

ANTÍGENOS DE VPH EN LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS

Inmunohistoquímica con P16ink4a, VIROACTIV® y Ki67

María del Pilar Archila Gómez MD*, Jenny Carolina Neira Ruiz**

Resumen

El método más utilizado en la actualidad para la detección precoz del cáncer del cérvix uterino (CCU) es la toma de citología cervicovaginal (CCV), la cual ha demostrado en forma amplia su utilidad dada su capacidad para detectar las lesiones precursoras del CCU, lo cual ha contribuido a disminuir de modo notable la morbimortalidad por esta neoplasia. La consecuencia inmediata de los programas de muestreo ha sido el incremento significativo del número de biopsias cervicales. Su análisis histológico es importante pues se considera el patrón de referencia (*gold standard*) en que el clínico se basa para planificar el tratamiento adecuado para estas pacientes. Sin embargo, existen casos en los que el diagnóstico histopatológico preciso es subjetivo y susceptible de opiniones variadas entre los observadores, hecho que ha incitado la búsqueda de técnicas alternativas como la inmunohistoquímica, para ayudar a establecer un valor pronóstico más confiable en las lesiones preneoplásicas del cérvix. Es por esto que nuestro estudio tiene como objetivo principal determinar la expresión IHQ de antígenos de VPH (subtipo de alto riesgo) y el índice de proliferación celular en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG), utilizando los marcadores biomoleculares Ki67, P16ink4a y *Viroactiv*®.

Palabras clave: virus del papiloma humano, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, lesión intraepitelial escamosa de alto grado, técnica de inmunohistoquímica, P16ink4a, Ki67, *Viroactiv*.

Abreviaturas: VPH, virus de papiloma humano; CCU, carcinoma del cervix uterino; CCV, citología cervicovaginal; LIE, lesión intraepitelial escamosa; LIEBG, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; LIEAG, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; NIC, neoplasia intraepitelial; CIS, carcinoma in situ; IHQ, inmunohistoquímica.

Abstract

Cytology-based screening is currently the most used strategy for early detection of cervical cancer. Cytology has proved to be significantly useful due to its ability to detect precancerous lesions, thus, contributing to a substantial reduction of morbidity and mortality due to this neoplasia. The immediate consequence of screening programs has been a significant increase on the number of cervical biopsies performed. The importance of histological analyses of these samples lies on the fact that they are considered the gold standard in which the clinicians base adequate treatment plans for patients. Nevertheless, in some cases a precise histology/pathology interpretation is subjective and susceptible to various opinions among observers. Due to the latter, finding alternative diagnostic techniques such

Fecha recibido: septiembre 25 de 2006- Fecha aceptado: febrero 28 de 2007

* Jefe del servicio de Patología, Hospital de San José. Profesora Asociada Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Bogotá D.C. Colombia

** Estudiante VI semestre, Facultad de Citohistología, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Bogotá D.C. Colombia

as immunohistochemistry (IHC) has been encouraged to help establish a more reliable prognostic value in cervical preneoplastic lesions. For this reason, the main purpose of our study is to determine the IHQ expression of HPV antigens (high-risk sub-type) and cell proliferation rate in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), using biomolecular markers such as Ki67, P16ink4a and *Viroactiv*®.

Key words: human papillomavirus (VPH), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), immunohistochemistry technique, P16ink4a, Ki67, *Viroactiv*®

Introducción

El CCU es la causa más frecuente de muerte en el mundo, con cerca de 450.000 casos nuevos detectados al año y 200.000 decesos atribuidos a esta enfermedad, constituyendo un problema de salud pública en los países subdesarrollados, sobre todo en Latinoamérica.^{1,2} El registro de cáncer en Cali es hasta ahora el único sistema poblacional en Colombia que provee datos de manera periódica y desde su inicio en 1962 ha venido reportando una de las tasas de incidencia de CCU más altas del mundo.³

El VPH es un virus DNA y se conocen más de 100 tipos diferentes, dentro de los cuales cerca de 40 se han asociado con lesiones del tracto genital femenino. En la mayoría de casos esta infección se presenta de forma *transitoria*, causada por los tipos 6, 11, 30, 34, 40, 42, 55 y 57, denominados de bajo riesgo. Solo algunas pacientes presentan una infección *persistente*, originada por los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51 y 58, considerados de alto riesgo, eventualidad en que la probabilidad para desarrollar una LIE es muy alta. Esta se divide en dos grandes grupos según la clasificación de Bethesda: de bajo grado, LEIBG (cambios sugestivos de VPH y NIC I), denominada infección productiva con gran formación de viriones completos presentados en las células superficiales con signos de coilocitosis⁴, y de alto grado LEIAG (NIC II, NIC III y CIS) que son las neoplasias invasoras donde el DNA viral se encuentra habitualmente integrado en el DNA celular y a la histología todo el epitelio está formado por células inmaduras de tipo basal.

