

Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. Revisión sistemática

M.C. José Gerardo Zertuche-Zuani,*

M.C. Michelle Salazar-Gallegos,** M.C. Álvaro Eduardo Peña-Jiménez,*** M.C. Drusso Vera-Gaspar****

Hospital Español de México/Colegio Nacional de Docencia e Investigación en Colposcopia. Ciudad de México.

RESUMEN

Este documento se centrará en los biomarcadores de proteínas actualmente bajo investigación para su uso en la detección del cáncer de cuello uterino que parecen mejorar la detección de las mujeres en mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical, incluyendo Ki-67, p16INK4a, BD ProEx C, y Cytoactiv HPV L1. Estos biomarcadores tienen un papel importante en la clasificación de los casos de citología indeterminada, la discriminación de cierto alto grado de displasia cervical de imitadores en la histología, y puede servir como marcadores predictivos para identificar las lesiones con más probabilidad de desarrollar una enfermedad de alto grado y el cáncer cervical.

El uso combinado de la citología más la prueba de VPH tiene un muy alto valor predictivo negativo. Como tal, es útil para cribar una población presunta normal y saludable para la presencia de lesiones de alto grado y estratificar a los pacientes en dos grupos: 1) pacientes con VPH negativo, con citología normal que tienen un riesgo bajo de desarrollar lesiones y, por tanto calificar para un intervalo de cribado amplio. 2) de los pacientes que están con citología anormal o VPH positivo y que están en mayor riesgo de desarrollar lesiones del alto grado y requieren de una vigilancia más activa.

Palabras clave: Biomarcadores, cáncer cervical, virus del papiloma humano.

Introducción

El cáncer cervical es el segundo cáncer más común en las mujeres en todo el mundo y sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Dado que la prueba de Papanicolaou se introdujo en la década de 1940, ha habido una reducción de aproximadamente 70% en la incidencia de

Immunohistochemical markers for human papilloma virus. Systematic review

SUMMARY

This paper will focus on protein biomarkers currently under investigation for use in the detection of cervical cancer that appear to improve the detection of women at increased risk of developing cervical cancer, including Ki-67, p16INK4a, BD ProEx C, and Cytoactiv HPV L1. These biomarkers have an important role in the classification of indeterminate cytology cases, discrimination of certain high grade cervical dysplasia imitators on histology, and can serve as predictive markers for identifying lesions are most likely to develop a disease high degree and cervical cancer.

The combined use of cytology plus HPV testing has a very high negative predictive value. As such, it is useful to screen a presumed normal healthy population for the presence of high-grade lesions and stratifying patients into two groups: 1) patients with HPV negative, with normal cytology who have a low risk for injury and therefore qualify for a broad screening interval. 2) patients with abnormal cytology who are HPV positive or who are at increased risk of developing high-grade lesions require more active monitoring.

Key words: Biomarkers, cervical cancer, human papilloma virus.

cánceres de células escamosas de cuello uterino en muchos países.

Es el método más utilizado en la actualidad para la detección precoz del cáncer del cérvix uterino, la cual ha demostrado en forma amplia su utilidad dada su capacidad para detectar las lesiones precursoras de cáncer, lo cual ha contribuido a disminuir de modo notable la morbimortalidad por esta neo-

* Ginecólogo Investigador Hospital Español de México-UNAM. ** Médico Cirujano Colposcopista Hospital Español de México. *** Ginecólogo Colposcopista Hospital Español de México. **** Ginecólogo Colposcopista y Presidente Vitalicio del Colegio Nacional de Docencia e Investigación en Colposcopia, A.C.

Correspondencia:

José Gerardo Zertuche Zuani

Ejército Nacional No. 617, Cons. 905 Col. Granada, C.P. 11520, México, D.F.

Recibido: Agosto 2, 2013.

Aceptado: Septiembre 4, 2013.

plasia. 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.¹⁻³

Inmunohistoquímica

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 (*Cuadro 1*). 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.

El uso de tinciones de tejidos para facilitar su observación microscópica se inició con la hematoxilina-eosina en el siglo XIX. En el primer tercio del siglo XX se introduce la histoenzimología que utiliza tejidos sin fijar y de la que quedan únicamente restos, como los estudios con DPNasa y

ATPasa en enfermedades musculares. La primera inmunohistoquímica se realizó con anticuerpos fluorescentes sobre tejidos frescos como los que se utilizan actualmente en diversas enfermedades de piel y riñón. Los métodos inmunoenzimáticos (peroxidasa, avidina-biotina) que permitían amplificar la señal del cromógeno favorecieron la utilización de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Actualmente se utilizan polímeros sintéticos para amplificar la señal (Envision, PowerVision).

La inmunohistoquímica es una técnica esencial en el diagnóstico anatomopatológico de las enfermedades, fundamentalmente de las neoplásicas. Para que su utilidad sea plena es necesario realizar la fijación de los tejidos, las indicaciones de uso, las técnicas y la lectura y valoración de los resultados ateniéndose a unos criterios de Controles de Calidad tanto internos, como externos (*Figuras 1 y 2*).

La inmunohistoquímica se puede realizar en tejidos de biopsia y de autopsia, generalmente fijados en formol e incluidos en parafina, así como en material de citología.

