67, EN BIOPSIA DE CUELLO UTERINO EN EL HOSPITAL SANTA ROSA DE LIMA-PERU AÑO 2016

Correlation Between The Degree Of Cervical Intraepithelial Neoplasia (Nic) And The Dual Expression Of P16 And Ki67, In Uterine Neck Biopsy In Santa Rosa Hospital Of Lima-peru Year 2016

## ARTÍCULO ORIGINAL

Nazario A. Ortiz Muchotrigo<sup>1a</sup>, Jaime L. Torres Solano<sup>2b</sup>, Marilú F. Obando Corzo<sup>3c</sup>, Judith E. Fabian Manzano<sup>4d</sup>

1. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú
  2. Jefe del Servicio de Ginecología Oncológica del Hospital Santa Rosa de Lima, Perú
  3. Médico Ginecólogo del Departamento de Ginecoobstetricia Hospital Regional Ayacucho. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú
  4. Jefe de la unidad de análisis y situación de salud de la oficina de Epidemiología del Hospital Santa Rosa de Lima, Perú
- a. Médico especialista en Patología y Laboratorio Clínico, subespecialidad en Patología Oncológica en el Hospital Santa Rosa de Lima, Perú. Alumno de la maestría en biología molecular. b. Cirujano Oncólogo c. Gineco-obstetra d. Obstetrix

### Correspondencia:

Nazario Augusto Ortiz Muchotrigo  
Domicilio: Carlos Cueto Fernandini  
248. L21  
Número de celular: 995092376  
Correo Electrónico:  
nazario.ortiz.m@upch.pe

### Contribuciones De Autoría:

OMN, TSJ, OCM, FMJ participaron en el diseño del estudio, el análisis de los datos, revisaron críticamente el artículo y aprobaron la versión final.

**Conflicto De Intereses:** No declarados.

**Financiamiento:** Autofinanciado.

**Recibido:** 05-11-2017

**Aceptado:** 20-11-2017

**Publicado:** 20-12-2017

### Como Citar

Ortiz-Muchotrigo Nazario, Torres Solano Jaime, Obando-Corzo Marilú, Fabian-Manzano Judith. Correlación entre el grado de neoplasia intraepitelial cervical y la expresión dual de p16 y ki67, en biopsia de cuello uterino en el hospital santa rosa de Lima-Perú año 2016. Rev méd panacea. 2017;6 (2): 90 - 93

### RESUMEN:

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de coexpresión dual del p16 (INK4a) y ki67 en los diferentes grados de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y su contribución molecular para diagnóstico y pronóstico. **Material y Metodos:** El diseño es descriptivo, prospectivo transversal. Se revisaron 20 biopsias de cérvix embebidas en parafina, que se encontraban en el archivo de Anatomía Patológica de un Hospital tercer nivel de Perú entre Enero y Diciembre del 2016, cuyas láminas portaobjeto fueron coloreadas con hematoxilina-eosina y reportadas como neoplasia intraepitelial (NIC) I, II, III. Se realizaron nuevos cortes histológicos de 3 micras para estudios complementarios usando la técnica de inmunohistoquímica dual. Las células con positividad para p16 mostraron tinción citoplasmática y/o nuclear de color rojizo y aquellas con positividad para ki67 mostraron coloración nuclear marrón. **Resultados:** Los 20 casos de neoplasia intraepitelial se dividen en: 06 casos de NIC I; 11 casos de NIC II y 03 casos de NIC III. La tinción dual para el Ki67 y p16 se realizó a los 20 casos, esto mostró una coexpresión en el 85% y ausencia de expresión dual en 15%. Se observó tinción en los diversos grados de NIC predominando el grado 1+ en un 50%. En el grado 2+ y 3+ la expresión fuerte en NIC II y NIC III respectivamente. La expresión del Ki67 se dio en todos los diferentes grados de NIC. **Conclusiones:** La coexpresión del Ki67 y p16 es de 85% en los diversos grados de NIC, siendo frecuente en el grupo de NIC II.

