



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO DE CIRUGÍA ONCOLÓGICA
INSTITUTO ONCOLÓGICO DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO



EXPRESIÓN DE p16 Y GENOTIPO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN
PACIENTES CON CARCINOMA INVASOR DE CUELLO UTERINO

AUTOR: Reinaldo Mejías Canelón

TUTOR: Dr. Aldo Reigosa

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR

AL TÍTULO DE: Especialista en Cirugía Oncológica

Bárbula, Noviembre de 2015.

Universidad de Carabobo



Valencia – Venezuela

Facultad de Ciencias de la Salud



Dirección de Asuntos Estudiantiles
Sede Carabobo

ACTA DE DISCUSIÓN DE TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo Especial de Grado titulado:

EXPRESIÓN DE p16 Y GENOTIPO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES CON CARCINOMA INVASOR DE CUELLO UTERINO

Presentado para optar al grado de **Especialista en Cirugía Oncológica** por el (la) aspirante:

MEJIAS C., REINALDO
C.I. V – 15731373

Habiendo examinado el Trabajo presentado, decidimos que el mismo está **APROBADO.**

En Valencia, a los veintiséis días del mes de noviembre del año dos mil quince.

Prof. Eddy Verónica Mora (Pdte)
C.I. 8726223
Fecha 26/11/15



Prof. Alfredo Borges
C.I. 8846718
Fecha

Prof. Rodolfo Pérez
C.I. 7117561
Fecha 26-11-2015

TG: 115-15

INDICE GENERAL

	Página
Introducción	1
Materiales y Métodos	8
Resultados	13
Discusión	17
Conclusiones	20
Recomendaciones	22
Referencias Bibliográficas	23
ANEXOS	26

EXPRESIÓN DE p16 Y GENOTIPO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES CON CARCINOMA INVASOR DE CUELLO UTERINO.
Reinaldo Mejías Canelón. Especialista en Cirugía General

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial. Recientemente, ha sido identificado el p16 como un biomarcador para lesiones neoplásicas cervicales inducidas por VPH y se ha sugerido como ayuda diagnóstica para dichas lesiones. El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de p16 y genotipo del virus papiloma humano en pacientes con carcinoma invasor de cuello uterino tratadas en el Instituto Oncológico “Dr. Miguel Pérez Carreño” durante el año 2013 - 2015. La muestra estuvo constituida por 59 pacientes de sexo femenino en edades comprendidas entre 25 y 79 años, con diagnóstico histopatológico de carcinoma invasor de cuello uterino. La detección del ADN del VPH se realizó mediante amplificación por PCR, por otro lado para determinar la expresión de p16 se utilizó el bloque de parafina donde se hizo el diagnóstico anatomopatológico las muestras de cada paciente fueron agrupadas mediante la técnica de Microarray tisular. Se observó expresión de p16 en 76,27% de las pacientes estudiadas (45 casos) y un 76,27% de las pacientes presentó VPH (45 casos), fueron más frecuentes las que presentaban genotipos de VPH altamente oncogénico (82,22%=37 casos) siendo el genotipo más frecuente el 16 (14 casos). No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el riesgo oncogénico. El p16 se encontró positivo en la mayoría de las pacientes de cada tipo histológico. En los estadios I y II la expresión del p16 estuvo positiva en (96,16%= 25 casos). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el estadio precoz del cáncer. Esto sugiere que la tinción inmunohistoquímica de p16 puede aplicarse exitosamente a las muestras de biopsia en bloques de parafina, y puede ofrecer resultados más objetivos para reducir las interpretaciones falsas negativas y falsas positivas, ayuda a predecir cuales carcinomas invasores presentan mayor riesgo de progresión clínica por ende la expresión de p16 es un factor de buen pronóstico en el carcinoma invasor de cuello uterino.

Palabras Claves: Cáncer de cuello uterino, VPH, p16, inmunohistoquímica.

EXPRESSION OF P16 AND HUMAN PAPILLOMA VIRUS GENOTYPE IN PATIENTS WITH INVASIVE CANCER CERVICAL.