La fase de fijación del material para inmunohistoquímica es esencial. Una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable.

El fijador que se utilizará para inmunohistoquímica es el formaldehído al 4% tamponado a pH 7,4 (formalina). El periodo ideal de fijación no será menor de 24 horas ni mayor de 48 horas. Fuera de estos estándares la calidad de la técnica baja sensiblemente. Es aconsejable, por tanto, indicar en la hoja de petición de la biopsia la hora en que se introdujo en formol. Hay evidencias de que la fijación a mayores temperaturas que la ambiental empeora los resultados.

Cuadro 1. Biomarkers used in cervical cancer screening and diagnosis.

Biomarker	Staining Pattern	Cellular process detected	Reported use of biomarker
Ki-67	Nuclear	Increased Ki-67 staining reflects increased epithelial cell proliferation found in HPV-infected tissues.	(i) Measure of cell proliferative capacity. (ii) Recognizes tissues involved by HPV and extent of Ki-67 immunostaining generally parallels increasing grades of dysplasia. (iii) Predominantly used in histology applications.
p16INK4a	Nuclear and cytoplasmic	p16 levels increased in response to irregular cell cycle inactivation resulting from the disruption of interaction of pRb with transcription factor E2F in the presence by the HPV E7 oncogene.	(i) Detection can serve as a surrogate biomarker for persistent infection with high-risk HPV. (ii) Triage of equivocal cytology findings can facilitate identification of abnormal cells in cytology preparations. (iii) Aid in interpretation of histological material. Limited evidence for use as a predictor of disease progression in histology specimens.
BD ProEx C	Nuclear	Increased cellular levels of MCM2 and TOP2A due to aberrant transcription of S-phase proteins resulting from the interaction of HPV E6 and E7 oncoproteins with cell cycle proteins p53 and Rb.	(i) Marker of cells with proliferative capacity. (ii) Triage from abnormal cytology to increase PPV over cytology alone or HPV triage for detection of CIN2+ disease. Can also facilitate identification of abnormal cells in cytology preparations. (iii) Use in histology to distinguish true dysplasia from mimics such as reactive/reparative changes, immature squamous metaplasia, and atrophy.
Cytoact iv HPV L1	Nuclear	HPV L1 capsid protein found in mild-to-moderate dysplasias, but lost in higher-grade intraepithelial neoplasias.	(i) Possible prognostic marker to identify early dysplastic lesions most likely to progress to high-grade disease.

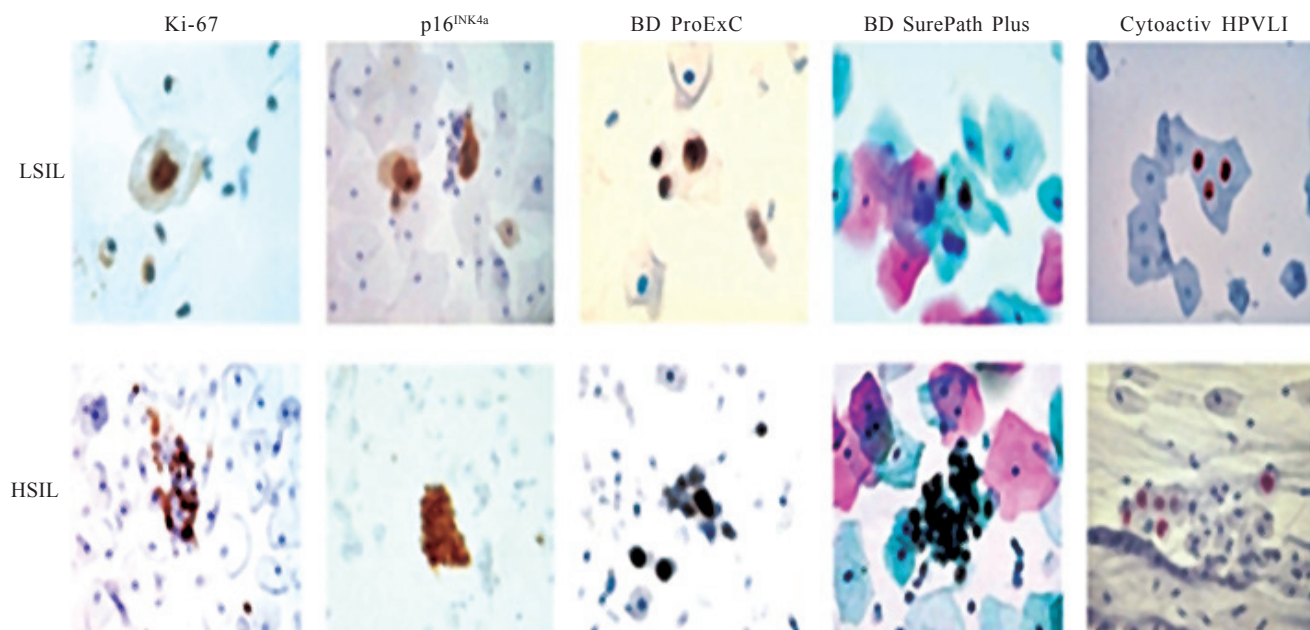


Figura 1. Biomarcadores y su expresión en lesiones de bajo y alto grado en muestras de citología cervical. Ki-67, p16INK4a, BD ProEx C y BD SurePath Plus expresión detectado en muestras de citología de base líquida y Cytoactiv HPV L1 tinción realizado en los frotis de Papanicolaou convencionales (L1 imágenes cortesía del Dr. Ralf Hilfrich).