**Palabras Claves:** Neoplasia intraepitelial, neoplasia del cuello uterino, hematoxilina. (Fuente: DeCS BIREME)

### ABSTRACT:

**Objetivo:** To determine the frequency of dual coexpression of p16 (INK4a) and ki67 in the different degrees of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and its molecular contribution for diagnosis and prognosis. **Material And Methods:** the design is descriptive, prospective and cross-sectional. 20 cervix biopsies embedded in paraffin have been reviewed. These slides gathered from January 2016 to December 2016 were located in the records of Anatomical Pathology Department of a third level Hospital in Peru. The slides were stained with hematoxylin-eosin and reported as intraepithelial neoplasia (CIN) I, II, III. New histological sections of 3 microns were made for complementary studies by using dual immunohistochemistry technique. The cells with positivity for p16 showed cytoplasmic and / or nuclear reddish staining and those with positivity for ki67 showed brown nuclear coloration. **Results:** The 20 cases of intraepithelial neoplasia are divided into: 06 cases of CIN I; 11 cases of CIN II and 03 cases of CIN III. Dual staining for Ki67 and p16 was performed in all 20 cases. This showed coexpression in 85% and absence of dual expression in 15%. Staining was observed in the different grades of CIN, with predominance in grade 1+ ( 50%). In grade 2+ and 3+ the expression was strong in CIN II and CIN III respectively. The expression of Ki67 occurred in all the different grades of NIC. **Conclusions:** The coexpression of Ki67 and p16 is 85% in the different grades of CIN, being frequent in the group of CIN II.

**Keywords:** Intraepithelial neoplasia, uterine cervical neoplasms, hematoxylin. (Source : MeSH NLM).

## INTRODUCCIÓN

El cáncer más frecuente en el Perú es de cuello uterino, 14.9% según MINSA. En los últimos años, las técnicas inmunohistoquímicas han contribuido a mejorar el diagnóstico y pronóstico en los casos de neoplasias. Entre tales técnicas destaca el anticuerpo monoclonal Ki-67 el cual detecta un antígeno nuclear que se expresa en las células que entran al ciclo celular, proporcionando una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido. Mientras que el P16 (INK4a) detecta antígeno citoplasmático, en condiciones normales la proteína del retinoblastoma (pRB) inhibe la transcripción del gen inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p16 (INK4a) participa en el control del ciclo celular (1).

La neoplasia intraepitelial (NIC), también conocida como displasia cervical es inducida por infecciones persistentes a través de los tipos papilomavirus humanos (VPH) de alto riesgo. La mayoría de los investigadores creen ahora que la infección persistente con tipos de VPH de alto riesgo está asociada con el posterior desarrollo de displasia de alto grado y carcinoma cervical invasivo. Sin embargo, muchas infecciones son transitorias y una proporción sustancial desarrolla neoplasia intraepitelial o displasias cervical (1,2,3).

El crecimiento de las neoplasias intraepiteliales o lesiones displásicas se desencadena por el aumento de la expresión de dos oncogenes virales E6 y E7 (proteínas no estructurales papiloma virus humano), que interactúan con diversas proteínas reguladoras del ciclo celular. Entre éstos se encuentra el producto génico de retinoblastoma pRB, que es inactivado por oncogén E7. La pRB inhibe la transcripción del gen inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p16 (INK4a). El aumento de la expresión de los oncogenes virales en las células cervicales displásicas podría reflejarse por el aumento de la expresión de p16 (INK4a). De acuerdo con esta hipótesis, se observó una marcada sobreexpresión de p16 (INK4a) en todas las lesiones de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (4).

El p16 (INK4a) es una proteína que pertenece a los inhibidores de la familia de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 (familia INK4a), al interactuar con los complejos de cinasas dependiente de ciclina (CDK4 y CDK6), el p16 inhibe la formación del complejo ciclina D / CDK4 y 6, que es una proteína estimuladora de la proliferación. El p16 también funciona como un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK1) mediante la inhibición de la fosforilación inducida por CDK de pRb (5,6). La fosforilación de pRb cambiándola de un estado activo (hipofosforilado) a un estado inactivo (hiperfosforilado). La inactivación de RB permite que la célula pase el punto de restricción G/S1 induce la liberación de un factor de transcripción E2F a partir de la forma unida de E2F y pRb. La liberación de E2F resultados en la transición G1-S (7,8). Existe, entonces, una relación inversa entre la expresión de p16INK4a y la presencia de pRb activa.

Los marcadores como Ki-67 o ciclina E (CDK2) pueden ser útiles en la biopsia problemática, cuando el diagnóstico diferencial está entre un proceso reactivo como metaplasia inmadura o regeneración de glándula y un precursor de cáncer de alto grado (9). El anticuerpo monoclonal Ki-67 detecta un antígeno nuclear que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no en células en reposo (G0), por lo tanto, el anticuerpo monoclonal Ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido. Al contrario de muchas otras proteínas asociadas al ciclo celular, el antígeno Ki67 se encuentra sistemáticamente ausente de las células latentes y no es detectable durante los procesos de reparación del ADN.