Diagnóstico morfológico

El diagnóstico de infección por VPH se realiza por lo regular mediante la identificación morfológica de los cambios patognomónicos producidos por este virus en las células escamosas de tipo superficial. Sin embargo, aunque la presencia inequívoca de coilocitos indica infección vírica productiva con una gran especificidad, desde el punto de vista histológico es un método muy poco sensible puesto que la mayoría de LIEAG y carcinomas escamosos invasores no evidencian estos cambios morfológicos y el diagnóstico preciso se torna subjetivo y susceptible a variaciones entre observadores.⁵ El uso de técnicas alternativas permite una observación más confiable en lesiones preneoplásicas del cérvix.^{6,7}

Detección de proteínas del VPH (método inmunohistoquímico)

La técnica de IHQ es una técnica de inmunotinción que se caracteriza por demostrar antígenos presentes en células y tejidos. Utiliza infinidad de biomarcadores moleculares capaces de detectar procesos tanto benignos como malignos en las diversas muestras histológicas.⁸ Permite visualización de antígenos presentes en los tejidos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo dirigido contra un antígeno específico (anticuerpo primario), y un anticuerpo secundario que hará contacto directo con el primario mediante un complejo enzimático y un sustrato cromógeno, capaces de lograr una activación enzimática a nivel de este último que finalmente producirá una reacción visible (tono café) en el lugar donde está presente el antígeno.⁹

Para la detección de la cápside proteína L1 del VPH se pueden utilizar diversos anticuerpos monoclonales, entre los que se encuentra el *Viroactiv*, que se utilizó en muestras diagnosticadas como LEIBG para identificar el antígeno que codifica para la proteína de la cápside viral L1¹⁰ presente en los subtipos virales de alto riesgo, que se expresa solo en las células superficiales que evidencian cambios de coilocitosis.¹⁰

En el caso de los antígenos relacionados con el ciclo celular como Ki67 (índice de proliferación celular) y P16ink4a (proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas) son empleados fundamentalmente para evidenciar las células con alta actividad proliferativa que están asociadas con la aparición de neoplasias premalignas y malignas del cérvix uterino, puesto que se ha pensado que la proliferación es un indicador temprano de crecimiento desordenado.¹¹ El anticuerpo monoclonal Ki67 detecta al antígeno expresado por células proliferantes en las siguientes fases del ciclo celular: etapa tardía de G₁, S, G₂ y M. Entre tanto la proteína reguladora P16ink4a que está codificada por el gen P16, es la encargada de evitar la fosforilación de la proteína del Rb, hecho que permitirá el avance despreocupado de la célula desde la fase G1 hasta la fase S, donde la célula se dividirá sin control alguno.¹²

Materiales y métodos

Estudio observacional, descriptivo de corte transversal. La población del estudio fue conformada por las biopsias de cérvix diagnosticadas como LEIAG y LEIBG, realizadas en el Hospital de San José de Bogotá DC, entre enero y agosto de 2005. La muestra fue conformada por 113 biopsias que cumplieron con los criterios de inclusión. Este número se calculó utilizando el programa de estadística *Base de datos Epiinfo*, a partir de una población de 160 biopsias, bajo los siguientes supuestos: inmunomarcaje de 90%, margen de error: 3%, confiabilidad de 95% y tamaño de muestra: 113.

Las láminas que tenían los cortes histológicos de cada una de las biopsias de cérvix y coloreadas pre-

viamente con H/E, fueron revisadas con anterioridad por el médico patólogo encargado para seleccionar los campos más representativos en cada tejido y así realizar la técnica de IHQ únicamente en los sitios indicados. Luego se tomó cada uno de los bloques de tejido incluidos en parafina y se realizaron cortes de dos a tres micras de espesor, dejando tres tejidos diferentes por lámina, con el fin de ahorrar anticuerpo y láminas que previamente fueron tratadas con un adhesivo llamado *Histogrip*, que se utiliza para lograr una mayor adhesión por parte del tejido a la lámina pues es una técnica donde se realizan numerosos lavados y por ende el tejido se puede desprender con facilidad.

También se utilizó un formato donde se registró la totalidad de muestras estudiadas que incluyó la marcación positiva o negativa que correspondiera para cada uno de los anticuerpos empleados en la técnica de la IHQ (Ki67, P16ink4a y *Viroactiv*), terminando con la firma del patólogo que revisó las láminas.

Criterios de inclusión: muestras con diagnóstico de LEIAG y LEIBG y las biopsias con buen procesamiento histológico. Criterios de exclusión: tejidos provenientes de piezas quirúrgicas (órganos completos), muestras desgastadas (pérdida del epitelio), biopsias con tejidos mal fijados y casos de diagnóstico dudoso.

Procedimiento para la técnica de IHQ

1. Obtener los bloques de tejido y seleccionar las áreas que requieren ser estudiadas.
2. Hacer cortes de 2 a 3 micras.
3. Llevar las láminas al horno para desparafinar a 60°C durante una hora mínimo.
4. Pasar las láminas por xilol durante cinco minutos (repetir este paso tres veces).
5. Pasar las láminas por alcoholes de manera decreciente (100%, 90%, 80%, 70%) durante cinco minutos cada uno.
6. Lavar con agua destilada.
7. Llevar las láminas a peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 3% durante cinco minutos (bloquear peroxidasa endógena).