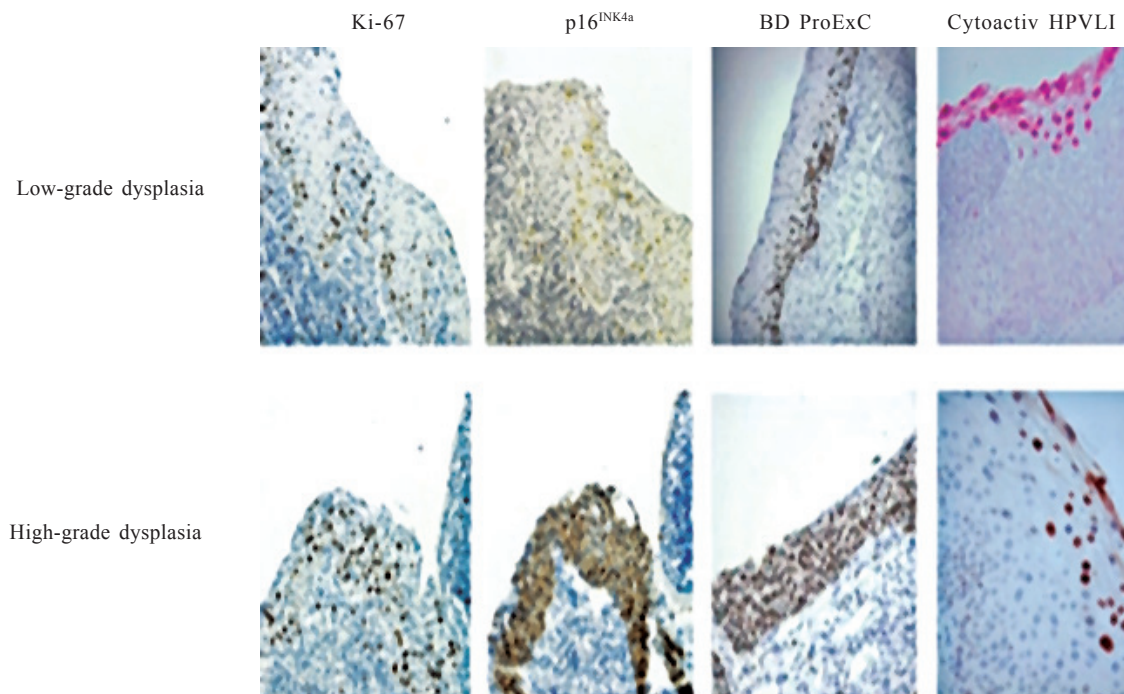


Figura 2. Biomarcadores en la expresión en la neoplasia intraepitelial cervical. El compartimento proliferativo se expande progresivamente con el grado histológico, y esto es paralela a la aparición de la inmunotinción para Ki-67, p16INK4a, y BD ProEx C en las capas epiteliales más superficiales, con la mayoría de la tinción en el epitelio alto grado. Para Cytoactiv HPV L1, mayor expresión se encuentra en lesiones de bajo grado, con una pérdida de proteína L1 observa a menudo en lesiones de alto grado (L1 imágenes cortesía del Dr. Ralf Hilfrich).

Lo ideal para las piezas mayores es mantenerlas en el frigorífico a 4 °C si se van a dejar toda la noche antes de tallarlas.

La inmunohistoquímica con vimentina permite observar el deterioro sufrido durante la fijación. Cuando el tejido ha

estado menos de 24 horas en formol se produce una fijación híbrida: periféricamente se fijan con formol mientras las partes profundas centrales lo hacen gracias a los alcoholes que se emplean durante el procesamiento. Esto les hace más sen-

sibles a los métodos de recuperación antigénica y resultan más falsos positivos.

Las citologías, al no tener que fijarse en formol, llevan un procesamiento diferente.

Hay dos posibilidades, o bien realizar la inmunohistoquímica sobre la misma laminilla citológica o también despegar las zonas deseadas y transferirlas a otras portas.

Esta última es más tediosa, pero ofrece los mejores resultados y permite sacar varias portas de una sola extensión citológica. El método es muy reciente y se desarrolla de la siguiente manera:

Es importante la utilización del medio Mount-Quick (Newcomer supply. Middleton WI) (Cancer Cytopathol 2005;105:158/ J Histoch 2002;25:251).

- Poner el medio sobre la laminilla y endurecerlo en estufa a 50-60 °C varias horas.
- Marcar las zonas a estudiar con rotulador indeleble.
- Calentar al baño María (45 °C) durante 15-20 minutos para ablandarlo.
- Levantar el medio de la porta con un bisturí y córtalo en láminas.
- Transferir a porta adherente especial y mantener durante un minuto una presión con papel de filtro humedecido.
- Mantener a 60 °C durante toda la noche.
- Retirar el MontQuick mediante tres pasos por xilol.
- Rehidratar (no es necesario desteñir si se va a utilizar HIER).