Reinaldo Mejías Canelón. Specialist in General Surgery

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most frequent cancer in women a Global Level. Recently, there have been identified the p16 as a biomarker paragraph neoplastic cervical lesions induced by HPV and has been suggested as help to those diagnosed lesions. The aim of this study was to determine the expression of p16 and HPV genotype in patients with invasive cervical carcinoma treated at the Oncology Institute "Dr. Miguel Perez Carreño" during the lapse 2013 – 2015. The sample consisted of 59 female patients aged between 25 and 79, with histopathological diagnosis of invasive cervical carcinoma. The HPV DNA detection was performed by PCR amplification; moreover for the expression of p16 paraffin block where the pathological diagnosis was used samples from each patient were pooled by tissue microarray technique. P16 expression was observed in 76.27% of patients studied (45 cases) and 76.27% of patients had HPV (45 cases) were the most frequent presenting high-risk oncogenic HPV genotypes (82,22% = 37 cases) was the most frequent genotype 16 (14 cases). It was not found a statistically significant association between the expression of p16 and oncogenic risk. The p16 was found positive in most patients in each histologic type. In stages, I and II the expression of p16 was positive (96,16% = 25 cases). A statistically significant association between the expression of p16 and early stage of the cancer was found. This suggests that immunohistochemical staining of p16 can successfully applied to biopsy specimens in paraffin blocks, and can offer more targets results to reduce false negative and false positive interpretations, which helps predict invasive carcinomas increased risk of clinical progression by hence the expression of p16 is of good prognosis in invasive cervical carcinoma.

Keywords: Cervical cancer, HPV, p16, immunohistochemical.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en la mujer fueron los de mama, cuello uterino, colon y recto, pulmón y estómago (1).

En el año 2012 ocurrieron en Venezuela 42046 casos de cáncer. Las defunciones registradas para el mismo año fueron 22815 y al separar por género y localizaciones, observamos que en el género femenino, las cuatro localizaciones más frecuentes son: glándula mamaria (5063 casos y 2067 defunciones), cuello uterino (4076 casos y 1630 defunciones), pulmón (1697 casos y 1366 defunciones) y colon y recto (1661 casos y 801 defunciones), que representan el 56 % de la incidencia y 52 % de la mortalidad anual (2).

Hasta la fecha, los esfuerzos para la prevención del cáncer cervical se han enfocado en la pesquisa de mujeres sexualmente activas por citología cervical con la tinción de Papanicolaou (Pap). Aunque, el Pap ha reducido eficientemente la morbilidad y mortalidad del cáncer cervical en los países desarrollados, éste ocurre todavía con alta frecuencia en las mujeres de los países en vías de desarrollo, debido en parte, a que la evaluación del Pap se basa en técnicas diagnósticas subjetivas, lo cual implica errores humanos, Estas limitaciones han creado una fuerte demanda de marcadores

específicos y sensibles que objetivamente resuelvan los dilemas diagnósticos (3).

El Virus Papiloma Humano (VPH) pertenece a una familia que comprende más de 100 genotipos diferentes. Se pueden dividir en dos grupos según actúen sobre la piel o en mucosas (nasofaríngea, oral y genital). Los genotipos que infectan las mucosas se dividen a su vez en «alto riesgo» (los más representativos de este grupo serían el VPH 16 y el VPH 18) y «bajo riesgo» según su potencial neoplásico. El VPH no tiene envoltura, posee una cápside icosaédrica y se replica exclusivamente en el epitelio plano estratificado de la piel y de las mucosas (4, 5).

Hay un grupo de ellos denominado de alto riesgo que se encuentra en el cáncer del cuello uterino y en otros carcinomas, del canal anal, de la oro faringe y del pene (4).

La infección genital con el VPH es hoy día la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo y aunque estas infecciones generalmente son transitorias, existen dos hechos de carácter relevante; primero, la infección puede ser persistente y segundo, existen más de 15 tipos de VPH de alto riesgo. Estos virus constituyen la causa directa de los casos de carcinoma epidermoide y adenocarcinoma del cuello uterino y sabemos hoy que el 70% de los casos de cáncer cervical se deben a VPH de los tipos 16 y 18 (6 y 7).

Con los nuevos métodos de biología molecular los estudios de Nubia Muñoz y sus colaboradores en la Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC) en Francia, han concluido que en un 99,7% de todos los casos de cáncer cervical, el VPH es la causa necesaria para que estos tumores se hayan desarrollado (6).

Muchos estudios han demostrado el poder carcinógeno del VPH; de hecho se ha encontrado en casi todas las lesiones pre neoplásicas y neoplásicas del cérvix, si bien el potencial oncogénico de los distintos genotipos varía a pesar de expresar las mismas oncoproteínas (8, 9,10).