Por ello, la presencia del antígeno Ki67 se asocia estrictamente con el ciclo celular y se confina al núcleo, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento o regulación del ciclo de división celular (10).

El objetivo de nuestro estudio es determinar la frecuencia de coexpresión dual del p16 (INK4a) y ki67 en los diferentes grados de

las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y su contribución molecular para diagnóstico y pronóstico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación corresponde al diseño descriptivo, prospectivo transversal. Para el desarrollo de la investigación se revisaron 20 biopsias de cérvix embebida en parafina, que se encontraba en el archivo de Anatomía Patológica, laminas portaobjetos coloreadas con hematoxilina y eosina, con diagnóstico de neoplasia intraepitelial (NIC), obtenidas mediante biopsia dirigida por colposcopia a las pacientes atendidas en el Hospital Santa Rosa (Lima, Perú) entre enero y diciembre del 2016, según criterios de inclusión y exclusión.

Se realizaron nuevos cortes histológico de 3 micras para estudios complementarios por técnica de inmunohistoquímica dual actúan mediante dos anticuerpos unidos a dos cromógenos diferentes, de modo que las células con positividad para anticuerpo P16 mostraron tinción citoplasmática y/o nuclear de color rojizo y aquellas con positividad para Ki67 mostraron coloración nuclear marrón, utilizando anticuerpo monoclonales para evidenciar el índice proliferativo (Ki67) y la expresión del p16. Los resultados de tinción se clasificaron para p16 (11) en cuatro grados según la marcación nuclear o citoplasmática: gr 0 (<1%); 1+ (1-5%); 2+ (5 - 25%) y 3+ (>25%). Para determinar el grado de expresión de Ki-67, se examinaron los núcleos de 200 células epiteliales ubicadas en toda la capa epitelial en un campo de alta potencia (x 400). El índice Ki-67 se definió como el porcentaje de células Ki-67 positivas. Se dieron grados 1+, 2+ y 3+, se definió como el porcentaje de células con marcación nuclear positiva considerándose: grado 1+ (<5%), 2+ (5 - 30%), y 3+ (>30%) (12).

## RESULTADOS

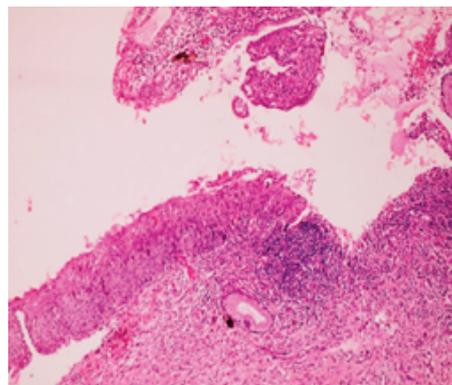
Se obtuvieron 20 casos cuya distribución por grupo etario y grado de neoplasia intraepitelial (NIC) o displasia de cérvix, por tinción de hematoxilina y eosina, se consignan en la tabla 1.

**Tabla 1:** Distribución de los casos evaluados según grupos de edades y grado de neoplasia intraepitelial

EDADES	NIC I	NIC II	NIC III	TOTAL	%
18-30 AÑOS	2	5	0	7	35.0%
31-45 AÑOS	4	3	2	9	45.0%
46-60 AÑOS	0	1	1	2	10.0%
>60 AÑOS	0	2	0	2	10.0%
TOTAL	6	11	3	20	100.0%

Fuente: Departamento de Patología y Laboratorio Clínico- Servicio de Anatomía Patológica del HSR.

La mayoría de casos con neoplasia intraepitelial pertenecen a pacientes del grupo etario de 31 a 45 años con 45%, la lesión predominante fue NIC II con 11 casos.



**Figura 1.** Coloración Hematoxilina/Eosina. Se observa epitelio escamoso con NIC II

Se realizó la tinción dual de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonal para p16 y ki67 y, según el patrón asignado, se observa los siguientes resultados en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2:** Tinción del dual p16 en las muestras evaluadas

DISPLASIA	p16 GRADO 0	p16 GRADO 1+	p16 GRADO 2+	p16 GRADO 3+	TOTAL
NIC I	2	4	0	0	6
NIC II	1	5	3	2	11
NIC III	0	1	0	2	3
TOTAL	3	10	3	4	20
%	15%	50%	15%	20%	100%

Fuente: Departamento de Patología y Laboratorio Clínico- Servicio de Anatomía Patológica del HSR.