8. Lavar con TBS durante cinco minutos.
9. Llevar las láminas a citrato buffer en una vaporera tipo zoster durante 45 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente. Se recomienda evitar cambios bruscos de temperatura después de la recuperación antigénica ya que provocaría un daño a nivel de epítomos de cada tejido.
10. Lavar con TBS durante cinco minutos.
11. Bloquear los tejidos con abidina durante diez minutos.
12. Lavar con TBS.
13. Bloquear los tejidos con biotina durante diez minutos.
14. Lavar con TBS.
15. Utilizar *power block* durante diez minutos.
16. Decantar, no lavar.
17. Aplicar el anticuerpo primario y dejar incubando en la cámara húmeda de 45 minutos a una hora.
18. Lavar con TBS durante cinco minutos.
19. Aplicar el anticuerpo secundario LINK y dejar incubando durante diez minutos.
20. Lavar con TBS durante cinco minutos.
21. Aplicar estreptavidín y dejar incubando por diez minutos.
22. Lavar con TBS durante cinco minutos.
23. Realizar la reacción final con substrato cromógeno diaminobenzidina – solución DAB-. Revelar al microscopio y cuando el tejido toma la tonalidad característica se debe cortar el efecto con agua destilada.
24. Contrastar con hematoxilina de Harris durante dos a cinco minutos.
25. Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados

De las 113 biopsias escogidas para el estudio, se excluyeron 15 que no tenían los requerimientos necesarios para que la técnica fuera óptima. Por tanto, el número real estudiado fue de 98 muestras. Las frecuencias y porcentajes de positividad se registraron de la siguiente manera: Ki67 mostró el 46,9%

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
1/3 Basal	52	53,1%
2/3 Medio y superficial	46	46,9%
Total	98	100,0%

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Datos vacíos	(2)	(2,0%)
Positivo	54	55,1%
Negativo	42	42,9%
Total	98	100,0%

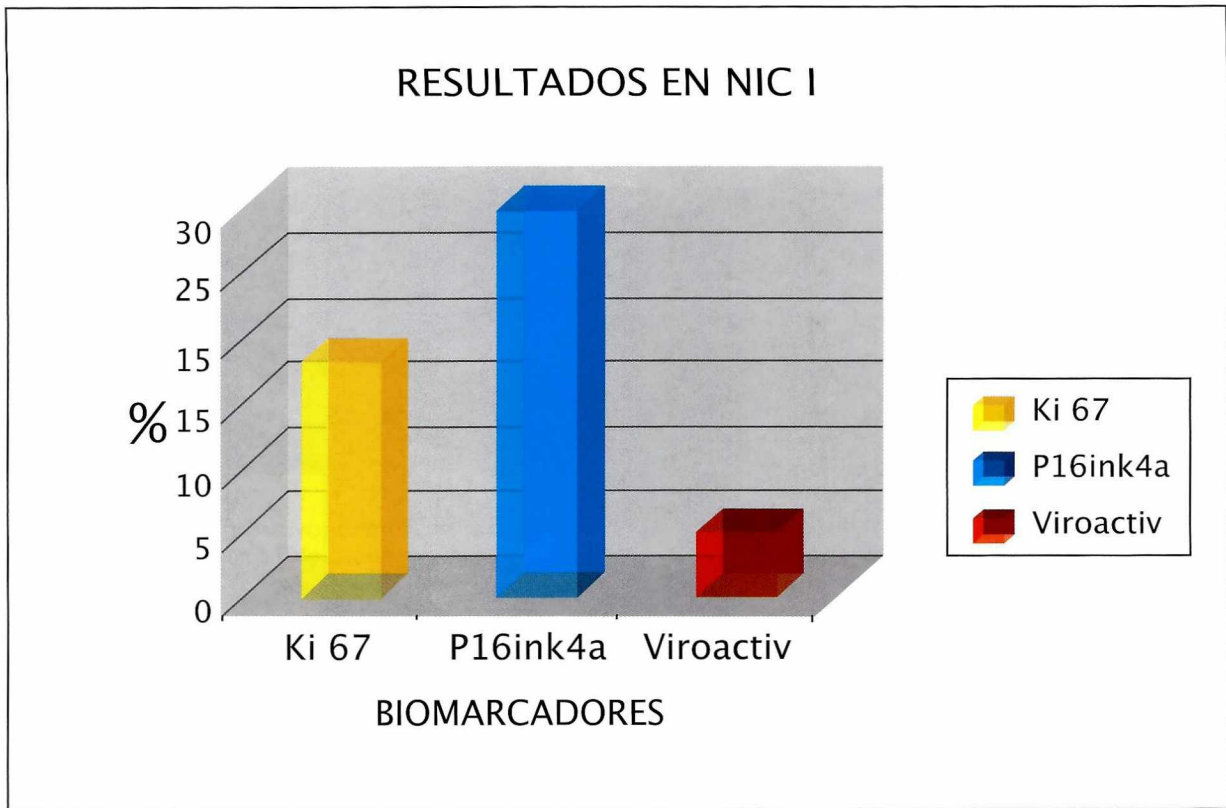
	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Datos vacíos	(2)	(2,0%)
Positivo	3	3,1%
Negativo	93	94,9%
Total	98	100,0%

