



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Validación de la sobreexpresión de la proteína p16
mediante inmunohistoquímica en el diagnóstico
histológico de neoplasia intraepitelial de cérvix grado 2 y
en la predicción de su capacidad evolutiva.**

Doctorado en Pediatría, Obstetricia y Ginecología

TESIS DOCTORAL

Ana Forteza Valadés

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y Medicina Preventiva

Directores: Dr. J. Cortés Bordoy y Dra. C. Vanrell Barbat

Tutor: Dr. J. Calaf Alsina

*A mis padres, Andrés y Tita, a mis hijos, Ana, Aleix y Andrés
y a ti, Pep Quico, compañero de vida.*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda de muchísimas personas,

En primer lugar me gustaría mostrar mi gratitud a mis directores de tesis:

Al **Dr. Javier Cortés**, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas, por hacerme de guía profesional tanto en la práctica diaria como en la vida académica, por contestar mis correos hasta en domingo, por creer en mis posibilidades más que yo misma desde el primer minuto, empezando por regalarme mi primer “fonendo” o mi primer microscopio, por templar mi ánimo en los momentos bajos y siempre.

A la **Dra. Cristina Vanrell**, por querer involucrarse desde el principio, por tener siempre un mensaje de ánimo, y estar al día de todo acompañándome en el camino.

Al **Dr. Joaquín Calaf**, por verlo todo fácil siempre, verlo todo posible y darme soluciones a los problemas.

Al **Dr. Joan Soriano**, por pasarse horas y horas y más horas analizando tablas y dándole un sentido a todos y cada uno de los números que yo le presentaba. Por tener siempre un hueco para mí en su apretada agenda.

Después, a todos mis compañeros de trabajo que han participado de una manera más o menos activa en el desarrollo de este trabajo, haciéndolo posible.

Al **Dr. Enrique Serra**, mi jefe, tanto por participar activamente en el trabajo, interpretando más de 400 laminillas, como por tener siempre un gran sí como respuesta a cualquiera de mis peticiones, incluso antes de escuchar la pregunta, aunque eso supusiera tener que hacer mi trabajo.

A **Biel y Pep Joan**, por querer colaborar con mi trabajo sin dudar, desde el primer minuto, y ayudarme con sus conocimientos en patología ginecológica.

A **todos mis compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Son Espases**: a **Karel** y a **Bel**, por tener que asumir parte de mi trabajo; a

Paula por soportar mi estrés con una sonrisa; a **Héctor** por el soporte informático, y a todos los demás, a **Ester, Carlos, Cristina y Rafa** por acompañarme y aceptar mis limitaciones horarias y de disponibilidad.

A **Ana** y a **Nuria**, por hacer todo el trabajo de laboratorio, sin demora y con una profesionalidad excepcional.

A **Maria**, responsable de la edición final de este texto.

A **Mariela**, por prestarme sus grandes conocimientos informáticos, en el difícil momento de arrancar, y seguir disponible hasta el final.

A **Roche Diagnostics**, a **Gemma** y a **Lluís**, por colaborar con la investigación y por apoyarme desde el primer momento.

A **mis padres, Tita y Andrés**, por creer en mí y alentarme a seguir con mis ilusiones cuando a mí me parecía imposible: ellos no han dejado que me rindiera.

A mi **hermano Andrés**, por su cariño, su paciencia y su apoyo, siempre.

A **mis amigas, Carmen, Victoria, Silvia, Rosa, Tonina y Sandra**, porque su compañía me ha dado alas y buen humor.

A **mis hijos, Ana, Aleix y Andrés** por darme parte de un tiempo que es suyo sin quejarse ni una sola vez. Esta Tesis Doctoral es de ellos y para ellos.

Y por último a **Pep Quico, compañero de vida**, por todo, porque si él no estuviera conmigo nada de esto tendría sentido.

Mi más sincero agradecimiento a todos.

ÍNDICE

1. Introducción.
 - 1.1. El VPH como agente causal del cáncer de cérvix.
 - 1.2. El cáncer de cérvix: incidencia y mortalidad. Registros españoles.
 - 1.3. Las lesiones preneoplásicas de cérvix.
 - 1.3.1. Estimación de su incidencia.
 - 1.3.2. Clasificación: nuevas propuestas.
 - 1.3.3. Los problemas para su diagnóstico. Papel de los biomarcadores.
2. Hipótesis de trabajo.
3. Objetivos principales.
4. Objetivos derivados.
5. Material.
 - 5.1. Grupo estudio.
 - 5.2. Criterios de inclusión.
 - 5.3. Criterios de exclusión.
6. Método.
7. Resultados.
 - 7.1. Características sociodemográficas.
 - 7.1.1. Edad.
 - 7.1.2. Tabaquismo.
 - 7.1.3. Anticoncepción.
 - 7.1.4. Estado inmunitario.
 - 7.2. Diagnóstico de las biopsias.
 - 7.3. Recodificación de los diagnósticos.
 - 7.4. Estudio de las conizaciones posteriores a las biopsias.
 - 7.5. Análisis de p16.
 - 7.6. Conizaciones estratificadas en función del valor de p16.

8. Análisis crítico de los resultados.

8.1. Características sociodemográficas.

8.1.1. Edad.

8.1.2. Tabaquismo.

8.1.3. Anticoncepción.

8.1.4. Estado Inmunitario.

8.2. Diagnóstico de las biopsias.

8.2.1. Estudio de las biopsias con Hematoxilina-Eosina.

8.2.2. Interpretación de p16.

8.2.3. Estudio de las biopsias con Hematoxilina-Eosina junto con su p16.

8.3. Análisis de las conizaciones.

9. Discusión.

10. Conclusiones.

11. Bibliografía.

12. Anexos.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. El Virus del Papiloma Humano (VPH) como agente causal del cáncer de cérvix.

En 1977, un grupo de la Universidad de Freiburg liderado por Harald Zur Hausen identificó al virus del papiloma humano (VPH)¹ asociándolo potencialmente con la génesis del cáncer de cérvix, hallazgo que le reportó el Premio Nobel de Medicina en 2008. Llama la atención el lapso de tiempo entre los dos acontecimientos. La razón hay que buscarla en que no fue hasta 1999 cuando su hipótesis etiológica se vio confirmada por las conclusiones de un trabajo de un cualificado grupo multidisciplinar e internacional, que afirmaban de forma contundente y basándose en evidencia epidemiológica de alta calidad, que el VPH era causa necesaria del cáncer de cérvix: no debe esperarse que una mujer VPH negativa desarrolle un cáncer de cérvix.²

Identificar una causa infecciosa como imprescindible para el desarrollo de un cáncer ofrecía de forma muy novedosa la posibilidad de estudiar en profundidad su historia natural y abría la puerta a la prevención primaria – vacunación – y a rediseñar la prevención secundaria, más allá del uso de la citología cérvico-vaginal, utilizada con cierto éxito desde su descripción por Papanicolaou. Fue en los años cuarenta, tras años de investigación, cuando Papanicolaou publicó en la Revista Americana de Ginecología y Obstetricia su artículo sobre la citología exfoliativa vaginal, en el que demostraba que era un método sencillo y barato, que se podía utilizar masivamente y podía detectar el cáncer de cuello uterino en su fase más precoz³. Vacunación frente al VPH y programas de cribado rediseñados ocupan hoy día un lugar preferente en la prevención integral del cáncer de cérvix.⁴

Los papilomavirus (PV) son pequeños virus ADN de la familia Papovaviridae. La clasificación de los tipos de PV se basa en la especie de origen y en el grado de homología del ADN.⁵

En humanos se han secuenciado más de cien tipos diferentes⁶ con variantes para cada tipo que tienen importantes influencias en su poder oncogénico.⁷

El genoma del VPH está formado por una doble cadena de ADN de entre 6.800 y 8.000 pares de bases (pb)⁸ dividida en 8 regiones de lectura abierta (del inglés: Open Reading Frame ORF), y la región larga de control (del inglés: Large Control Region LCR). Las ORF se dividen en E (Early) y L (Late) de acuerdo a su expresión temprana (E) o tardía (L) durante la diferenciación del epitelio.

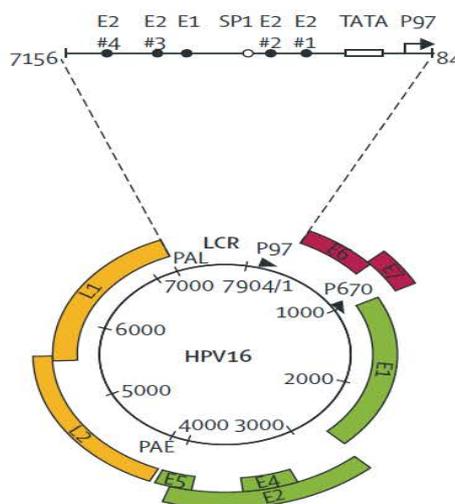
Hay identificados **seis genes de expresión temprana**, importantes en la fisiología viral: E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7. E4 se expresa durante todo el proceso de diferenciación. Estos seis genes codifican proteínas implicadas en la regulación y replicación viral.