En los tipos de alto riesgo (AR) VPH 16 y VPH 18 las proteínas E6 y E7 pueden inducir la inmortalización de los queratinocitos, que se debe en parte a la interacción de VPH 16 E7 con determinadas proteínas, sobre todo producto del gen del retinoblastoma (pRb). Esta proteína ejerce un papel esencial en el control del ciclo celular, ya que regula la actividad de diversos factores de transcripción (E2F). En situación quiescente, la pRb se encuentra activa, hipofosforilada y unida a E2F. Si exponemos estas células a efectos mitogénicos se inicia la transcripción de genes G1 específicos (ciclinas D) que a su vez se unen y activan las cinasas dependientes de ciclina (CDK4 y CDK6) que fosforilan la pRb en medio de la fase G1, lo que libera el factor E2F y se produce la transición a la fase S (11, 12).

El gen retinoblastoma (gen Rb) regula el punto G1-S del ciclo de división celular. Una disfunción en el gen Rb permitiría la progresión del ciclo celular,

aunque existan alteraciones en el ADN que aún no hayan sido reparadas (13).

En el cromosoma 9p21 (locus CDKN2A) se codifican dos proteínas supresoras tumorales, p16INK4a y p14ARF. La proteína supresora p16INK4a (p16) inhibe las quinasas 4 y 6 dependientes de ciclina D1 (CDK4/6, ciclina D1), cuya función es regular la actividad de la pRb mediante la fosforilación de la misma. La pérdida de función de p16 genera una inactivación de Rb por hiperfosforilación y, por tanto, una disregulación y progresión prematura del ciclo celular (14).

Se han descrito alteraciones en esta proteína p16 en relación con las radiaciones ultravioleta, por transmisión genética (como ocurre en la predisposición familiar al melanoma), como consecuencia de mutaciones espontáneas, y también provocadas por la acción de papiloma virus (VPH): los subtipos de VPH mucosos o (VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35...) actuarían sobre el gen Rb y, en consecuencia, se provocaría una sobreexpresión de p16. En concreto, la proteína E7 de estos subtipos de VPH se uniría al gen Rb impidiendo la acción de los factores de transcripción del mismo (15, 16, 17).

Existe, por tanto, una relación recíproca entre pRb y p16. Se ha demostrado asimismo que en la patogenia del cáncer de cérvix, la integración del material genético viral en el genoma de las células huésped y la consiguiente expresión de los productos de los genes virales E6 y E7 determinan una

inactivación tanto de p53 como de pRb. Esta inactivación se corresponde con una sobreexpresión de p16 que puede ser detectada mediante inmunohistoquímica (IHQ), poniendo de manifiesto la integración del genoma viral en el genoma de las células del huésped (18).

Gracias a trabajos previos sabemos que la p16ink4a se puede demostrar por estudio inmunohistoquímico, mostrando un patrón de tinción diferente según la infección se deba a genotipos de alto o bajo riesgo, independientemente del tipo de lesión cervical. La inmunorreactividad es nuclear y citoplasmática en casos de neoplasia intraepitelial de alto grado (CIN II-III) y carcinoma escamoso, con una positividad difusa e intensa (sobre todo cuando se asocia a HPV 16/18), mientras que en casos de neoplasia intra cervical leve (CIN I) es fundamentalmente nuclear, más débil y focal (12, 19).

Aproximadamente el 100% de los carcinomas escamosos y CIN II-III asociados a VPH sobre expresan p16 de manera difusa, aunque no todos los casos que presentan sobreexpresión de p16 son VPH positivos, esta circunstancia podría deberse a diferentes factores, como un falso negativo en la detección del virus por escaso número de copias víricas o por pérdida de la región subgenómica en el ADN vírico. También parece indicar que existen vías desconocidas de activación de la p16 independientes de la acción del VPH. En contraste, la inmunotinción negativa o débilmente positiva ha sido fundamentalmente descrita en adenocarcinomas no asociados a VPH,

sugiriendo que la disregulación de esta proteína puede estar relacionada con la etiología de estas lesiones (20).

Igualmente la sobreexpresión de p16ink4a está presente en la mayoría de las lesiones cervicales, permitiendo su patrón de inmunotinción diferenciar entre lesiones por VPH de alto o bajo riesgo. La mayor utilidad de la determinación de la proteína supresora p16ink4a se encuentra en las lesiones de bajo grado histológico que pueden estar provocadas por VPH de alto riesgo y obligarían a un control clínico más estricto (21, 22) La posibilidad de demostrar su sobreexpresión por IHQ evita el realizar técnicas moleculares más costosas y complejas, pudiendo realizarse en los Servicios de Anatomía Patológica.