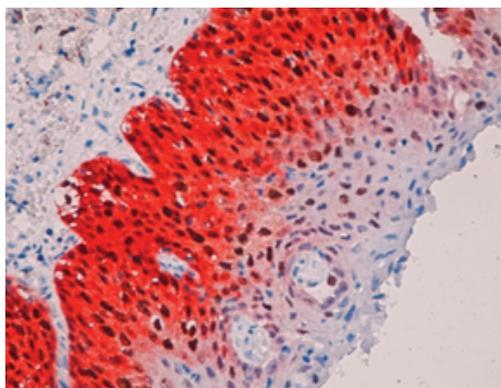
En la tinción de inmunohistoquímica para el anticuerpos monoclonales P16, la graduación para P16 grado 0 se encuentran 3 casos (15%), observándose expresión del 85% para el anticuerpo P16 considerado como positivo según protocolo de trabajo, con mayor frecuencia se observa el grado 1+ (50%), siendo la expresión mayor en el grupo de NIC II (11 casos), el grado 3+ con el 20%, y el grado 2+ con 15%.

**Tabla 3:** Tinción dual del ki67 en las muestras evaluadas

DISPLASIA	ki67 GRADO 1+	ki67 GRADO 2+	ki67 GRADO 3+	TOTAL
NIC I	3	3	0	6
NIC II	1	6	4	11
NIC III	0	1	2	3
TOTAL	4	10	6	20
%	20%	50%	30%	100%

Fuente: Departamento de Patología y Laboratorio Clínico- Servicio de Anatomía Patológica del HSR

El Ki67, se expresa en todos los grados de neoplasia intraepitelial (NIC), siendo mayor en el NIC II, con 11 casos; NIC I, con 6 casos y NIC III, con 3 casos.



**Figura 2.** NIC II. Coexpresión del P16 y Ki67, grado de tinción 2+. Célula con citoplasma color rojizo (P16) y núcleo marrón oscuro (Ki67)

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se incluye 20 casos de neoplasia intraepitelial de cérvix (NIC), obtenidos del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Sana Rosa durante el 2016: 06 casos de NIC I, 11 casos de NIC II y 03 casos de NIC III. La tinción dual para el Ki67 y P16 se realizó a los 20 casos, mostrando una coexpresión de 85%; ausencia de expresión dual 15%: 02 casos de NIC I y 01 caso de NIC II; Se observa tinción en los diversos grados de NIC, predominando el grado 1+, en un 50%, expresión mayor NIC II con 5 casos; NIC I 04 casos. Siendo el grado 2+ y 3+, se observa expresión fuerte en NIC II, NIC III respectivamente.

De los 20 casos estudiados la expresión del Ki67 se dio en todos los diferentes grados de neoplasia intraepitelial, se evidencia tinción