- E1 y E2: activadoras de la transcripción.
- E4: maduración y replicación.
- E5: estimula la proliferación.
- E6 y E7: oncoproteínas transformantes.

Hay **dos genes de expresión tardía**, L1 y L2, que se expresan durante las fases finales, generando las proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje de la cubierta viral.⁶ Estas proteínas sintetizadas por L1 y L2 son necesarias para la formación de viriones y conservan similitudes en los diferentes VPH, lo que no sucede con los genes de expresión temprana.

En la figura 1 puede consultarse una representación gráfica del genoma del VPH 16.⁹

Figura 1: Genoma del VPH 16.



Clasificación de los VPH

La clasificación de los VPH más útil clínicamente es la basada en la malignidad de las lesiones que provoca:

- Virus de Bajo Riesgo (VPH-BR) que originan las lesiones condilomatosas: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81.
- Virus de Alto Riesgo (VPH-AR) que originan las lesiones precancerosas y cancerosas: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82.⁵

Esta es la clasificación clásica, siempre se ha hecho un énfasis especial en los genotipos 16 y 18 ya que causan el 70% de los cánceres de cérvix ⁶ aunque esta clasificación se está revisando. Está empezando a emerger una nueva evidencia de que los tipos 31 y especialmente el 33, tienen un riesgo más alto que otros, y que los genotipos 39, 56, 59, 66 y 68 tienen un riesgo menor y podrían considerarse de riesgo intermedio. También se apuntan cambios a los genotipos 18 y 45, que aunque se ha visto que no tienen un alto valor predictivo positivo (VPP) para CIN2+, se relacionan con mayor presencia de cáncer invasivo en el canal endocervical, y merecerían un manejo diferente, justificando repeticiones de test de VPH para detectar su persistencia.¹⁰

Se propuso una nueva clasificación de los genotipos de alto riesgo que quedaría así:

Grupo A: Muy alto riesgo: 16, 31 y 33

Grupo B: Alto riesgo: 18, 52, 35 y 58

Grupo C: Riesgo intermedio: 45, 39, 66, 51, 68, 56 y 59.

La presentación conjunta de 18 y 45 podría incrementar el riesgo.

Patogénesis del VPH

A diferencia de otros virus, los VPH para infectar necesitan la disponibilidad de las células de la capa basal de los epitelios o mucosas, para así poder integrarse en su genoma y, aprovechando la capacidad de proliferación de estas células, poder

completar su ciclo vital. Para que el virus alcance estas células de capas basales, necesariamente debe haber una microlesión en la piel o mucosa de superficie.

Un concepto importante es que la presencia del virus no implica infección. Para hablar de infección debe haber una integración del virus en el ADN celular.

La mayoría de las lesiones en el cérvix se desarrollan en su zona de unión escamo-columnar: allí confluyen dos tipos diferentes de epitelio, escamoso exocervical y el glandular endocervical. Este choque epitelial genera una zona especialmente inestable y con más tendencia a microlesionarse¹¹, por lo que se convierte en un área especialmente apta para la colonización viral y la posterior infección real, paso que implica la activación de las ORF E6 y E7. Su expresión debe ser considerada parte básica y fundamental de la acción oncogénica del VPH.

Las infecciones por VPH se clasifican como:

- **Agudas o auto limitadas:** representan el 90% de las infecciones VPH. El virus se aclara a los 6 – 18 meses de ser detectado.
- **Persistentes:** el 10 – 15% de las infecciones persisten. Para calificarlas como tales es necesario que un mismo tipo de VPH sea detectado en dos o más ocasiones con intervalos de 6 meses.

En la figura 2 puede consultarse el porcentaje de aclaramiento, persistencia y progresión de las infecciones por VPH-AR⁹

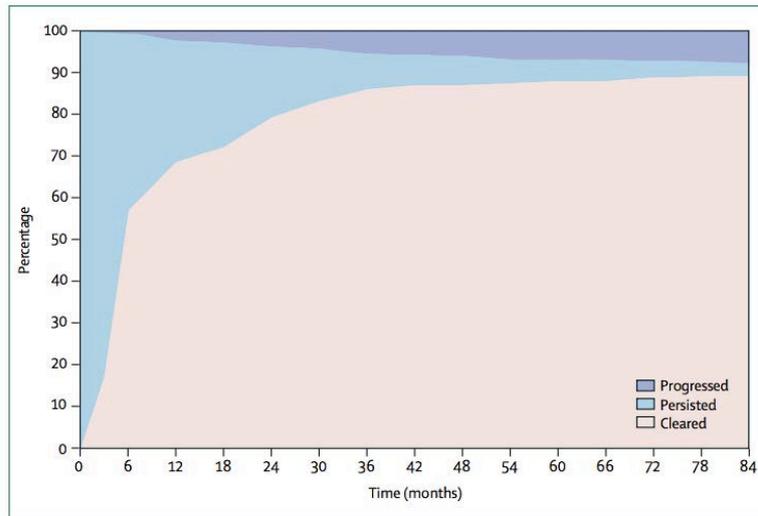


Figura 2: Porcentaje de aclaramiento, persistencia y progresión.

Conceptualmente se diferencian tres fases en la evolución de la infección por VPH: ¹¹

- Fase latente
- Fase transitoria o productiva
- Fase transformante

La **fase latente** es aquella en la que el virus está presente pero se expresa a muy bajos niveles, suficientes para mantener el genoma, pero tan bajos que son indetectables.

La **fase transitoria o productiva** se caracteriza por tener baja expresión de E6 y E7 en las células basales y parabasales que han sido infectadas. En situaciones normales, libres de infección por VPH, las células basales van madurando y ascendiendo hacia estratos en el epitelio, perdiendo progresivamente su capacidad de proliferar (diferenciación). Si las células basales han incorporado ADN del VPH en su genoma pierden su capacidad para salir del ciclo celular y dejar de proliferar: los genes del VPH se expresan en tasas elevadas en el núcleo de estas células infectadas. Si éstas alcanzan las capas superficiales, el virus cambia su patrón de expresión a los genes tardíos L1, L2 y E4, no expresados en situación basal. Los productos de estos genes tardíos permiten el empaquetamiento del genoma viral replicado. Las nuevas partículas virales producidas son liberadas por los queratinocitos que se desintegran en la superficie del epitelio infectado.¹¹

La **fase transformante** está caracterizada por la marcada sobreexpresión de E6 y E7 en la capa basal y parabasal del epitelio. E6 y E7 son los oncogenes que juegan un papel más importante en la transformación maligna de la infección. De forma independiente los dos han demostrado capacidad para inmortalizar células de diferentes tejidos humanos, pero juntos aumentan su eficacia.¹¹

En la década de los 70 se empezó a estudiar el papel de p53 en la relación de los virus y el cáncer. P53 es un gen supresor tumoral que juega un papel crucial en el cáncer. En el 55% de los cánceres humanos se describe una mutación de p53. La proteína sintetizada por p53 es un regulador de la transcripción, detectando errores en el genoma de las células, facilitando la reparación del ADN, o enviando a la célula dañada a abandonar el ciclo celular, mediante la apoptosis, si la reparación no es posible. E6 interacciona con p53, inactivándola, haciendo que no sea capaz de detectar errores en el ADN de la célula dañada y no sea capaz de enviarla a la muerte celular programada (apoptosis).¹²

La proteína del retinoblastoma (pRB) es una proteína supresora de tumores que se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer. En las células normales, la actividad de pRB se regula por un mecanismo de fosforilación / desfosforilación. Durante la fase del ciclo celular G1 la forma desfosforilada de pRB inhibe el paso a fase S, formando un complejo con el factor de transcripción E2F. Si pRB se fosforila, libera E2F activando el ciclo celular con el paso de G1 a S.¹³

E7 interactúa con pRb y lo inactiva. Esto hace que se libere el factor de transcripción E2F, lo que provoca que la célula prolifere sin control. E7 interactúa también con INK4A (p16)¹¹

Esta secuencia de hechos en los primeros pasos de la oncogénesis del cáncer de cérvix es la que está en este momento unánimemente aceptada y puede ser consultada en las figuras 3 y 4.