OBJETIVO GENERAL: Determinar la expresión de p16 y el sub tipo de VPH en pacientes con carcinoma invasor de cuello uterino, tratadas en el Instituto Oncológico “Dr. Miguel Pérez Carreño” durante el año 2013-2015.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Correlacionar las características clínico patológicas de las pacientes con carcinoma invasor de cuello uterino (edad tipo histológico, estadio y evolución), según la expresión de p16, presencia de VPH y el genotipo de VPH específico.

2.- Determinar la expresión de p16 según riesgo oncogénico de VPH en pacientes con carcinoma invasor de cuello uterino.

3.- Relacionar la expresión de p16 según tipo histológico de carcinoma invasor de cuello uterino.

4.- Comparar la expresión de p16 con el estadio clínico de las pacientes con carcinoma invasor de cuello uterino.

5.- Medir la supervivencia global según la expresión de p16 en el carcinoma invasor de cuello uterino.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes. Se realizó un estudio de campo, descriptivo, exploratorio y correlacional. Se conformó una muestra no aleatoria, de tipo intencional, con 59 pacientes tratadas en el Instituto Oncológico “Dr. Miguel Pérez Carreño” del Estado Carabobo, Venezuela, entre los años 2013 a 2015, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: a) sexo femenino; y b) diagnóstico anatomopatológico de carcinoma cervical invasor c) que tengan bloques de parafina en la institución. Se excluyeron todos los casos con patología no maligna de cuello uterino. Todas las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Citología de la Maternidad del Este (centro de recepción) en Valencia, Venezuela, para luego ser trasladadas, siguiendo las instrucciones recomendadas internacionalmente, al Laboratorio Genomik C.A., ubicado en Maracay, Estado Aragua, Venezuela, donde fueron procesadas por PCR y el fragmento amplificado, digerido con enzimas de restricción para obtener el genotipo viral específico.

Se incluyeron las siguientes variables edad, presencia y genotipo de VPH, expresión de p16, tipo histológico, estadio, evolución y supervivencia global de las pacientes. Estos datos fueron recopilados de las historias médicas del Instituto Oncológico “Dr. Miguel Pérez Carreño”.

Muestra. Se obtuvo por uno de los siguientes tres métodos diferentes: a) hisopado, realizando un raspado firme con hisopo de algodón estéril, pero sin

producir sangrado, del exocérvix y endocérvix, colocando éste en un tubo de plástico estéril seco y preservándolo a 4°C hasta su procesamiento, b) biopsia en fresco del material, un fragmento de tejido de aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,2 mm, colocado en tubo con tampón lisis conservante (Tris 10 mM pH 8, EDTA 5 mM y SDS 1%) y almacenado a 4°C hasta su procesamiento y c) biopsia fijada en formol al 10% e incluida en parafina siguiendo los métodos convencionales. Se utilizó el bloque donde se hizo el diagnóstico anatomopatológico.

Extracción de ADN. a) Hisopado. Se adicionó 1 mL de solución salina 0,9% y agitó en vortex por 1 min, posteriormente, se centrifugó a 12.500 rpm por 10 min a 4°C. El concentrado celular, de acuerdo al tamaño del precipitado, se resuspendió con 100 µL a 450 µL de tampón de lisis (Tris 10 mM pH 8, EDTA 5 mM pH 8, IGEPAL 0,45% y Tween 20 0,45%) y proteinasa K (100 µg/mL) por cada muestra y se incubó por 3 h a 56°C. b) Biopsia en fresco. Se fragmentó con bisturí mediante procedimiento estéril sobre un portaobjeto. Los fragmentos no mayores a 2 mm de diámetro fueron digeridos en tampón de lisis con proteinasa K (200 µg/mL) por 3 h a 56°C. c) Biopsia incluida en parafina. Con material estéril y desechable, se obtuvo 5 cortes de 10 µm, realizando disección manual de la lesión identificada microscópicamente, para luego colocarlos en microtubos de 1,5 mL e incubarlos en tampón de lisis con proteinasa K (200 µg/mL) por 3 h a 56°C. La extracción se hizo siguiendo el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8 y precipitación del ADN con etanol y sales. El ADN obtenido se resuspendió en

tubos Eppendorf con 50 µL de agua libre de nucleasas, conservándose a – 20°C hasta su uso.