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NIC I	60	61,2%
NIC II	18	18,4%
NIC III	20	20,4%
Total	98	100,0%

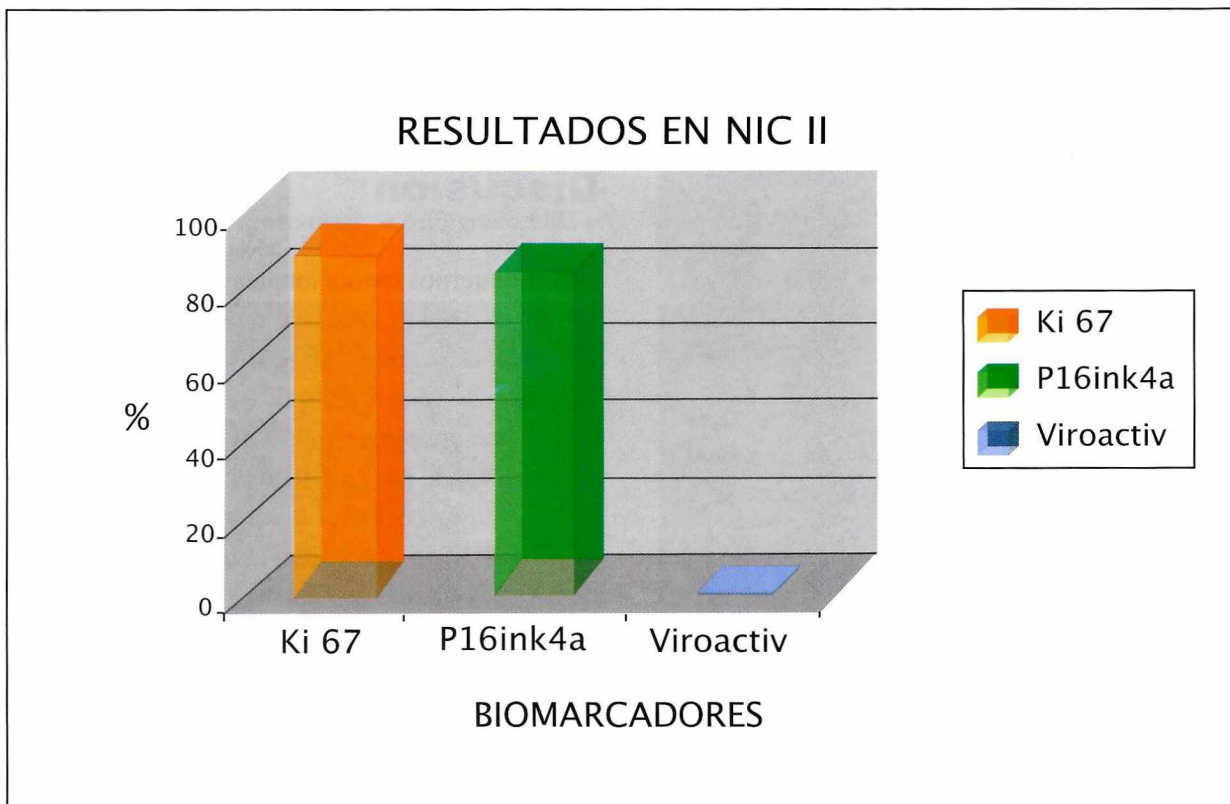
(46 casos), P16ink4a 55,1% (54) y *Viroactiv* 3,1% (3) (**Tablas 1,2,3**). Las LIE se distribuyeron así: el 61,2% se diagnosticaron como NIC I (60 casos), 18,4% NIC II (18) y 20,4% NIC III (20) (**Tabla 4**).

En las 60 muestras diagnosticadas como NIC I, el P16ink4a mostró la mayor positividad con 30,0% (18 casos), comparada con el bajo porcentaje de inmunotinción de Ki67 que correspondió al 18,3 (11 casos). En el caso de *Viroactiv* solo el 5,0% (3 casos) expresó positividad (**Gráfica 1**).