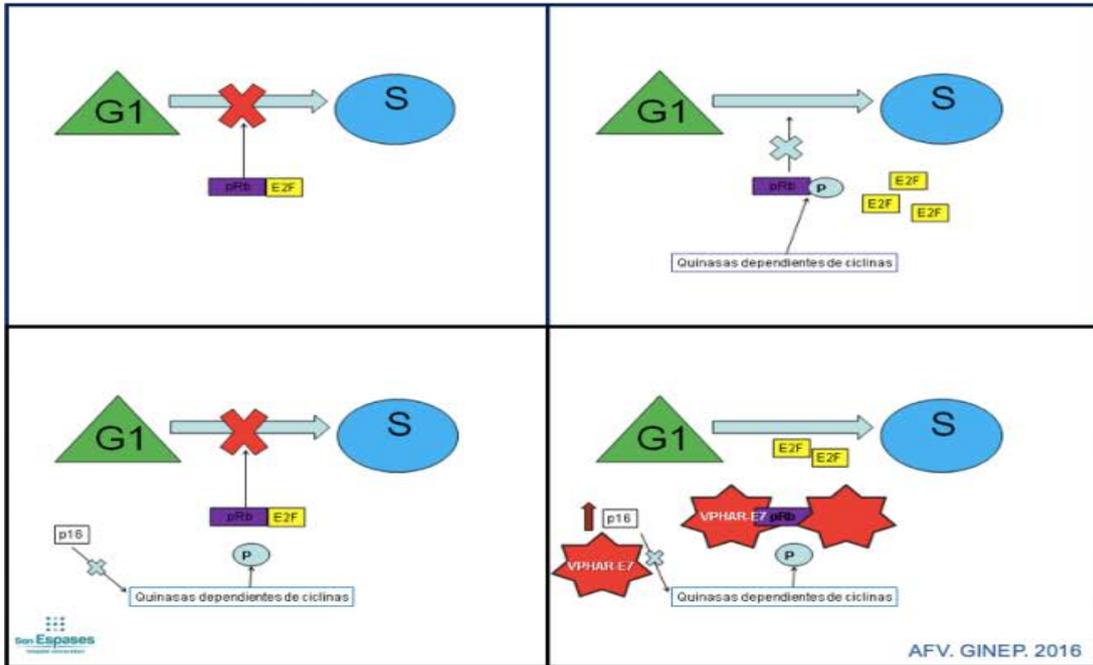


Figura 3: Esquema de actuación de E7

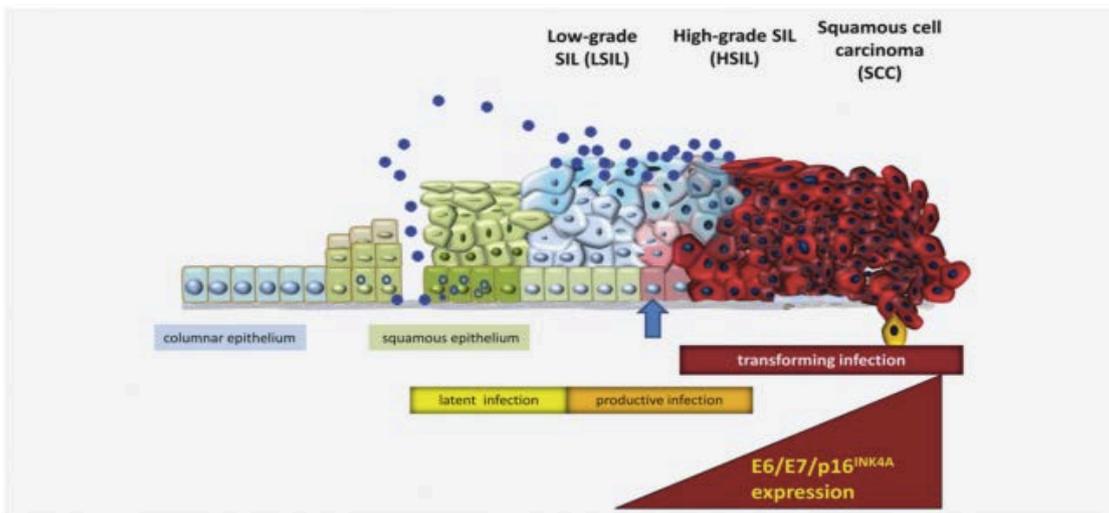


Figura 4: Representación esquemática de las fases de la infección VPH ¹¹

Publicaciones recientes, han subrayado la importancia de la infección latente.

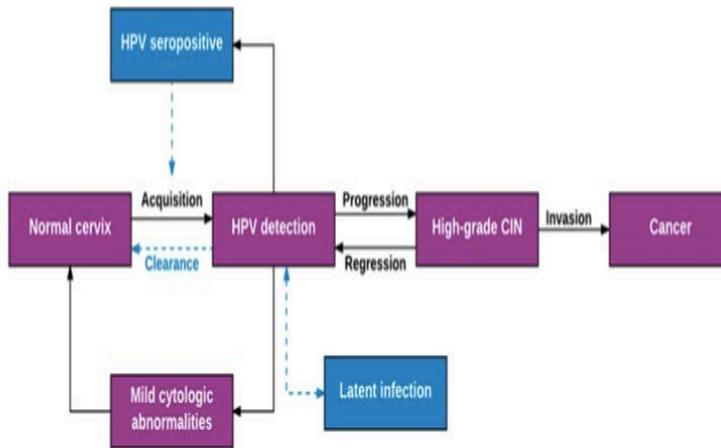


Figura 5: Esquema de la historia natural de la infección VPH. Tomado de Gravit.¹⁴

Se intenta aclarar un concepto que puede tener gran trascendencia clínica: explicar si una nueva detección de VPH significa reinfección o reactivación de una infección antigua. Una determinación negativa de VPH, ¿significa aclaramiento del virus o puede relacionarse con una infección latente indetectable?.

Se ha sugerido que la “redetección” del mismo tipo de VPH en mujeres que han sido negativas durante un tiempo (aclaramiento) es relativamente frecuente, un 10-20% de los casos.¹⁴

Mientras que la proporción de nuevas detecciones atribuibles a una infección previa que ha permanecido latente permanece constante con la edad, la proporción de positividad atribuibles a nuevas infecciones es más alta en mujeres de entre 30-39 años (48%) que en las mujeres de 40-50 años (21%). Con la edad disminuye la proporción de infecciones nuevas, muy probablemente relacionado con cambios en los patrones de relaciones sexuales.¹⁴

La importancia de tener presente este escenario de reactivación radica en la necesidad de saber si hay una variación en el riesgo de desarrollar cáncer, en función de si se trata de una nueva infección o de una infección latente reactivada. Este es un asunto

crucial para el diseño de los programas de vacunación y cribado. En este sentido, una publicación reciente¹⁵ muestra que el riesgo para CIN3+ es más alto en aquellas mujeres con resultados negativos de VPH intermitentes en el cribado, si se compara con el riesgo de aquellas mujeres que han sido siempre negativas.

Sabemos que el paso de infección productiva a transformante sólo tendrá lugar en un porcentaje bajo de mujeres, ya que el VPH-AR es necesario pero no suficiente: para causar cáncer de cérvix es precisa la interacción de otros factores, que junto con el VPH de presencia necesaria, modularán el riesgo de transición de simple presencia del virus a infección verdadera con riesgo alto de desarrollar lesión premaligna o maligna.

Se han identificado algunos de estos **cofactores**:

Paridad:

La alta paridad se relaciona con un mayor riesgo y el riesgo aumenta más con el número de gestaciones. Las mujeres con más de siete gestaciones tienen cuatro veces más riesgo que las nulíparas. Los cambios hormonales producidos por el embarazo modulan la respuesta inmune al VPH y su riesgo de persistencia o progresión.^{16,17}

Uso de anticonceptivos hormonales:

Que el uso de anticonceptivos aumente el riesgo de precáncer y cáncer no ha sido establecido de forma concluyente, aunque la mayoría apuntan a que su uso prolongado por más de 5 años aumenta el riesgo hasta cuatro veces de desarrollar lesión en aquellas mujeres portadoras de VPH.^{16,17}

Tabaquismo:

El tabaquismo se asocia de forma consistente con el riesgo de presentar cáncer de cérvix. El riesgo se multiplica por tres en fumadoras habituales. Se han encontrado nicotina y otros carcinógenos específicos del tabaco en el moco cervical.^{16,17}

Infecciones de transmisión sexual concomitantes:

La infección conjunta VPH con Virus Herpes-2 (VHS2) o *Chlamydia trachomatis* aumenta el riesgo de invasión.