La integridad del ADN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Detección y tipificación de VPH por PCR. La detección del ADN del VPH se realizó mediante amplificación por PCR utilizando el *kit PVH-Fast* de Laboratorios Pharmagen (España), con cebadores específicos a la secuencia de 450 pares de base (pb) correspondiente a la región L1 del marco abierto de lectura del virus (secuencia de ADN similar entre los distintos genotipos del VPH), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación fue realizada en un equipo de PCR System 9700 (Applied Biosystems). Posteriormente, el producto de la amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio (0,2 µg/mL) y visualizado en un sistema de documentación de geles (Gel Doc it, UVP).

Interpretación de los resultados. Se consideró una muestra como: a) negativa, cuando se visualizó solo una banda de 1200 pb correspondiente al CIP y b) positiva, cuando se observó una banda de 450 pb más una banda de 1200 pb del CIP. En los casos positivos, el fragmento amplificado de 450 pb fue digerido con dos enzimas de restricción suministradas en el *kit* (*Rsa* I y II), para obtener el genotipo viral específico. Para visualizar el patrón de bandas, el digerido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio (0,2 µg/mL) y visualizadas en el sistema de documentación de geles. Los productos de la digestión fueron comparados

con los patrones de restricción facilitados por el fabricante del *kit*. Para el análisis de los datos, se excluyeron las muestras con genotipo viral indeterminado.

Por otro lado para determinar la expresión de p16 las muestras de biopsias de cuello uterino de cada paciente fueron agrupadas mediante la técnica de Microarray tisular de la siguiente manera: Se identificaron las zonas con presencia de crecimiento tumoral en los bloques de las biopsias seleccionadas, luego mediante una aguja hueca se extrajeron cilindros de 1 mm de diámetro, de las zonas del tejido donde se había evidenciado la presencia del tumor. Dichos cilindros fueron insertados en bloques de parafina, formando matrices de 28 muestras por bloque. Mediante un micrótopo, se realizaron cortes de dichos bloques, los cuales fueron montados en láminas portaobjeto para su posterior análisis. Mediante esta técnica se logró reducir la cantidad de bloques de parafina y láminas de 59 a 3.

La detección de anticuerpos tumorales en la muestra seleccionada se realizó a través de inmunohistoquímica, mediante la cual se detectó la presencia de p16.

Específicamente, se aplicó inmunohistoquímica indirecta, en la cual, luego de desparafinar, hidratar, realizar la recuperación del antígeno y bloqueo de la peroxidasa, se utilizó un anticuerpo primario, el cual reconoció y se unió al p16. El anticuerpo secundario utilizado, fue un anticuerpo secundario unido a

la biotina, lo que da una coloración marrón característica que permite identificar las células positivas en el microscopio de luz.

La cuantificación de la proporción de p16 se realizó mediante la observación de las láminas y conteo porcentual de las células positivas a la técnica. Se registró la información recabada en fichas de registro conformadas por: expresión de p16, presencia de VPH, tipo histológico, estadio clínico y supervivencia global en meses.

También se estableció una clasificación según el porcentaje de células positivas para la inmunotinción de p16: 0% al 5%: negativo; < 80%: positivo focal, y > 80%: positivo difuso (16).

Los datos obtenidos se sistematizaron en Microsoft Excel ® y fueron analizados a partir del procesador estadístico Statgraphics Plus 5.1. De igual forma se recurrió a la estadística inferencial (Anova) para comparar expresión de p16 y VPH según las variables clínico patológicas. Adoptando como nivel de significancia estadística valores de P inferiores a 0,05.

RESULTADOS

De las 59 pacientes que conformaron la muestra se registró una edad promedio de $50,61 \pm 1,58$, con una variabilidad promedio de 12,14 años, y un coeficiente de variación de 24% (serie homogénea entre sus datos). Siendo el grupo de edad más frecuente el de 45 a 64 años (64,2%= 37 casos).

El p16 se encontró positivo en 76,27% de las pacientes estudiadas (45 casos) y 76,27% de las pacientes presentó VPH (45 casos). De aquellas pacientes con VPH fueron más frecuentes las que presentaban genotipos de VPH altamente oncogénico (82,22 %=37 casos) siendo el genotipo más frecuente el 16 (14 casos) y el 51 (6 casos). Los genotipos con bajo riesgo oncogénico representaron un 17,78% (8 casos), siendo los tipos más frecuentes el 6 (5 casos) y el 11 (3 casos) ver cuadro 1.