Optimización de la inmunorreactividad

Los factores más importantes son:

- Dilución del anticuerpo primario.
- Duración de la incubación del primario.
- Tipo y concentración del anticuerpo secundario.
- Técnica de recuperación antigénica empleada.
- Temperatura de incubación.
- Sistema de detección y amplificación.

En la práctica se manejan únicamente tres variables:

- Dilución del anticuerpo primario.
- Tiempo de incubación del primario (si se aumenta el tiempo se puede diluir más el anticuerpo primario).
- Técnica de recuperación antigénica (el EDTA alcalino suele ser mejor que el citrato. Excepciones: LMP-1 y CD21, en los que se preferirán enzimas).

Además de la positividad de la diana debe valorarse el fondo. Dicha tinción de fondo tiene causas variadas. A veces es debido a que el anticuerpo no está totalmente purificado y tiene inmunoglobulinas inespecíficas. Muchas veces es por una titulación deficiente del anticuerpo primario y/o secundario (disminuir la concentración y aumentar los tiempos para solucionarlo). En las tinciones citoplásmicas deben tenerse en cuenta los falsos positivos como los debidos a

biotina endógena (neutralizarla con avidina después del anticuerpo primario) y con las peroxidasas (se neutraliza con agua oxigenada) y fosfatasa (se bloquea con levamisol) endógenas.

Anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser poli o monoclonales. Estos últimos son más específicos y se obtienen mediante el método de hibridoma de Kohler que consiste en la fusión de células esplénicas de un ratón inmunizado con una línea celular de mieloma no secretor murino. Dado que el conejo es más fácil de inmunizar que el ratón actualmente se están introduciendo anticuerpos monoclonales de conejo a pesar de que este animal no padece mieloma, por lo que deben generarse heterohibridomas conejo-ratón. Los anticuerpos de conejo son más sensibles y parecen conservar la especificidad. (Am J Clin Pathol 2005; 124: 295). Metástasis de primario desconocido (J Histoch 1999; 22: 209).

- Las citoqueratinas (CK) se clasifican según el Pm y el punto isoeléctrico (Moll). *In vivo* tienden a expresarse en parejas, una básica y la otra ácida (CK8/CK18; CK5/CK14).

En la práctica las más útiles son:

PanCK AE1-AE3

- 34beta E12 (alto Pm): se detecta en epitelios complejos como el ductal, el transicional y los escamosos.
- CK 1,5,10 y 14: en carcinomas escamosos pobremente diferenciados y en mesotelio.
- CK5/6: positivo en células basales, en carcinomas escamosos pobremente diferenciados y en mesotelio. de nuevos anticuerpos.
- CEA: generalmente positivo en carcinomas de pulmón, hígado y colorrectal. A veces positivo en mama, transicionales y cérvix. Generalmente negativos en mesotelio-ma, riñón, endometrio y ovario.
- p 16: sobreexpresado en carcinomas y displasias asociadas a VPH.

Enlacarcinogénesis cervical, el papiloma humano (HPV) es esencial, su presencia está documentada en casi todos los cánceres invasivos y en hasta 90% de las lesiones precancerosas. Muchas observaciones indican la importancia de la respuesta inmune en la infección por VPH.

El uso de biomarcadores en tanto la citología cervical y la histología han demostrado la capacidad para superar los problemas con resultados tanto falsos positivos y falsos negativos, lo que lleva a un mejor valor predictivo positivo de los resultados del cribado cervical. Numerosos biomarcadores de proteínas para la detección de enfermedad cervical han sido identificadas. Muchas de estas proteínas están implicadas en la regulación del ciclo celular, transducción de señales, la replicación del ADN, y la proliferación celular.^{4,5}

La alteración de la expresión de estas proteínas es una consecuencia de la unión del VPH de alto riesgo de oncogenes E6 y E7 para albergar proteínas reguladoras, lo que resulta en la degradación del producto de gen supresor tumoral p53 y la inactivación de la proteína de retinoblastoma que conduce a la desregulación del ciclo celular.

En contraste con los marcadores celulares, la proteína de la cápside L1 de HPV es una proteína específica del virus y un estímulo importante del sistema inmune que se utiliza dentro de las vacunas contra el VPH.

La proteína de la cápside L1 se expresa en la fase activa de la infección viral y es necesaria la terminación del ciclo celular. Por lo tanto, la expresión inmunoquímica de la proteína de la cápside es una evidencia de infección activa por VPH en el tejido examinado. Esta proteína de la cápside se considera un importante objetivo de la respuesta inmune celular.⁶⁻¹⁰

Dado el hecho de que el papel oncogénico de HPV se ejerce por afectar el control del ciclo celular, no es sorprendente que la mayoría de los biomarcadores útiles de VPH relacionados con lesiones uterinas son proteínas del ciclo celular, p16 y Ki67 son los más ampliamente utilizados. Más recientemente, perfiles moleculares y las pruebas de marcadores de combinación han identificado la utilidad de los cócteles de anticuerpos, tales como p16/Ki67 dual y CProEx, que detectan tanto TOP2A y MCM2 proteínas del ciclo celular.

Para la detección de la proteína L1 de la cápside 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 L1 presente en los subtipos virales de alto riesgo, que se expresa sólo en las células superficiales que evidencian cambios de coilocitosis.