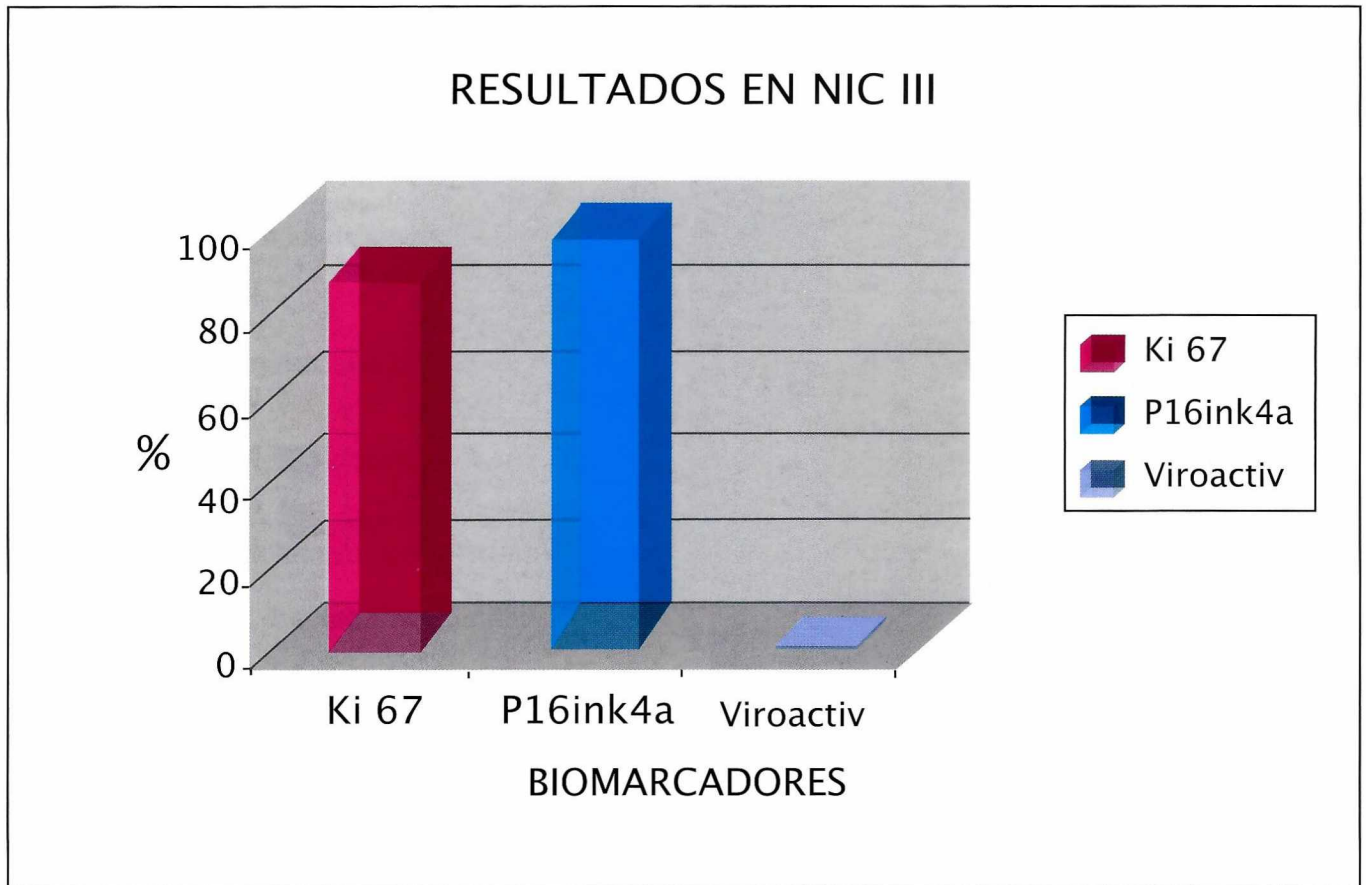
En la **Gráfica 2** se observa que de las 18 muestras diagnosticadas como NIC II, el Ki67 marcó positivo en 94,4% (17 casos), resultado un tanto más alto al obtenido por P16ink4a que evidenció 88,9% (16 casos). Nótese el contraste en NIC III (**Gráfica 3**).



Gráfica 1. Distribución de porcentaje de positividad para los marcadores Ki67, P16ink4a y *Viroactiv* en NIC I.



Gráfica 2. Distribución de porcentaje de positividad para los marcadores Ki67, P16ink4a y *Viroactiv* en NIC II.



Gráfica 3. Distribución de porcentaje de positividad para los marcadores Ki67, P16ink4a y *Viroactiv* en NIC III.

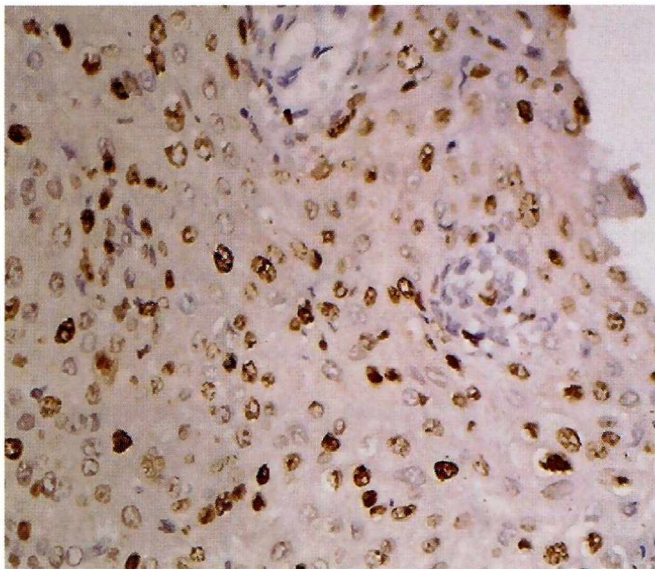


Figura 1. 40x. Lesión de alto grado. Índice de proliferación celular Ki67 en los tercios medio y superficial.