CUADRO 1. Clasificación de las pacientes según edad, expresión de p16, presencia de VPH y el genotipo específico de VPH

Edad (años)	f	%
<45	16	27,11
45 – 64	37	62,71
> 64	6	10,16
P 16	f	%
Negativo	14	23,73
Positivo	45	76,27
Presencia de VPH	f	%
Positivo	45	76,27
Negativo	7	11,86
No procesado	7	11,86
Total	59	100

Cuadro 1. (cont.)

Genotipo de VPH			
Bajo riesgo oncogénico		f	%
6		5	11,11
11		3	6,67
TOTAL		8	17,78
Alto riesgo oncogénico		f	%
16		14	31,11
18		4	8,88
30		1	2,23
31		3	6,67
32		1	2,23
33		5	11,11
35		1	2,23
45		2	4,44
51		6	13,34
TOTAL		37	82,22

Número total de la serie de 45 VPH positivo.
VPH: Virus del papiloma humano.

Al momento de clasificar el riesgo oncogénico según la expresión del P16 se tiene que de las pacientes que presentaron genotipos de VPH altamente oncogénicos predominaron aquellas con expresión positiva del p16. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el riesgo oncogénico ($X^2= 0,27$; 1 gl; $P= 0,4666 > 0,05$) (cuadro 2).

CUADRO 2. Riesgo oncogénico de VPH según la expresión del p16

P16	Negativo		Positivo		Total	
	f	%	f	%	f	%
Riesgo oncogénico						
Alto	11	29,72	26	70,27	37	82,22
Bajo	3	37,5	5	62,5	8	17,7
Total	14	31,11	31	68,8	45	100

El p16 se encontró positivo en la mayoría de las pacientes de cada tipo histológico. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el tipo histológico de carcinoma ($X^2= 5,42$; 5 gl; $P= 0,3673 > 0,05$) (cuadro 3).

Cuadro 3. Expresión de p16 según tipo histológico de carcinoma invasor de cuello uterino.

P16 Tipo histológico	Negativo		Positivo		Total	
	f	%	f	%	f	%
CA epidermoide no queratinizante	9	29,03	22	70,97	31	49,15
CA epidermoide queratinizante	3	14,28	18	85,72	21	35,59
ADC	2	33,33	4	66,67	6	10,17
CA adenoescamoso	0	0	1	100	1	1,69
Total	14	23,73	45	76,27	59	100

CA: Carcinoma. ADC: Adenocarcinoma.

En los estadios I y II La expresión del P16 estuvo positiva en (96,16%= 25 casos) y en los estadios III y IV (60,61%= 20 casos); Encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el estadio precoz de la enfermedad ($P= 0,0375 < 0,05$) (cuadro 4).

Cuadro 4. Expresión de P16 según estadio de la enfermedad.

P16 Estadio	Negativo		Positivo		Total	
	f	%	f	%	f	%
I y II	1	3,84	25	96,16	26	44,06
III y IV	13	39,39	20	60,61	33	55,94
Total						100

En el gráfico 1 se evalúa la supervivencia global según la expresión del p16, donde se observa que no hay una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y la supervivencia global.

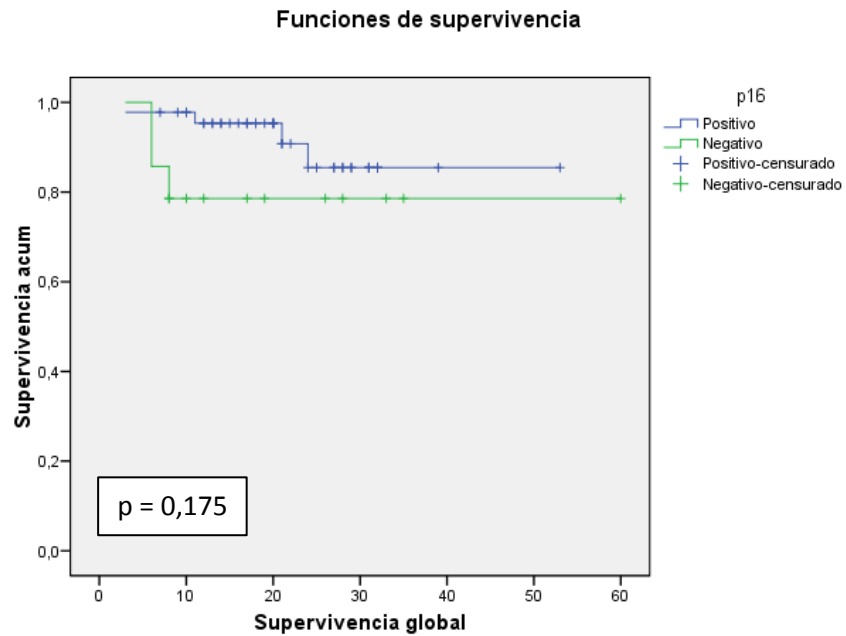


Gráfico 1 Supervivencia global según expresión de p16

DISCUSIÓN

La edad promedio fue de $50,61 \pm 1,58$, siendo el grupo de edad más frecuente el de 43 a 60 años ($59,32\% = 35$ casos).