dual con el P16 en el 85% el cual nos indica que el ciclo celular se encuentra alterado y es irreversible; el 15% de la expresión del Ki67 es reversible, porque no expresa simultáneamente el anticuerpo P16. En un estudio realizado en China entre 2010 y 2013 sobre tinción dual, el nivel de expresión de P16 estaba en relación con el Ki67 ( $P < 0.001$ ) y menciona que 268 casos con expresión negativa de p16 y Ki-67 fueron diagnosticados como NEG o CIN1, ayuda a definir el diagnóstico, 199 de 209 casos con expresión positiva fuerte (3+) en p16 y Ki-67 tenían neoplasia intraepitelial de alto grado incluyendo CIN2 y CIN3(13). Nuestro trabajo también se observa expresión negativa en NIC I y NIC II, la tinción fuerte y extensa en el espesor del epitelio corresponde a NIC II y NIC III, muy similar a nuestro trabajo. En Sevilla, España se publicó en el 2012 un estudio de tinción dual P16 y Ki67 en citología de cérvix, la tinción dual de una célula se considera como positiva, la paciente debe realizarse biopsia de cérvix para determinar el grado de neoplasia intraepitelial, pero la sensibilidad (respecto de la clásica tinción PAP) y la especificidad (respecto del clásico tipaje viral) aumentarían, así como la comodidad para el patólogo en la identificación de las células con enfermedad (14). La coexpresión del P16 y Ki67 nos indica que el ciclo celular está alterado (perdió el control) y es altamente susceptible a desarrollar cáncer (4), en nuestro trabajo la coexpresión dual representa el 85%, fuertemente asociado especialmente a NIC II, lo que indica de acuerdo a los reportes publicados, que este grupo de neoplasia intraepitelial tiene alta probabilidad de desarrollar cáncer, por tal motivo estamos en la obligación de realizar un tratamiento en el momento oportuno. Otras publicaciones refieren que la tinción dual de P16 / Ki-67 podría ser considerado como un biomarcador adecuado para los programas de cáncer de cuello uterino de un país o región, basado en el PVH (15), porque nos permite estudiar pacientes mediante citología y/o biopsia de cérvix. Trabajos realizados en Brasil entre Febrero de 2003 y Diciembre 2006 muestran que de un total de 174 mujeres que se sometieron a toma de muestra de citología para estudio de PCR y la biopsia para determinar la expresión de p16INK4a y Ki67 mediante técnicas de Inmunohistoquímica, la presencia de PVH-DNA se observó en el 89%, los cuales el 52% fueron positivos para tipos virales de alto riesgo. Con respecto a p16INK4a aislado, se observó expresión del 69%; la expresión de los marcadores p16INK4a y Ki67 estaba presente en el 86% de las muestras ( $p < 0,001$ ), siendo el 100% entre los positivos al AR-HPV-DNA con NIC alto grado ( $p < 0,001$ (16) el resultado de la coexpresión es muy similar a nuestro estudio.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998;338:423-428
- 2.- Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127:930-934.
- 3.- The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:397-402.
- 4.-Klaes R1, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001 Apr 15;92(2):276-84.
- 5.- Nam EJ, Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008 Feb 19. [Epub ahead of print]
- 6.- Nam EJ, Kim HY, Kim SW, Yoon BS, Kim JH, Kim YT, et al. Relationship between p16INK4a, pRb and high risk HPV infection and recurrence. *Korean J Obstet Gynecol* 2006; 49: 1437-45.
- 7.- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991; 65: 1053-61.
- 8.- Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional.* 7º Edición. Pag.304-306
- 9.- Geng L, Connolly DC, Isacson C, Ronnett BM, Cho KR. Atypical immature metaplasia (AIM) of the cervix: is it related to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)? *Hum Pathol.* 1999; 30:345-351.
- 10.- De Manzoni, G. Study on KI-67 Immunoreactivity as a Prognostic Indicator in Patience with Advanced Gastric Cancer. Universidad de Verona; [http://www3.oup.co.uk/jjco/Volume\\_28/Issue\\_09/html/hyb128\\_gml.html](http://www3.oup.co.uk/jjco/Volume_28/Issue_09/html/hyb128_gml.html), Italia, 1998
- 11- Lulin Hu, Ming Guo, Zhi He, Justin Thornton, Larry S McDaniel, Michael D Hughson. Human papillomavirus genotyping and p16<sup>INK4a</sup> expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Modern Pathology* (2005) 18, 267-273.
- 12.- Eun Ji Nam, Jae Wook Kim, Jong Wook Hong, Hyoung Sun Jang, Sang Yub Lee, Si Young Jang, Dae Woo Lee, Sang Wun Kim, Jae Hoon Kim, Sunghoon Kim, Jong Wook Kim. Expression of the p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* 2008; 19(3):162-168
- 13.- Pingping Zhong,<sup>1\*</sup> Jifeng Li,<sup>2</sup> Yiqun Gu,<sup>1\*</sup> Yu Liu,<sup>3</sup> Aichun Wang,<sup>1</sup> Yunfei Sun,<sup>1</sup> Lijuan Lu,<sup>1</sup> P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1, *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(3): 2979-2986. Published online 2015 Mar1.
- 14- Francisco Javier Torres Gómez<sup>2</sup>, Francisco Javier Torres Olivera, Vanesa Ortega Bravo, Raquel Puerta López. Tinción dual p16 + ki 67. Un paso más en cuanto a la especificidad de citologías ginecológicas. P16/Ki-67 dual staining. A step forward in the specificity of gynecological cytology *Prog Obstet Ginecol* 2012; 55:518-9 - DOI: 10.1016/j.pog.2012.05.003.
- 15.- Calil LN<sup>1</sup>, Edelweiss MI<sup>2</sup>, Meurer L<sup>3</sup>, Igansi CN<sup>3</sup>, Bozzetti MC<sup>2</sup>. p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract.* 2014;210(8):482-7. doi: 10.1016/j.prp.2014.03.009.
- 16.- L.N.Calil<sup>1b</sup> M.I.A.Edelweiss<sup>2c</sup> L.Meurer<sup>c</sup> C.N.I.Gansi<sup>c</sup> M.C.Bozzetti<sup>2c</sup>. P16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathology - Research and Practice.* 2014; 210(8): 482-487