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.

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.

p16INK4a

Es una proteína reguladora del ciclo celular, con su expresión estrechamente controlada en las células normales, codi-

ficada por el gen supresor CDKN2A (MTS1, INK4A) situada en el cromosoma 9p2. Esta proteína supresora de tumores inhibe quinasas dependientes de ciclo-cdk4 y cdk6, que fosforilan la proteína del retinoblastoma (Rb)^{9,10} y la subsiguiente inactivación, lo cual libera E2F y permite a la célula entrar en la fase S. Por lo general, la unión de Rb a los bloques de E2F impulsado por la activación del ciclo celular.¹¹ En una transformación de la infección por VPH, sin embargo, el oncogén viral E7 interrumpe la unión de la proteína Rb al factor de transcripción E2F, lo que resulta en el aumento drástico de los niveles de p16INK4a. Su detección puede servir como un biomarcador sustituto para la infección persistente por HPV de alto riesgo. Es ampliamente aceptado que p16INK4a es un marcador sensible y específico de células displásicas del cuello del útero y es un biomarcador útil en el diagnóstico de lesiones cervicales, cáncer y cribado cervical. Múltiples anticuerpos a p16 se han utilizado en estudios de investigación, sin embargo, el clon E6H4 (CINtec, mtm laboratories, Heidelberg, Alemania) parece ser el más comúnmente utilizado. Un doble p16/Ki-67 ensayo inmunocitoquímico ahora también está disponible para su uso como prueba complementaria en la detección del cáncer cervical (CINtec Plus, mtm laboratories AG, Heidelberg, Alemania). En definitiva, la determinación de p16INK4a nos informa de la interacción del VPH con las proteínas reguladoras del ciclo celular y constituye un buen candidato a marcador de proliferación neoplásica.¹²

Ki67

Es un marcador de proliferación, en general se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto G0. Discrimina la proliferación a partir de células en reposo. Por lo tanto, es un excelente marcador de la fracción de células en crecimiento y ayuda a determinar específicamente la actividad de esta fracción. E-cadherina se expresa en la superficie de la normalidad epitelial de las células y es la principal molécula mediadora de la adhesión célula-célula en los epitelios. Se ha implicado en la carcinogénesis, como la pérdida de E-cadherina y su expresión ha sido detectada en los cánceres epiteliales. Esto facilita la célula tumoral invasión y metástasis y por lo tanto ha sido asociada con mal pronóstico en los carcinomas.

BD ProEx C

Es un reactivo marcador biológico a base de proteínas (BD Diagnostics, Burlington, NC, EE.UU.) que contiene anticuerpos para las proteínas nucleares, proteína de mantenimiento (minichromosome 2 (MCM 2)) y la topoisomerasa II alfa (TOP2A), proteínas que se han demostrado que se acumulan en HPV-células transformadas. BD ProEx tinción C se limita a la capa basal de la proliferación de epitelio cervical normal y está ausente en células diferenciadas y de reposo. En contraste, en la displasia cervical escamosa y glandular, BD ProEx expresión C aumenta drásticamente, debido al aumento de la transcripción de genes en fase S (S-aberrante

fase de inducción) resultante de la acción de la proteína E7 de HPV oncogénico.

El mantenimiento de la función de la proteína del minicromosoma (MCM) en las primeras etapas de la replicación del ADN a través de la carga del complejo prereplicación en el ADN y que funciona como una hélice para ayudar a desenrollar el ADN dúplex durante la síntesis de novo de la cadena de ADN duplicado,^{13,14} que se produce antes de la fase S en mitosis tardía y G1 temprana, implica la carga estable del mantenimiento minicromosoma (MCM) complejo que comprende seis proteínas MCM2-replicación, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 y MCM7 (denominados MCM2-7)-en el ADN en los orígenes de replicación. La expresión de todos los seis MCMs se ve a lo largo de todas las fases del ciclo celular y es salida siguiente del ciclo celular en latencia, la diferenciación, la senescencia, por lo tanto, son un único marcador de células con capacidad proliferativa. La desregulación de MCM2-7 parece ser un evento temprano en la tumorigénesis de varios pasos, y muchos estudios han demostrado que existe una expresión inapropiada de MCM2-7 en una amplia variedad de displasias premalignas y cánceres.^{15,16}

Similares a los marcadores MCM2-7, la topoisomerasa II- α (TOP2A) se ha demostrado que se sobreexpresa en la neoplasia cervical tanto en el mRNA y los niveles de proteína.¹⁷⁻²⁰ TOP2A es una enzima nuclear responsable de relajar el ADN superenrollado durante la replicación del ADN y la condensación de los cromosomas durante la mitosis por lo que es necesario para la segregación de los cromosomas hijos al final de la replicación. La evaluación de la expresión TOP2A ha demostrado que la sobreexpresión TOP2A se asocia con la progresión de CIN2 a la neoplasia cervical avanzada.¹⁷

El BDProEC fue diseñado como una prueba de reflejos para identificar CIN2 (+) en mujeres con ASC-US y LSIL en los resultados citológicos. La prueba de próxima generación diseñada para aplicaciones de detección primaria, BD SurePathPlus, combina en una tinción de portaobjetos Papanicolaou tradicional para la morfología celular, en combinación con la detección inmunocitoquímica de la sobreexpresión de dos biomarcadores: MCM2 y MCM7.