El p16 se encontró positivo en un $76,27\%$ de las pacientes y $76,27\%$ de las pacientes presentó VPH (45 casos) coincidiendo con trabajos presentados donde se demuestra que existe sobreexpresión de p16 en los carcinomas del cuello uterino, relacionado con la infección por VPH (23, 24). De aquellas pacientes con VPH se tiene que fueron más frecuentes las que presentaban genotipos de VPH altamente oncogénico ($62,71\% = 37$ casos) siendo el genotipo más frecuente el 16 (14 casos) y el 51 (6 casos) coincidiendo con los estudios publicados por Nubia Muñoz en la (IARC) (6). Los genotipos con bajo riesgo oncogénico representaron un $13,55\%$ (8 casos), siendo los tipos más frecuentes el 6 (5 casos) y el 11 (3 casos) lo cual es un porcentaje elevado con respecto a otras publicaciones las cuales hablan de poca relación de VPH de bajo riesgo con carcinoma de cuello uterino 1 a 2 % (6). ($11,86\% = 7$ casos) resultaron negativos para VPH esta circunstancia podría deberse a diferentes factores, como un falso negativo en la detección del virus por escaso número de copias víricas o por pérdida de la región subgenómica en el ADN vírico.

La mayoría de las pacientes con genotipo de VPH altamente oncogénico presento expresión positiva del p16. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el riesgo oncogénico lo que parece indicar que también existen vías desconocidas de activación de la p16 independientes de la acción del HPV (26). Por otra parte diferentes trabajos presentan una alta relación entre p16 y alto riesgo oncogénico (14, 19, 20).

El p16 se encontró positivo en la mayoría de las pacientes de cada tipo histológico. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el tipo histológico de carcinoma. En contraste con otros trabajos donde la inmunotinción positiva ha sido fundamentalmente descrita en carcinomas escamosos y negativa en adenocarcinomas (17 y 19).

Hay una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el estadio precoz de la enfermedad, así pues, parece que la expresión de p16 es un factor de buen pronóstico en el carcinoma invasor de cuello uterino, no hay suficiente bibliografía que hable al respecto.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y la supervivencia global de la enfermedad, coincidiendo con el trabajo de Bodner K y col, donde tampoco encontraron relación entre estas dos variables (25), sin embargo, los datos de este estudio podrían

variar, debido a que la mayoría de las pacientes no habían alcanzado los 30 meses de evolución al momento de su última evaluación.

CONCLUSIONES

En conclusión, como hallazgos relevantes de este estudio, se puede señalar en primer lugar, que el p16 se encontró positivo en un 76,27% de las pacientes estudiadas y un 76,27% de las pacientes presentó VPH.

No se encontró una relación significativa entre la expresión del p16 y el riesgo oncogénico.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y el tipo histológico de cáncer.

Hay una alta relación del p16 con los carcinomas diagnosticados en estadio precoz. Lo que lo podría relacionar como un factor pronóstico favorable en este tipo de lesiones, sin embargo, es necesario tener un mayor seguimiento de estos casos.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del p16 y la supervivencia global, es necesario tener un mayor seguimiento de estos casos.

Los resultados revelan que la tinción inmunohistoquímica de p16 puede aplicarse exitosamente a las muestras de biopsia en bloques de parafina.

Por lo tanto, ofrece resultados más objetivos y reduce las interpretaciones falsas negativas y falsas positivas.

Hasta el momento, la investigación de p16 es de uso limitado para evaluar el pronóstico de los pacientes y orientar la actuación clínica desde el punto de vista terapéutico.