Las mujeres positivas al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tienen riesgo aumentado de desarrollar enfermedad premaligna y maligna, riesgo que aumenta cuanto más bajo sea el conteo de linfocitos T CD4. Este incremento del riesgo está asociado a la inmunosupresión y a la positividad conjunta para VIH y VPH. ^{16,17}

Edad de inicio de las relaciones sexuales y número de parejas sexuales:

La edad cada vez más temprana de inicio de las relaciones sexuales, y número creciente de parejas, incrementan la prevalencia del VPH y la incidencia del cáncer de cérvix. ^{16,17}

1.2 El cáncer de cérvix: incidencia y mortalidad. Registros españoles.

Con una estimación de 527.624 casos nuevos y 265.672 muertes en el año 2012, el cáncer de cérvix es el cuarto cáncer más frecuente en las mujeres en el mundo, tras el de mama, el colo-rectal y el de pulmón. El 90% de los casos de muerte por cáncer de cérvix se dan en países en vías de desarrollo.¹⁸ Estas cifras han ido evolucionando con el paso de los años: a principios de los años 90 el cáncer de cérvix era el segundo cáncer más frecuente en mujeres en el mundo y la tercera causa a principios de los 2000. Esta evolución está condicionada por la implantación de los programas de cribado.¹⁹

A finales de la década de los 60 ya se hacían citologías de cribado en Estados Unidos y en los países nórdicos. En Inglaterra el cribado empezó en 1964, pero durante los primeros veinte años no se consiguieron tasas reseñables de cobertura: la estructura era oportunista, se controlaba únicamente a la mujer que consultaba al sistema sanitario, público y privado, un sistema claramente ineficaz e ineficiente, dato corroborado en las últimas informaciones.²⁰

Fue durante los años 80 cuando ya se empezaron a hacer recomendaciones para hacer un cribado organizado, de cobertura poblacional controlada. El sistema nacional de llamada-rellamada (programa poblacional) se estableció en el año 1988 en Inglaterra con el consiguiente y esperado impacto en cobertura e incidencia de cáncer invasor que se objetiva en la figura 6 tomada del artículo de Quinn.¹⁹

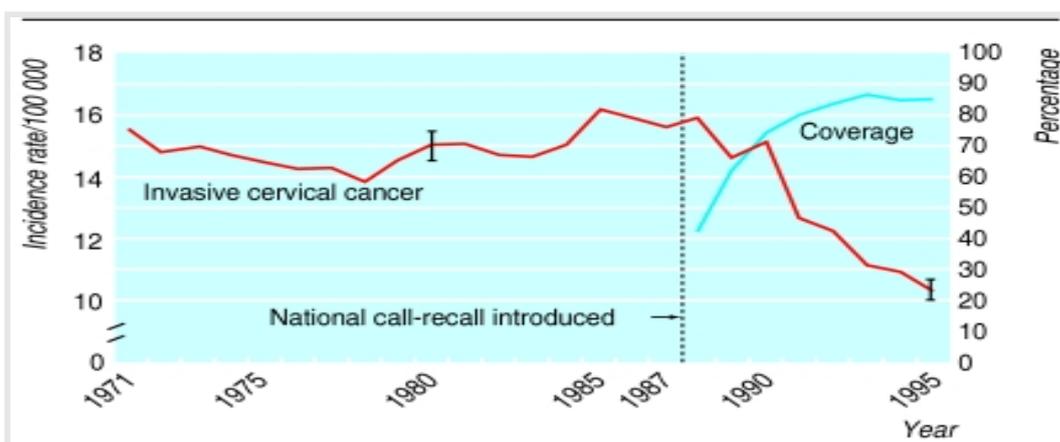


Figura 6: Impacto de la influencia de la implantación de los programas poblacionales de cribado en la incidencia del cáncer de cérvix.

Desde que se conoce que el VPH es el agente causal del cáncer de cérvix y la historia natural de la enfermedad, se ha recomendado la determinación por técnica validada del ADN del VPH como técnica inicial de cribado en sustitución de la citología, que se mantiene como alternativa aceptable. Para tomar esta decisión la publicación de los resultados de cuatro grandes ensayos europeos fue decisiva.²¹

El cáncer de cérvix es una enfermedad que cumple con todos los requisitos para resultar idónea para ser susceptible de cribado. Estos requisitos son los siguientes:²²

- **Tiene que ser un problema de salud importante para la comunidad.**

Cada año se diagnostican alrededor de 500.000 nuevos casos de cáncer de cérvix, cifra que ha ido disminuyendo progresivamente. A principios de los años 80 era la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres.

Calcular la incidencia de las lesiones preneoplásicas es más complicado, porque son lesiones asintomáticas y se detectan sólo con el cribado, sin registros poblacionales que las recojan, pero su estimada incidencia es muy alta, como se detallará más adelante, con unas cifras que muestran una enfermedad con entidad suficiente para ser considerada un problema de salud pública y la enorme importancia de acceder a su diagnóstico con buenas estructuras de cribado para evitar un aumento severo de la incidencia del cáncer de cérvix.

- **Enfermedad bien definida y con historia natural conocida.**

Desde finales de la década de los 70, quedó establecida la relación causal entre VPH y cáncer de cérvix. El VPH es un virus que se transmite por contacto sexual a través de erosiones mínimas. Su prevalencia es muy elevada en varones y mujeres jóvenes sexualmente activos, y evoluciona de forma natural al aclaramiento en el 90% de los casos. La duración media de la infección por el VPH varía entre diferentes series de 6-12 meses a 2 años, siendo mayor en la infección por virus VPH-AR que VPH-BR. Numerosos estudios han evidenciado que la presencia de VPH-AR es imprescindible para el desarrollo de lesiones de

alto grado. El 25% de las mujeres con infecciones transitorias muestra cambios citopáticos propios de lesiones de bajo grado. Las lesiones de bajo grado remiten espontáneamente en el 80% de los casos y progresan a lesiones de alto grado el 10% y a invasión el 1%. El aclaramiento de la enfermedad ocurre dentro de los primeros 40 meses.²³

- **Enfermedad con periodo de latencia detectable.**

El proceso previo al cáncer invasivo, que es lo que se pretende evitar, es detectable. Mediante procesos diagnósticos que suman citopatología y biología molecular detectaremos lesiones preneoplásicas, controlables y /o curables con procedimientos clínicos sencillos.²⁴

- **Existencia de una prueba de cribado validada, simple (aceptada por quien la recibe y por quien la practica), segura, fiable (específica y sensible) y eficiente.**

La citología es la técnica de cribado validada para el cribado del cáncer de cérvix, empleada durante más de 50 años. Su eficacia y eficiencia han sido ampliamente corroboradas. Con ella se ha conseguido reducir en un 75% la tasa de cáncer cervical.

Como ya se ha anotado previamente, la determinación de VPH-AR es más eficaz que la citología en el cribado primario en mujeres mayores de 30 años. En mujeres menores de 30 años, donde la infección transitoria es muy alta, seguiremos utilizando la citología, más específica y con un valor predictivo positivo mejor.

La determinación del VPH debe practicarse con una técnica validada.

- **Disponer de un tratamiento sencillo, seguro y eficaz de la enfermedad en su fase precursora o inicial.**

La relación entre las lesiones preneoplásicas y el cáncer invasor está bien definida, la media de edad de las pacientes con carcinoma in situ es entre 10 y

15 años inferior a la media de edad de las pacientes con cáncer invasor, según la serie. La edad media de las pacientes con CIN ronda los 34 años, siendo de 48 para cáncer invasor. Estos resultados apoyan el concepto de que la progresión entre las lesiones precursoras y el cáncer invasor es de 10 años. Después de una citología patológica, se realiza una colposcopia con toma de biopsias, en las que se realiza el diagnóstico definitivo de la lesión, se define el grado y se confirma la ausencia de invasión. Para tratar estas lesiones preneoplásicas se utilizan diferentes técnicas, escisión con asa diatérmica (LEEP), conización, ablación mediante láser o crioterapia. Estas técnicas han demostrado tener un índice de complicaciones situado entre el 2 y el 4%. Las complicaciones más comunes son la hemorragia, la estenosis cervical y la infertilidad.^{25,26}

Para poder conseguir la disminución de la incidencia y la mortalidad de una enfermedad con un programa de cribado, se necesita alcanzar buenas tasas de cobertura, idealmente por encima del 70%²⁷, alcanzables con un programa de cribado poblacional, no con un cribado oportunista.

Registros españoles.