Cytoactiv HPV L1 Capsid Protein

El anticuerpo de detección Cytoactiv detecta la proteína L1 de la cápside de todos los tipos conocidos de VPH. Junto con la proteína L2, la proteína L1 de la cápside forma una cubierta protectora para el material genético viral. Además, es un ligando para un receptor de la superficie de la célula huésped en la capa de células basales/parabasales del epitelio, el acceso a la capa basal del epitelio, como resultado de erosiones epiteliales o ulceraciones de la mucosa en la zona de transformación susceptibles a la inflamación en la unión escamocolumnar. La expresión L1 VPH se encuentra en la fase temprana productiva de la infección por VPH, pero se pierde progresivamente durante la carcinogénesis cervical. Esta pérdida de la expresión de L1 puede ser resultado de la inte-

gración del ADN viral en el genoma humano, que pueden alterar el gen L1 o causar la pérdida de la expresión de L1, segregando el promotor viral del gen de la L1, o puede reflejar una anomalía en vías de factor de transcripción o en el control de la traducción de proteínas L1.^{21,22}

Como la proteína L1 de la cápside es uno de los objetivos principales de células T mediada por la respuesta inmune, las células con una falta de síntesis de la proteína L1 puede escapar al reconocimiento del sistema inmunológico, lo que permite la progresión de la enfermedad. Datos prometedores mediante la prueba de Cytoactiv (Cytoimmun, Pirmasens, Alemania) apoya esta noción, con progresión de la enfermedad más frecuentemente detectado en L1-negativos en las lesiones intraepiteliales.²³⁻²⁶

Telomerasa

Múltiples estudios se han llevado a cabo para evaluar a la telomerasa como un posible marcador para HSIL y cáncer cervical invasivo, teniendo en cuenta que la detección de actividad de la telomerasa es útil para el cribado citológico de las lesiones cervicales con muestras celulares y de tejidos de cuello uterino. La estabilidad de la longitud del telómero es necesario para la supervivencia de la línea germinal de células humanas, células diferenciadoras y también para la inmortalización del fenotipo celular derivada de cáncer. Esta característica se logra a través de la telomerasa, una ribonucleoproteína capaz de extender el cromosoma con secuencias específicas de ADN telomérico. Esta enzima compensa el problema de replicación de extremo y permite a las células a proliferar indefinidamente.

EGFR

El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia ErbB. Es un receptor tirosina quinasa con efectos promotores de crecimiento,²⁷ incluyendo un reconocido potencial angiogénico. El gen EGFR se localiza en el cromosoma 7 y codifica una superficie glicoproteína transmembrana, que se une epidérmico al Factor de crecimiento (EGF), factor de crecimiento transformante alfa, anfirregulina, y al Factor de crecimiento de unión a heparina. En la activación del EGFR, el VPH-E5 oncogén puede participar y esto puede ocurrir sin un concomitante crecimiento del número de receptores.^{16,17} VPHE6 oncogén se puede establecer después del aumento de EGFR mRNA nivel y la estabilización de la proteína, y por lo tanto, aumentará la transducción de señales en las células. HPV-E5 oncogén establece una aceleración de Her-2/neu (c-erbB2) activación de la proteína. EGFR parece tener, junto con c-erbB2 y c-myc, un papel importante en el pronóstico de la progresión cáncer cervical. Sin embargo, su participación en las primeras etapas o en el desarrollo de lesiones preneoplásicas todavía no está claro y controvertida, siendo mencionado años antes, abandonado y se reanuda de nuevo. La expresión de EGFR puede estar asociada con la infección por VPH, pues su expresión aumenta

con el grado cada vez mayor de la lesión escamosa intraepitelial, pero no con el tipo de VPH.

(COX-2)

La ciclooxigenasa 2(COX-2) regula la síntesis de prostaglandinas, y los residuos metabólicos producidos por la COX-2 de acción contra el ácido araquidónico, los cuales están implicados en la carcinogénesis a través de varios mecanismos, tales como la inhibición de la apoptosis, la vigilancia inmune, y el aumento de la neoangiogénesis.¹⁸ En consecuencia, la COX-2 desempeña un papel en la aparición y la progresión de neoplasias malignas, incluyendo el carcinoma del cuello del útero, y se considera como un marcador de tumor y agresividad.^{18,19} Lamentablemente, sólo un pequeño número de estudios reportados. Esta vía puede ser inducida por una variedad de estímulos (citoquinas, factores de crecimiento y la promoción de tumor-carcinógenos químicos).²⁸ La sobreexpresión de COX-2 podría afectar las respuestas inmunitarias del huésped, por la capacidad de los inhibidores COX-2 para revertir la inmunosupresión inducida por tumor.