Discusión

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos relacionados con el ciclo celular, tales como Ki67 y P16ink4a, han sido identificados como marcadores de la tasa de crecimiento de los tumores¹³ (**Figura 1**). El anticuerpo monoclonal *Viroactiv*® VPH de HR ha sido empleado para identificar las pacientes portadoras de esta infección con los tipos virales 16, 18, 33, 35, 39, 45 y 56, que están asociados con la mayoría de LEIAG y algunas LEIBG (**Figura 2**).

De las 98 muestras histológicas estudiadas, el 46,9% mostró positividad para Ki67 en el tercio medio y superficial del epitelio escamoso (**Figura 3**) y para P16ink4a la positividad fue de 55,1% del total de las muestras (**Figura 4**), coincidiendo este hecho con estudios en los cuales se ha demostrado que es un

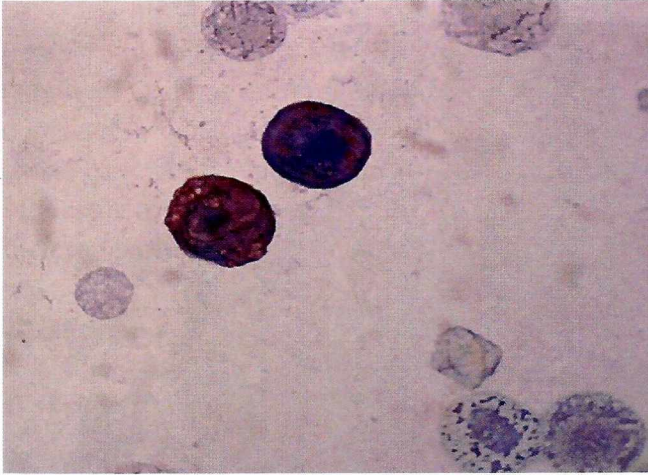


Figura 2. 100x. Control positivo de Viroactiv, donde se evidencia (en rojo) la proteína L1 de la cápside viral del VPH alto riesgo.

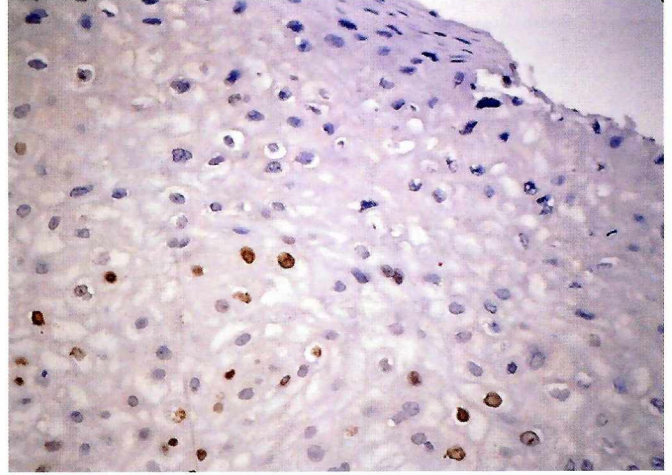


Figura 3. 40x. Índice de proliferación celular Ki67 sobre el tercio medio del epitelio escamoso.

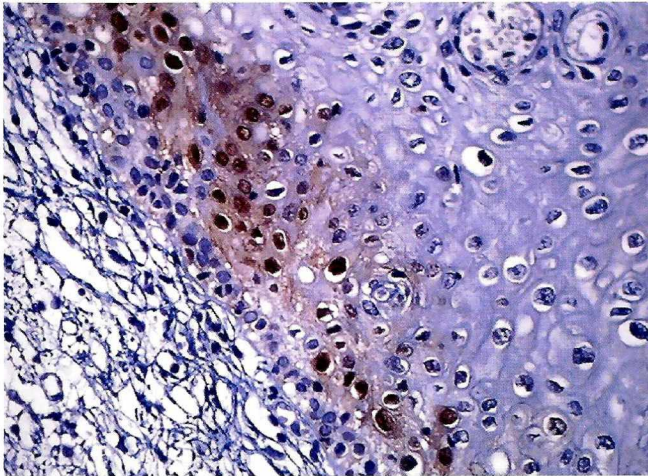


Figura 4. 40x. . Lesión intraepitelial de bajo grado NIC I. Marcación focal para p16ink4a.



Figura 5. 40x. Lesión Intraepitelial de bajo grado NIC I. Hematoxilina –eosina.

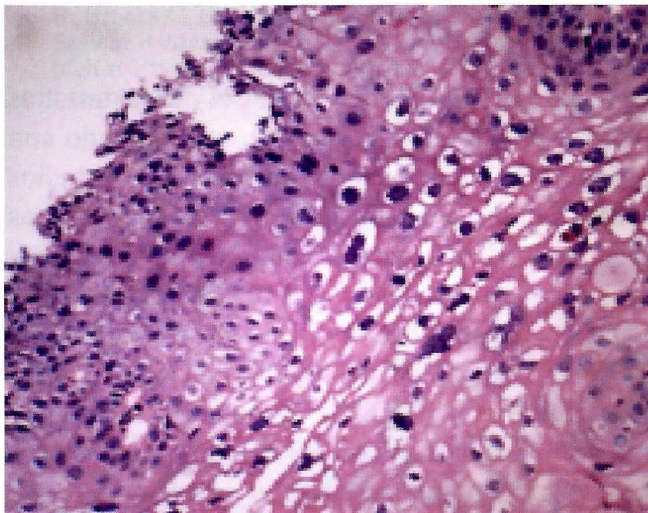


Figura 6. 40x. Lesión Intraepitelial de bajo grado NIC I. Hematoxilina –eosina.