La incidencia y mortalidad por el cáncer de cérvix en España son de las más bajas del mundo, siendo similares a las presentadas en Estados Unidos, Canadá o Finlandia.²⁷

La incidencia de cáncer de cérvix estimada en España es de 2511 casos (de mama se estiman 25215 casos) con una tasa estandarizada por edad de 7,8 por 100.000 mujeres. La mortalidad para el cáncer de cérvix estimada es de 848 casos con una tasa ajustada por edad de 2,1 por 100.000 mujeres.¹⁸

España está dividida en 17 comunidades autónomas, cada una con su política de salud pública. Cada región se va adaptando progresivamente a las recomendaciones de cribado de las sociedades científicas. De forma general, se aplica un cribado oportunista con la citología como prueba de cribado, alcanzando unos rangos de cobertura que oscilan entre un 50 y un 69%.

La Guía Española liderada por la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC) y auspiciada por 8 Sociedades Científicas, ya citada²², publicada en 2014, recomienda el test de VPH como técnica de cribado primario a partir de los 30 años (mantiene la citología de 25 a 30) con una determinación cada 5 años en caso de tener resultado negativo.

Estas nuevas recomendaciones se van aplicando de manera paulatina en las diferentes comunidades autónomas.

1. 3. Lesiones pre neoplásicas de cérvix

1.3.1 Estimación de su incidencia

No hay registros poblacionales de lesiones de alto grado de cérvix. La estimación de su incidencia se realiza a través de la tasa de resultados citológicos anómalos anotados en los programas de cribado, programas que históricamente han reflejado un potente incremento de su diagnóstico en las mujeres cribadas (Figura 7)

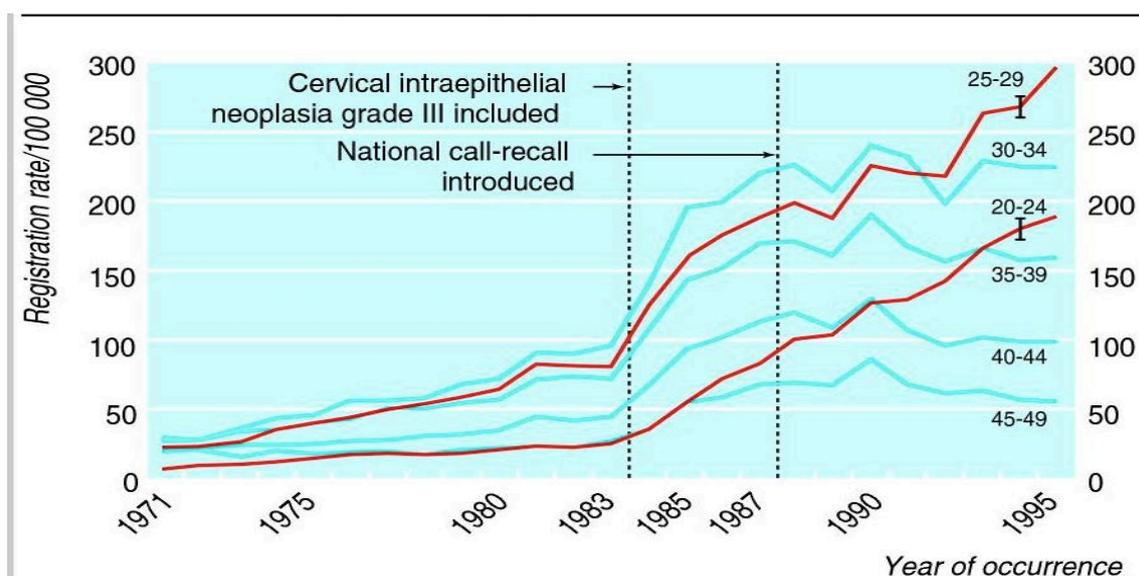


Figura 7: Tomada de Quinn y colaboradores.¹⁹

La Guía Española para la prevención del cáncer de cuello uterino, ya referenciada²² hace las siguientes estimaciones:

“Se estima que de la totalidad de mujeres sexualmente activas en España, 1.938.996, presentan una infección detectable por VPH (1.433.389 entre 25-65 años) y 438.358 una citología anormal (336.441 entre 25-65 años). Pero si se tienen en cuenta las coberturas estimadas del cribado, sólo se detectaría una citología anormal a 287.067 mujeres en un periodo de 3 años. Resultado de este cribado oportunista se detectarían 6139 casos de CIN3 al año.”

Las estimaciones globales publicadas se muestran en la figura 8.

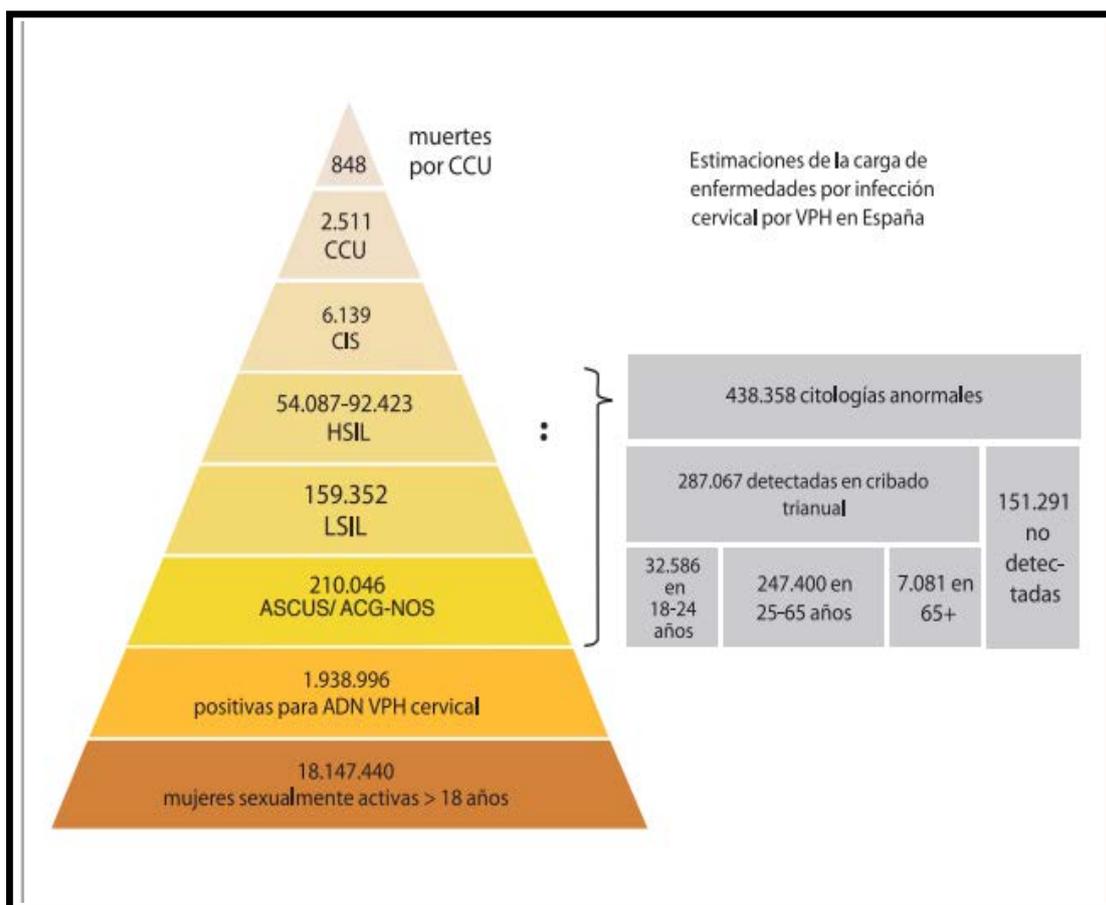


Figura 8: Estimación de la incidencia de las lesiones preneoplásicas de cérvix. Guía de la AEPC. ²²

Otro dato importante a tener en cuenta es que el tiempo evolutivo de lesión preneoplásica a cáncer invasor es de unos 10 años, y la media de edad de diagnóstico de las neoplasias intraepiteliales es de 34 años, frente a los 48 años de media en el diagnóstico de cáncer invasor, datos publicados históricamente que no han sido modificados. ²⁹

1.3.2. Clasificación: nuevas propuestas.

Fue en 1969 cuando Govan ³⁰ describió las características histológicas de diferentes anormalidades del epitelio escamoso cervical, separando estos cambios en dos grandes grupos, los que se consideraban cambios banales (hiperplasia de células basales, hiperplasia de células de reserva, metaplasia escamosa inmadura, metaplasia escamosa madura) y los que se consideraban entidades previas al cáncer invasor, entidades con potencial capacidad de progresión. Estos cambios lo dividía en displasia y carcinoma in situ. La displasia podía ser leve, moderada o severa. La gradación de la displasia dependía de la atipia celular y del espesor del epitelio afectado.