Evaluación del riesgo de progresión

Una cuestión importante en el manejo del cáncer de cuello uterino es la evaluación del riesgo de progresión de las lesiones displásicas. Los pacientes con NIC1 deben ser periódicamente evaluados por el riesgo de progresión a lesiones de alto grado o carcinoma. En 70-80% de lesiones de bajo grado remiten espontáneamente y no todas las lesiones de alto grado progresan,²⁹ algunas mujeres pueden someterse a un tratamiento innecesario o tener un retraso en recibir tratamiento. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores para seleccionar las mujeres verdaderamente en riesgo de progresión y en necesidad de tratamiento, lo que puede conducir a ahorros de costes tremendos y eliminar la ansiedad del paciente.

Un número limitado de estudios han reportado que la aplicación de Ki-67 análisis inmunocuantitativo de NIC1 y NIC2 puede predecir la progresión de la enfermedad, con las mejores características para predecir la progresión es el percentil 90 del índice de estratificación y el porcentaje decélulas Ki-67 positivos en la capa media del epitelio.^{30,31}

Estudios prospectivos recientes de cohorte han demostrado que p16INK4a positivo en lesiones de bajo grado tienen un riesgo de progresar a lesiones negativas.

Ozakietal³² examinaron la expresión de la p16INK4a y biomarcadores como PROEXC en lesiones premalignas para determinar qué marcadores podrían ayudar en la predicción de la progresión de CIN1. La expresión de ambos marcadores fue significativamente mayor en el grupo de progresión en comparación con el grupo de regresión, siendo sensible (86%) y moderadamente específico (60 y 61%, respectivamente.) En la predicción de la progresión de CIN1.

Hariri y Hansen³³ compararon el valor pronóstico de la p16INK4a a BDProExCe ISHVPH en cinco casos y encontró

en BDProExCes un marcador confiable para la predicción de los resultados de seis años, con un VPN de 95.3% en comparación con 88.6% para p16 y de 87.5% para HPVISH y un VPP de 51% en comparación con 40.4 y 67.9%, por p16e ISHVPH, respectivamente. Curiosamente, CIN2/3 en la muestras de histología cervicales se han descrito con positividad de p16INK4a muy fuerte, lo que indica la presencia de un pequeño subconjunto de HSIL con baja actividad proliferativa.^{34,35} Casos como éste pueden representar las primeras etapas de regresión. HSILHPV L1 es una proteína capsida que se expresa en la fase temprana, productiva de la infección por VPH, pero progresivamente perdieron durante la carcinogénesis cervical. Un análisis de preparaciones de capa fina mostró que la proteína L1 capsida se produce en aproximadamente 80% de displasias evesa moderadas, mientras que sólo se pudo detectar en aproximadamente 25% de displasias de mayor grado utilizando métodos inmunológicos,¹⁵ debido, en parte, a la integración del VPH que acompaña el desarrollo de la neoplasia cervical. La detección de la L1 del VPH proteína de la capsida en combinación con p16INK4a, para confirmar la asociación de la lesión con el VPH, se ha informado sirve como marcador de pronóstico que puede diferenciar entre los pacientes que se someten a una transición de una lesión precursora del cáncer y los que tienen lesiones que retroceden.^{24,28} Aunque los datos son todavía preliminares, en los casos en que el grado de lesión es difícil de evaluar morfológicamente, el modelo L1 puede ser útil para decidir el manejo adecuado de las mujeres. Negativos L1-VPH de alto riesgo, lesiones leves y moderadas positivas que tienen una probabilidad extremadamente baja a la regresión espontánea(5%) en contraste con la L1 casos positivos que muestran un bajo potencial de malignidad.²⁶

Conclusiones

Una serie de biomarcadores de proteínas están disponibles actualmente para ayudar a mejorar el rendimiento clínico de la detección del cáncer de cuello uterino, por lo tanto, aumenta la importancia de los biomarcadores en los futuros programas de cribado. Se prevé que el uso de estos biomarcadores se puede aplicar tanto como una prueba de reflejo de un espécimen Papatípico, pero también como una pantalla principal para mejorar la precisión global de la prueba de Papanicolau. La introducción de los programas de cribado primario de VPH necesitará el uso de una prueba de reflejo con una alta especificidad para triage el elevado número de pruebas de VPH positivas. Se cree que los biomarcadores también juegan un papel importante en la optimización de este algoritmo de detección alternativa.

La detección inmunohistoquímica de la proteína L1 de la capsida, en extendidos cervicovaginales, indica un estado inmune inducido por la infección por el VPH y puede ofrecer información pronóstica. Además la evaluación de p16, EGFR, y la COX-2 permite un enfoque integrador para la progresión de la lesión intraepitelial escamosa, asociado o no con la infección por VPH.