Figura 7. 10x. Lesión intraepitelial de bajo grado NIC I. p16ink4a.

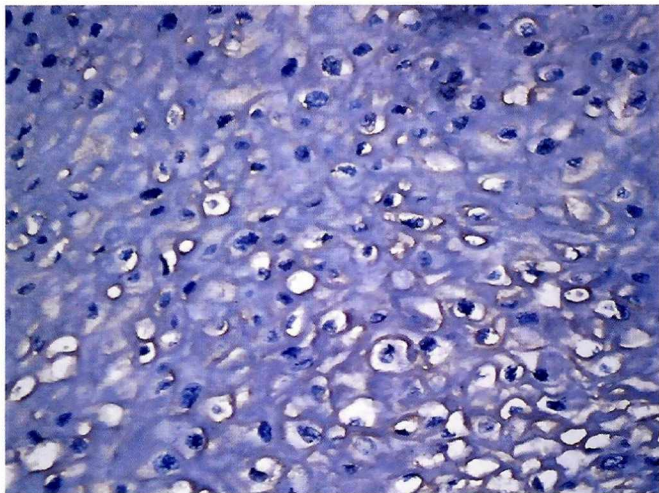


Figura 8. 40x. Epitelio displásico (NIC I) evidenciando marcación citoplasmática con *Viroactiv*.

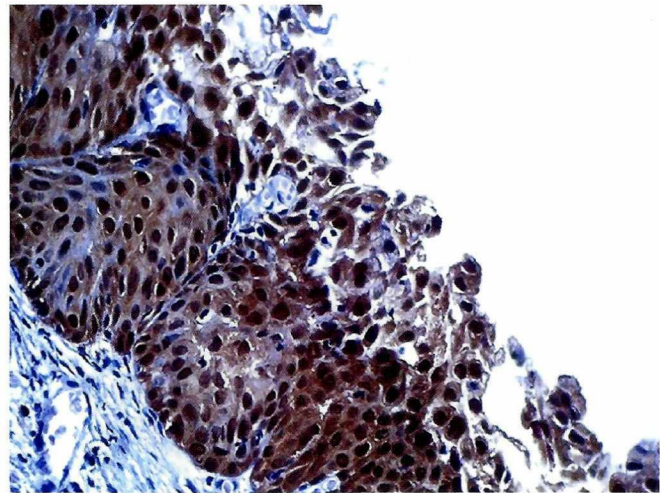


Figura 9. 40x. Lesión de alto grado. Expresión antigénica de P16ink4a ocupando por completo el espesor del epitelio exocervical.

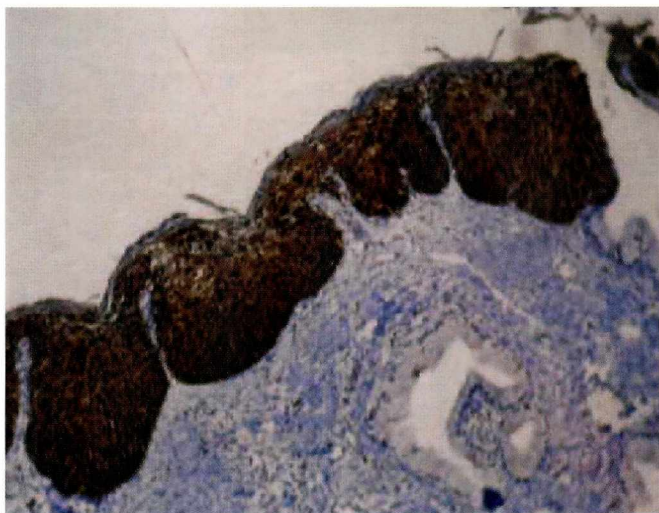


Figura 10. 10x. Lesión de alto grado. Expresión antigénica de P16ink4a ocupando por completo el espesor del epitelio exocervical.