A principios de los años 80 ya se empezaron a publicar numerosos estudios que ponían de manifiesto la falta de concordancia entre patólogos a la hora de clasificar las lesiones siguiendo este sistema, que además consideraba como dos entidades diferentes la displasia severa y el carcinoma in situ, sin definir de una manera fácilmente entendible y reproducible las características de cada una de estas dos entidades.

En este ambiente de confusión se hizo necesario crear una nueva clasificación, y así es como nace en los 80 la clasificación: Neoplasia Cervical Intraepitelial (CIN).³¹ Usando una terminología ya propuesta por Ralph Richart en 1973.³² Esta clasificación se centra en describir las lesiones consideradas preneoplásicas, sin mencionar otro tipo de modificaciones epiteliales.

Esta clasificación contempla y define tres categorías:

CIN 1: las células que muestran alteraciones están situadas en el tercio inferior del epitelio. En el tercio superior vemos los coilocitos (efecto citopático del virus en la infección productiva)(flechas). (Fig. 8)

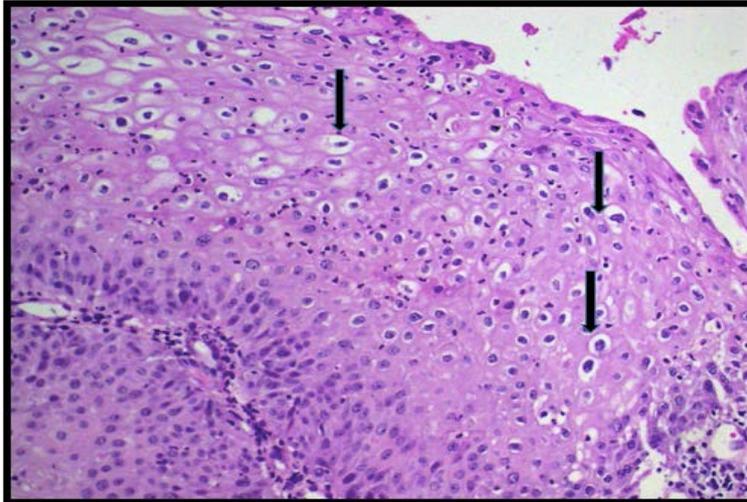


Figura 8: CIN 1 (HE 20x)*

CIN 2: las características citológicas son similares a las descritas para CIN 1 pero las células afectadas se sitúan por encima del tercio inferior, pero sin superar los dos tercios. (Figuras. 9 y 10)

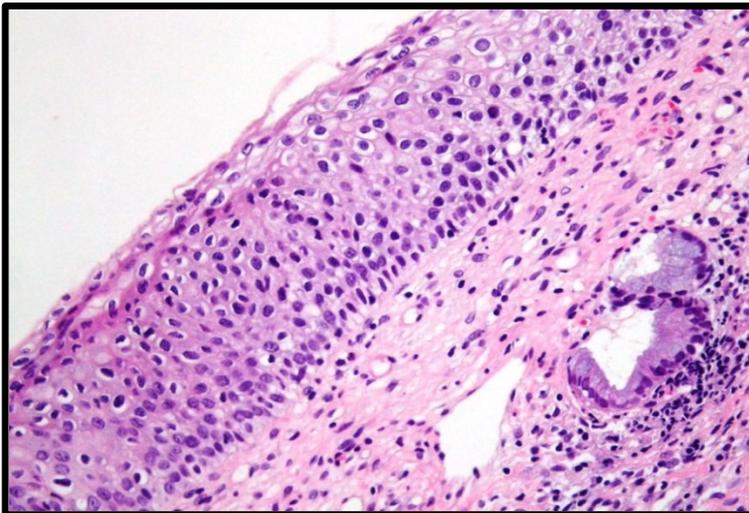


Figura 9: CIN 2 (HE 20x)*

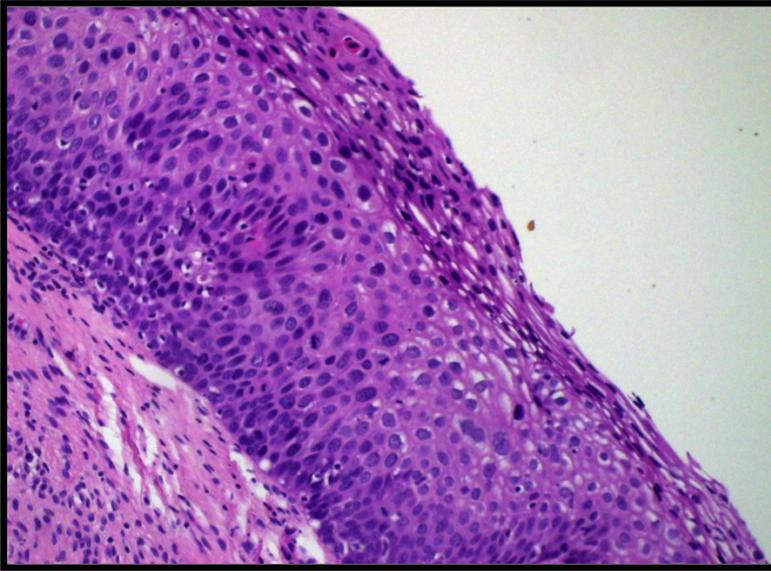


Figura 10: CIN 2 (HE 20x)*

CIN 3 / Carcinoma in situ: en este caso el pleomorfismo suele ser mayor y los cambios afectan a todo el espesor del epitelio. En esta imagen identificamos figuras de mitosis (flecha) (figura 11)

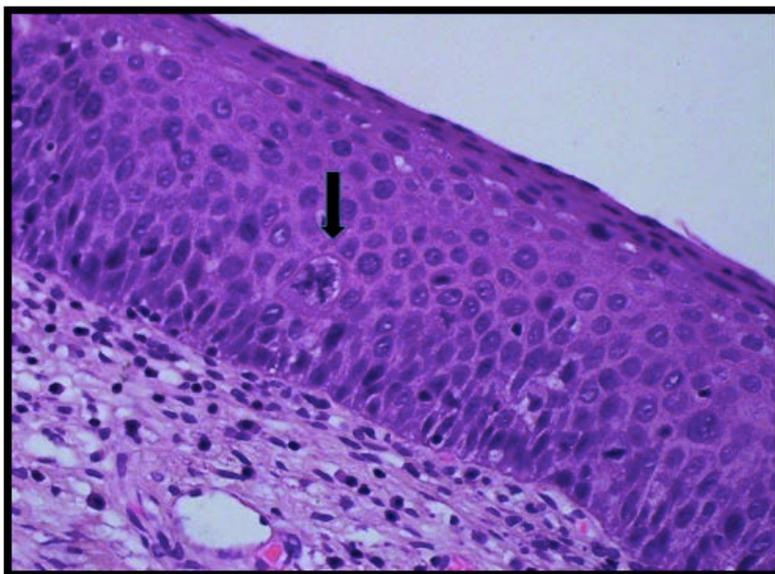


Figura 11: CIN 3 (HE 20x)*

*Imágenes posteriormente sometidas a tratamiento digital.

CIN3 y carcinoma in situ se consideraron similares y se englobaron en una misma entidad.

Esta clasificación en tres categorías es la que se sigue utilizando en diferentes ámbitos en el momento actual, a pesar de que desde el principio ya se vio que las concordancias tanto inter como intraobservador eran muy bajas. Se utilizaba esta clasificación tanto en los diagnósticos citológicos como en los histológicos. Al respecto, a principios de los 90 aparecen estudios publicando datos sobre la baja concordancia entre patólogos a la hora de realizar los diferentes diagnósticos, publicando datos de índice de concordancia (kappa) interobservador para CIN 1 y CIN 2 de 0,329 y 0,457 y de 0,749 y 0,952 para CIN3 y carcinoma invasor, e intraobservador de 0,122, 0,193, 0,574 y 0,797 para CIN1, CIN2, CIN3 y cáncer invasor respectivamente.³³ Son datos realmente bajos especialmente para CIN1/2.

En este ambiente de discrepancias, en el año 1988, un pequeño grupo de citólogos, patólogos y clínicos, entre otros, se reunieron en Bethesda, Maryland, USA, con el objetivo de acordar un sistema de informe de los extendidos citológicos obtenidos de cérvix que intentara aclarar la situación y, además, pudiera dar información relevante al ginecólogo que pudiera orientar su conducta clínica.