Referencias

1. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Inter J Cancer* 2006; 119: 5: 1095-101.
2. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995; 141(7): 680-9.
3. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, et al. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology: correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types. *Am J Clin Pathol* 1994; 102(2): 182-7.
4. Malinowski DP. Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease. *Bio Techniques* 2005; (Suppl.): 17-23.
5. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Disease Markers* 2007; 23(4): 315-30.
6. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Experimental Cell Research* 2000; 257(2): 231-7.
7. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3): 311-22.
8. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4a are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7): 884-91.
9. Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 1995; 375(6531): 506-10.
10. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366(6456): 704-7.
11. Khleif SN, Degregori J, Yee CL, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(9): 4350-4.
12. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153(6): 1741-8.
13. Labib K, Diffley JF. Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Current Opinion in Genetics and Development* 2001; 11(1): 64-70.
14. Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR. Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(27): 10236-41.
15. Freeman A, Morris LS, Mills AD, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 2121-32.
16. Gonzalez MA, Tachibana KEK, Laskey RA, Coleman N. Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5(2): 135-41.
17. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, et al. Over-expression of topoisomerase IIalpha is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high-risk human papillomavirus (HPV), but does not predict prognosis in cervical cancer or HPV clearance after cone treatment. *Inter J Gynecol Pathol* 2006; 25(4): 383-92.
18. Chen Y, Miller C, Mosher R, et al. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res* 2003; 63(8): 1927-35.
19. Rosty C, Sheffer M, Tsafirir D, et al. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* 24(47): 2005; 7094-104.
20. Santin AD, Zhan F, Bignotti E, 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(2): 269-91.
21. Sherman L, Alloul N, Golan I, Durst M, Baram A. Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Intern J Cancer* 1992; 50(3): 356-64.
22. Mcmurray HR, Nguyen D, TF Westbrook TF, Mcance DJ. Biology of human papillomaviruses. *International Journal of Experimental Pathology* 2001; 82(1): 15-33.
23. Griesser H, et al. HPV vaccine protein L1 predicts disease outcome of HPV high risk positive early squamous dysplastic lesions. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(6): 840-5.
24. Hilfrich R, Hariri J. Prognostic relevance of human papillomavirus L1 capsid protein detection within mild and moderate dysplastic lesions of the cervix uteri in combination with p16 biomarker. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2008; 30(2): 78-82.
25. Griesser H, Sander H, Hilfrich R, Moser B, Schenck U. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2004; 26(5): 241-5.
26. Rauber D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 2008; 140(2): 258-62.
27. Dunton CJ, Van Hoeven KH, Kovatich AJ, et al. Ki-67 antigen staining as an adjunct to identifying cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology* 1997; 64(3): 451-5.
28. Negri G, Bellisano G, Zannoni GF, et al. P16INK4a and HPV L1 immunohistochemistry is helpful for estimating the behavior of low-grade dysplastic lesions of the cervix uteri. *American Journal of Surgical Pathology* 2008; 32(11): 1715-20.
29. Follen M, Richards-Kortum R. Emerging technologies and cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(5): 363-5.
30. Kruse AJ, Baak JPA, Janssen EA, et al. Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *Journal of Pathology* 2003; 199(4): 462-70.
31. Kruse AJ, Baak JPA, Janssen EA, et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cellular Oncology* 2004; 26(1-2): 13-20.
32. Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Human Pathology* 2011; 42(7): 1007-12.
33. Hariri J, Hansen T. The prognostic value of BD ProEx C in CIN1 compared with p16 and HPV In Situ Hybridization. *Cytopathology* 2008; 19(Suppl. 1): 217.
34. Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, Pirog EC. p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2007; 131(9): 1343-9.
35. Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating high-grade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2005; 9(2): 100-7.
36. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study. *Journal of the American Medical Association* 2001; 285(11): 1500-5.
37. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, et al. Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *British Medical Journal* 1989; 298(6675): 707-10.
38. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, et al. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990; 16(4): 371-6.

39. Shi J, Liu H, Wilkerson M, et al. Evaluation of pp16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase II α , ProEx C, and p16INK4a/ProEx C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Human Pathology* 2007; 38(9): 1335-44.
40. Pinto AP, Schlecht NF, Woo TYC, Crum CP, Cibas ES. Biomarker (ProEx C, p16INK4A, and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Modern Pathology* 2008; 21(9): 1067-74.
41. Halloush RA, Akpolat I, Jim Zhai Q, Schwartz MR, Mody DR. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: a pilot study. *Cancer* 2008; 114(6): 474-80.
42. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, F. J. Orantes-Casado et al., «Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(3): 378-90.
43. Van Niekirk D, Guillaud M, Maticic J, et al. p16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing. *Gynecologic Oncology* 2007; 107(1 Suppl. 1): S233-S240.
44. Negri G, Bellisano G, Carico E, et al. Usefulness of p16INK4a, ProEx C, and Ki-67 for the diagnosis of glandular dysplasia and adenocarcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecological Pathology* 2011; 30(4): 407-13.
45. Aximu D, Azad A, Ni R, Colgan T, Nanji S. A pilot evaluation of a novel immunohistochemical assay for topoisomerase II-a and minichromosome maintenance protein 2 expression (ProEx C) in cervical adenocarcinoma in situ, adenocarcinoma, and benign glandular mimics. *International Journal of Gynecological Pathology* 2009; 28(2): 114-19.
46. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Ortiz-Reina S, et al. Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix. *J Clin Pathol* 2009; 62(2): 159-62.
47. Sanati S, Huettner P, Ylagan LR. Role of ProExC: a novel immunoperoxidase marker in the evaluation of dysplastic squamous and glandular lesions in cervical specimens. *International J Gynecol Pathol* 2010; 29(1): 79-87.
48. Guo M, Baruch AC, Silva EG, et al. Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Am Journal of Clinical Pathology*, vol. 135, no. 2, pp. 212-220, 2011. View at Publisher · View at Google Scholar · View at PubMed (72-3)
49. Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Archiv* 2004; 445(6): 616-20.