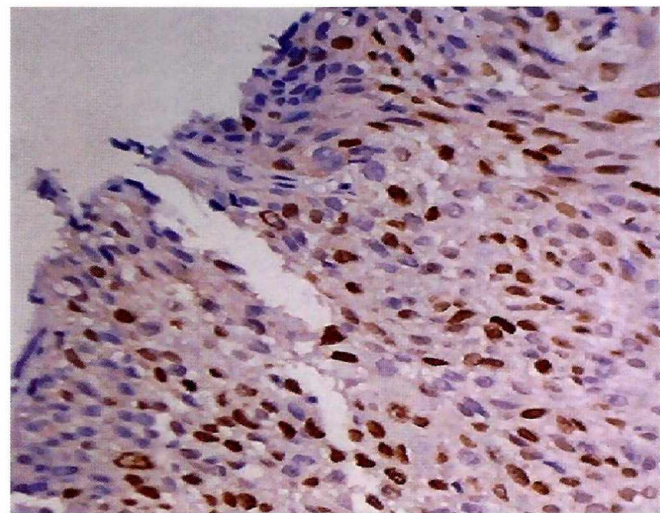


Figura 11. 40x. Lesión de alto grado. Índice de proliferación celular Ki67 en los tercios medio y superficial.

marcador de progresión para las lesiones intraepiteliales de bajo grado (**Figuras 5, 6 y 7**) que avanzarán muy probablemente a lesiones intraepiteliales de alto grado.¹⁴

Los porcentajes de inmunotinción que registran otros estudios con el P16ink4a comparados con esta investigación poseen una diferencia significativa.¹⁵ De 60 casos diagnosticados como NIC I en nuestro estudio, el 30,0% mostró mayor positividad para P16ink4a comparado con el bajo porcentaje de inmunotinción del Ki67 que correspondió al 18,3% del total de las muestras (**Gráfica 1**).

En el caso del *Viroactiv* solo el 5% de las muestras expresó positividad (**Figura 8**), coincidiendo con algunos resultados encontrados en varios estudios donde llamó la atención que el 93% de sus muestras histológicas diagnosticadas como NIC I fueron negativas para este marcador¹⁶ (**Tabla 3**). Por otra parte, de las 18 muestras que se diagnosticaron como NIC II, el 94,4% evidenció positividad con Ki67 (**Figura 11**) y 88,9% con P16ink4a (**Figura 9**), mostrando una gran correlación con los diagnósticos histopatológicos.¹⁷ En contraste con lo anterior, se puede resaltar que de 20 muestras (20,4%) diagnosticadas como NIC III, se observó positividad en 20 (100%)

para P16ink4a (**Figura 10**), y 18 (90%) para KI67 (**Figura 11**), datos que comparados con la literatura demuestran con claridad la fuerte asociación que existe entre el virus del papiloma humano -subtipos virales de alto riesgo- y las LIEAG y LIEBG que hicieron parte de nuestro estudio.

Referencias

1. Reeves WC, Brinton LA, García M, Brenes MM, Herrero R, Gaitán E, Tenorio F, de Britton RC, Rawls WE. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med.* 1989 Jun 1;320(22):1437-41.
2. Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce EC, de Ruíz PA, Romieu I. Evaluation of the cervical cancer screening programme in Mexico: a population-based case-control study. *Int J Epidemiol.* 1998 Jun;27(3):370-6.
3. Gonzalez M. Manual de normas técnico-administrativas para el programa de detención y control del cáncer de cuello uterino. 2ª ed. Bogotá : Secretaria de Salud; 2005.
4. Solomon D, Nayar R, editors. The Bethesda system for reporting cervical cytology. 2nd. ed. New York: Springer; 2004.
5. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002 Nov;26(11):1389-99.
6. Robertson AJ, Anderson JM, Beck JS, Burnett RA, Howatson SR, Lee FD, Lessells AM, McLaren KM, Moss SM, Simpson JG, et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 1989 Mar;42(3):231-8.
7. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, McGoogan E, Menon U, Terry G, Edwards R, Brooks C, Desai M, Gie C, Ho L, Jacobs I, Pickles C, Sasieni P. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet.* 2003 Dec 6;362(9399):1871-6.
8. Mitchell MF, Hittelman WK, Lotan R, Nishioka K, Tortolero-Luna G, Richards-Kortum R, Wharton JT, Hong WK. Chemoprevention trials and surrogate end point biomarkers in the cervix. *Cancer.* 1995 Nov 15;76(10 Suppl):1956-77.
9. López G. HPV: Estudio morfológico e inmunohistoquímico en biopsias del cuello uterino. *Rev Ecuat Gin Obst.* 1993 Abr;2(2):31-45.
10. Firzloff JM, Kiviat NB, Beckmann AM, Jenison SA, Galloway DA. Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2 open reading frames. *Virology.* 1988 Jun;164(2):467-77.
11. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990 Dec;17(6):489-503.
12. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. P16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006 Feb;202(2):77-83.
13. Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S. Proliferating cell nuclear antigen (cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. *Am J Surg Pathol.* 1993 Feb;17(2):117-22.
14. Raju GC. Expression of the proliferating cell nuclear antigen in cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 1994 Oct;13(4):337-41.
15. Trunk MJ, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Petry KU, Ikenberg H, Schneider V, von Knebel Doeberitz M. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol.* 2004 Nov-Dec;48(6):771-82.
16. Toro M, Llombart-Bosch A. Detección inmunohistoquímica de la proteína L1 de Virus Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo en citologías y biopsias de cuello uterino. *Rev Esp Patol.* 2005 Ene;38(1):8-13.
17. Al-Saleh W, Delvenne P, Greimers R, Fridman V, Doyen J, Boniver J. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *Am J Clin Pathol.* 1995 Aug;104(2):154-60.