El resultado del primer encuentro fue el Sistema Bethesda 1988, publicado en 1990³⁴

Esta nueva terminología pretendía respetar tres conceptos fundamentales:

- La terminología empleada debe comunicar información de relevancia clínica.
- La terminología debe ser uniforme y reproducible.
- La terminología debe reflejar los conocimientos más actuales.

Al principio la nueva clasificación fue recibida con escepticismo ya que eliminaba la categoría diagnóstica CIN2 o displasia moderada, para utilizar una clasificación binaria: lesiones de alto o bajo grado (HSIL-LSIL). Este sistema separaba las entidades para facilitar la actitud clínica (bajo grado: seguimiento vs alto grado: colposcopia) y al

eliminar una categoría pretendía conseguir mayor reproducibilidad. En 2002 se publicó la revisión del sistema, que con pocas modificaciones, se usa en el informe citológico en la actualidad.³⁵

A finales de los años 90 ya existen publicaciones que sugieren la aplicación de esta clasificación binaria al diagnóstico histológico, intentando mejorar los índices de concordancia³⁶

1.3.3 Los problemas para su diagnóstico. Papel de los biomarcadores.

A lo largo de la primera década del siglo XXI siguen publicándose numerosos trabajos donde se hace patente la baja concordancia expresada por el índice kappa entre patólogos a la hora de diagnosticar las biopsias de cérvix, sobre todo a la hora de diagnosticar CIN2 (Tabla 1)^{37,38,39,40} El diagnóstico de CIN2 es importante, puesto que se considera una lesión de alto grado, y como tal va seguida de un tratamiento escisional con las consiguientes complicaciones.

	Reusenbach ³⁸ (2014)	Meserve ³⁷ (2014)	Klaes ³⁹ (2002)	Waxman ⁴⁰ (2012)
CN1	No consta	0,64	0,53	No Consta
CIN2	0,40	0,40	0,35	0,43
CIN3	0,61	0,68	0,72	0,80

Tabla 1: comparación de los índices kappa de concordancia entre diferentes series.

En este ambiente de confusión, en Marzo de 2012, se reunió el Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad Americana de Patología Cervical y Colposcopia para intentar estandarizar criterios y poner al día la nomenclatura de las lesiones del tracto genital inferior (cérvix, vagina, vulva y ano) asociadas al VPH. De este encuentro nace el Proyecto LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*).⁴¹

Conociendo la biología del VPH, el virus interacciona con el epitelio escamoso de dos maneras diferentes: de una manera transitoria, productora de viriones, que origina las lesiones de bajo grado, y de una manera persistente, en la cual los oncogenes virales ya se han integrado en el genoma de la célula huésped desencadenando la producción de las oncoproteínas virales E6 y E7, que forman complejos con p53 y con pRb²⁵, produciéndose una expansión clonal del epitelio. Esta última es la que nos interesa detectar y tratar. Son dos formas claramente diferentes de interaccionar el virus con el epitelio, que representarían las lesiones de bajo y alto grado respectivamente. El Sistema Bethesda ya aplica esta clasificación a la citología, más relacionada con la naturaleza de enfermedad, y no la clasificación CIN, más compleja y menos reproducible. El fin último de los sistemas preventivos es detectar y tratar, si procede, las lesiones de alto grado.

Con estas premisas, LAST sugiere aplicar la clasificación binaria a las biopsias, para mejorar reproducibilidad y facilitar el manejo de las lesiones.

La interpretación de la colposcopia y de la biopsia son subjetivas, y puede haber lesiones en diferentes estadios. El uso racional y adecuado de la biopsia, basado en la localización y tipificación adecuada de las imágenes colposcópicas es mandatorio.^{42,41}

Es en este punto, en el de mejorar la precisión, donde podríamos apoyarnos en los biomarcadores para mejorar la concordancia y hacer más preciso el diagnóstico.

Aunque se han estudiado varios (p53, Ki-67) el biomarcador por excelencia en las lesiones del tracto genital inferior relacionadas con VPH es p16⁴³. Existen múltiples estudios analizando Ki67 y p53 sin obtener resultados satisfactorios que permitan la estandarización de su uso.⁴⁴

Recientemente se ha descrito una nueva población celular de la unión escamocolumnar que presenta una serie de biomarcadores característicos, entre ellos la citoqueratina 7 (CK7) un marcador de uso habitual en todos los laboratorios de Anatomía Patológica. Estos marcadores, son positivos en casi todas las lesiones de alto

grado y en los cánceres invasores y en los adenocarcinomas VPH positivos. Se ha descrito que las lesiones positivas para CK7 tienen menor índice de regresión, aunque deben realizarse más estudios en esta línea para poder obtener conclusiones definitivas.⁴⁵

P16 es una proteína inhibidora 2A de quinasa dependiente de ciclina, también denominada CDKN2A. Es una proteína supresora de tumores codificada en humanos por el gen *CDKN2A*.

Esta proteína bloquea la fosforilación de varias ciclinas y contrarresta la fosforilación y la inactivación de pRB. Así en células normales, una sobreexpresión de p16 inhibe el ciclo celular, por tanto p16 es un factor antiproliferativo protector del genoma.¹¹

El Oncogen E7 cuando se integra en el genoma celular interacciona tanto con pRB como con p16. Esta sobreexpresión puede detectarse con técnicas de inmunohistoquímica. Una sobreexpresión de p16 como indicador de integración viral se detecta en una biopsia de cérvix como tinción intensa y difusa en el epitelio escamoso, tal como se muestra en la figura 12 y en la figura 13.

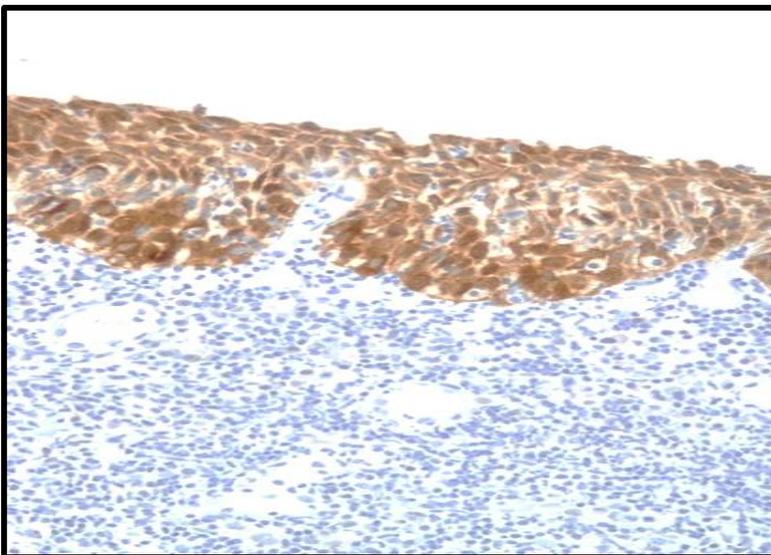


Figura 12: Biopsia de cérvix teñida con p16 que muestra positividad intensa y difusa en todo el espesor del epitelio. (p16 20x) *

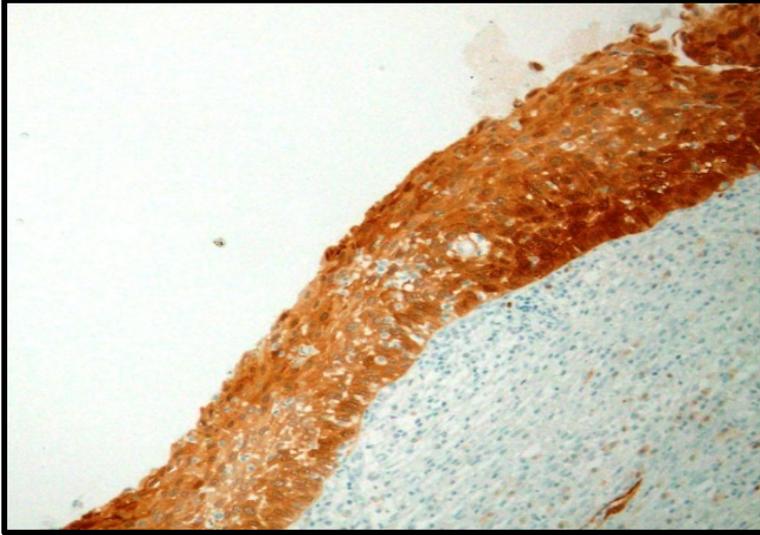


Figura 13: Imagen que muestra una biopsia con positividad intensa y difusa para p16. (p16 20x)*