RECOMENDACIONES

Una vez culminado este proyecto de investigación, se recomienda mantener el interés en estudiar la expresión de p16 en el carcinoma invasor de cuello uterino, así como su papel en la evolución de la enfermedad y se propone:

- Ampliar la muestra en estudio.
- Continuar el seguimiento de estas historias para obtener datos más precisos sobre el tema.
- Analizar y considerar la expresión de p16 como prueba de rutina para la evaluación del carcinoma invasor de cuello uterino.
- Analizar y considerar la detección de ADN viral del VPH como prueba de rutina para la evaluación del riesgo del carcinoma invasor de cuello uterino.
- Organizar y sistematizar la creación y cumplimiento del registro único estatal y nacional para lesiones pre invasoras e invasoras de cuello uterino.
- Continuar la utilización de la técnica de Microarray, permitiendo la realización de estudios de muestras numerosas, con la utilización de menor cantidad de materiales y en periodo de tiempo más corto.
- Mejorar los métodos de almacenamiento de muestras e historias clínicas en las instituciones públicas de nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- World Health Organization. WHO (2014). Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC. Centro de prensa. Cáncer. Nota descriptiva N°297. Febrero de 2015.
- 2.- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de mortalidad 2011. [Documento en línea, consultado en febrero 2015]. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad.
3. - Von KM. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. Eur J Cancer 2002; 38:2229-42.
4. - Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. Cancer Biol Ther 2011; 11:295-306.
5. - Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, et al. Efficient selfassembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. J Virol 1993;67:6929-36.
6. - Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999; 189:12-19.
- 7.- Zur-Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. Proc Assoc Am Physicians 1999; 111:581-587.
- 8.- Berumen J, Ordóñez RM, Lazcano E, Salmerón J, Galván SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. J Natl Cancer Inst 2001;93:1325-30.
9. - Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Int J Cancer 1999;80:827-41.
- 10.- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J Natl Cancer Inst 1995;87:796-802.
- 11.- Giarré M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein

is essential to efficiently overcome p16 ink4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol.* 2001;75:4705-12.

12.- Lerma E, Esteller M, Herman JG, Prat J. Alterations of the p16ink4a/Rb/cyclin D1 pathway in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and lichen sclerosus. *Human Pathol* 2002; 33:1120-5.

13.- Hodges A, Smoller BR. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol* 2002;15:1121-5.

14.- Mortier L, Marchetti P, DelaPorte E, Martin de Lassalle E, Thomas P, Piette F, et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16 (INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett.* 2002;176:205-14.

15.- Pavey S, Conroy S, Russel T, Gabrielli B. Ultraviolet radiation induces p16 expression in human skin. *Cancer Res.* 1999; 59: 4185-9.

16.- Martorell-Calatayud A, Requena C, Botella-Estrada R, Sanguenza OP. Novedades en biología molecular y su aplicación en el diagnóstico y el tratamiento del melanoma. *Actas Dermosifiliográficas.* 2009; 100(Supl.1: Spl):52-65.

17.- Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Kucukali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract.* 2007;203:445-9.

18.- Francisco TG. Papel de p16 en lesiones pre invasivas e invasivas de cáncer de cuello uterino. Aplicación de la técnica a citología convencional. *Prog Obstet Ginecol* 2011;54(4):193-203.

19.- Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus A, Riethdorf L, Löning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16 mts1, p21 waf1 and p27kip1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch.* 2001;439:55-61.

20. - Jesus AR. El papel modulador de p16ink4a en la infección por el virus del papiloma humano. *Revista Clínica Española.* 2005; 205(5):248-51.

21.- Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:147-172.

22.- Moyer VA, LeFevre ML, Siu AL, Bibbins-Domingo K, Curry SJ, Flores G, et al. for the U.S. Preventive Services Task Force. Screening for cervical cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2012;156:880-891.

23.- Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cane S, Bellone S, et al. Gene expression profiles of primary HPV16 and HPV18 infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005; 331:269-91.

24.- Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ;95:14932-7.

25.- Klaus B, Peter L, Oliver K, Klaus C, Robert Z, Barbara B. Expression of p16 protein and epidermal growth factor receptor in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: an immunohistochemical analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* March 2011, Volume 283, Issue 3, pp 611-616.

26.- Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade B, Sun D, et al. Ki 67, cyclin E and p16 ink4a are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;549:40-59.

ANEXOS



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLÓGICA
INSTITUTO ONCOLÓGICO DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO



INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

N°:

NOMBRE:	EDAD:	CÉDULA:	HISTORIA:
BIOPSIA N°:	DIAGNÓSTICO:	ESTADIO:	
FECHA DX:	TRATAMIENTO:		
ESTADO:	FECHA:		
GENOTIPO VPH:	INMUNOHISTOQUÍMICA:		