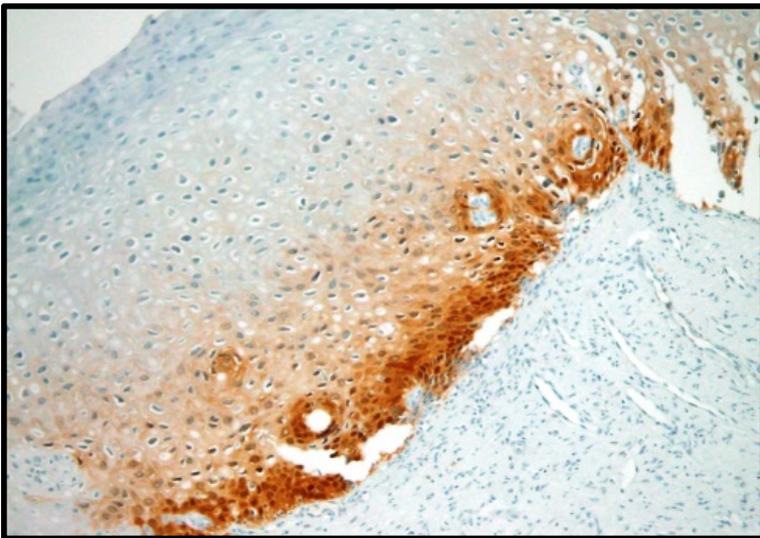


Figura 14: Imagen que muestra positividad de p16 sólo en estratos basales. (p16 20x)*

*Imágenes posteriormente sometidas a tratamiento digital

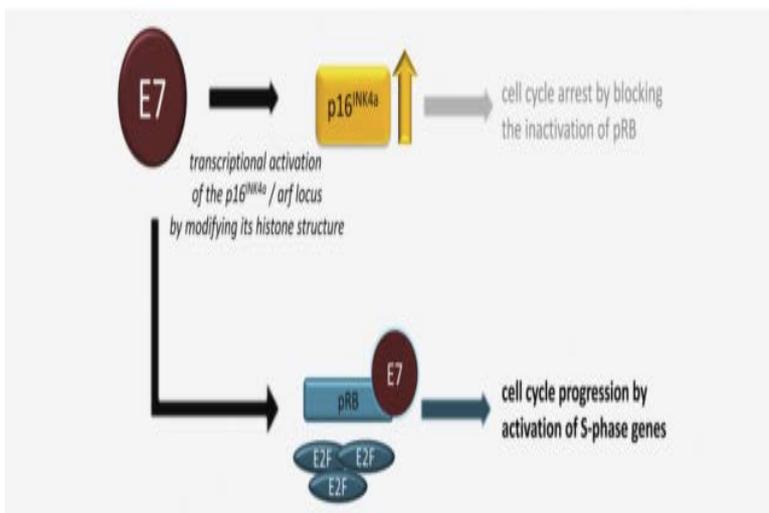


Figura 15¹¹: Muestra la acción del E7 viral sobre pRb y p16.

Los cánceres de cérvix, y sus precursores, demuestran una sobreexpresión de p16 como resultado de la inactivación de pRb por E7 (Figura 15).

Aunque la mayoría de biopsias teñidas con p16 son fáciles de interpretar como positivas o negativas, existen casos ambiguos, en los que diferentes patólogos discrepan. Un trabajo reciente analiza una serie de estos casos, más difíciles de valorar observando que el 70% de estos casos son negativos para VPH de alto riesgo⁴⁶.

Series recientes demuestran una sensibilidad y una especificidad para detectar HSIL de p16 que ya alcanza 99% y 95% respectivamente, además de tener un muy buen valor predictivo positivo, cuando la tinción en el epitelio es fuerte y difusa, y muy buen valor predictivo negativo cuando no existe tinción.²⁵

La evidencia demuestra que las lesiones de bajo grado (LSIL) son las que regresan en su mayor parte y como tales se manejan, haciendo seguimiento. Las LSIL equivaldrían a las anteriores CIN1. Las lesiones de alto grado (HSIL) son aquellas con verdadero riesgo de progresión a cáncer invasor y hay que tratarlas. Los antiguos CIN3 estarían en esta categoría.

El problema está con los CIN2. Esta categoría diagnóstica supone un verdadero problema tanto para ginecólogos a la hora de manejarlos, como para patólogos a la

hora de diagnosticarlos. Hasta ahora, los CIN2 se consideraban lesiones de alto grado con verdadera capacidad de progresión a cáncer y como tales se trataban, pero la literatura⁴⁷, ha demostrado que es una categoría ambigua, hasta un 64% regresan en los 12 primeros meses²³ y tiene muy baja concordancia entre patólogos a la hora de diagnosticarla, por lo que se ha hecho necesario el uso de técnicas de soporte, biomarcadores, para intentar homogeneizar diagnósticos. No se pretende el uso indiscriminado de los biomarcadores, sino un uso racional, sólo en aquellos casos en los que es necesario.

La concordancia entre patólogos a la hora de diagnosticar CIN2 es del 43%, con series en las que no se alcanzan el 31%. Los CIN2 representan lesiones que algunos patólogos clasificarían como CIN1 y otros clasificarían como CIN3.⁴¹

Los biomarcadores, p16 concretamente, ayudarían a resolver estos casos complejos, ya que por criterios sólo morfológicos los CIN2 son difíciles de manejar.

LAST da unas recomendaciones muy claras sobre cuándo debemos utilizar p16 en las biopsias de cérvix:

- En los casos en los que con la Hematoxilina-Eosina existan dudas sobre si se trata de una lesión de alto grado (CIN2-CIN3) o una lesión benigna (metaplasia escamosa inmadura, atrofia, cambios reparativos)
- En los casos que se interpreten como CIN2:
 - Tinción fuerte y difusa afectando a todo el espesor del epitelio: HSIL
 - Ausencia de tinción o cualquier otro tipo de patrón diferente al comentado anteriormente: LSIL – o Lesión no relacionada con el VPH.
- Casos en los que existe desacuerdo entre patólogos, cuando una de las opciones posibles sea CIN2-3.

- Casos de biopsias negativas con citologías previas patológicas (citologías diagnosticadas de Atipia Escamosa de significado indeterminado (ASCUS)/HPV16+, Células atípicas que no permiten descartar una lesión de alto grado (ASC-H) o Atipia de células Glandulares (AGC). Anotemos que Ordi y colaboradores refieren un incremento de detección de 24,5% de lesiones intraepiteliales utilizando p16 en este supuesto⁴⁷. Existen otras series más recientes, como la de Alana et al⁴⁸ que también muestran un incremento significativo en la detección de lesiones en este supuesto.

También LAST insiste mucho sobre cuándo no usar p16:

- En los casos claros de CIN1
- En los casos claros de CIN3
- En los casos negativos (excepto el cuarto supuesto descrito en el apartado anterior)

Apoyando estas recomendaciones, encontramos diferentes publicaciones, que muestran la mayor concordancia entre patólogos a la hora de diagnosticar CIN2 con el uso de p16.

La serie de Meserve y colaboradores³⁷ presenta un incremento de 8 puntos, el metanálisis de Reusenbach³⁸ presenta una K entre observadores para el diagnóstico de CIN2 sólo con Hematoxilina-Eosina (HE) de 0,41 frente a una K de 0,73 si le añadimos p16. Tom Wright en su estudio CERTAIN⁴⁹ presentado en la IPV de Ciudad del Cabo (2017) presenta unos datos de mejora en la concordancia para CIN2 de 0,58 sólo con HE a 0,73 si añadimos p16.

Apoyando el uso racional de p16, es decir, apoyando su no uso fuera de estas recomendaciones, existen muchos datos que demuestran la poca efectividad del biomarcador para intentar seleccionar el 10-15% de **lesiones de bajo grado** con probabilidad de progresar.⁵⁰

Este último punto es muy importante, ya que un uso indiscriminado y no adecuado puede tener consecuencias, nos puede llevar a un sobre diagnóstico de lesiones que realmente son de bajo grado y por una positividad de p16 se diagnostican de HSIL, cuando en ese caso no deberíamos haber realizado la técnica.⁵¹

LAST también nos explica qué criterios debemos seguir para considerar una tinción p16 como positiva. Aunque la bibliografía refleja tasas de concordancia de 0,91³⁹ a la hora de interpretar un p16 como positivo o negativo, existen toda una serie de casos intermedios que no son tan fáciles de valorar.

Las recomendaciones son considerar una p16 positiva cuando la tinción del epitelio es intensa y difusa, ya que es en estos casos donde se ha demostrado su gran sensibilidad y su valor predictivo positivo²⁵, el resto de supuestos (tinción débil, focal, parcheada o ausencia de tinción) serán considerados negativos. Sobre los supuestos intermedios hay bibliografía que justifica falsos diagnósticos de HSIL por interpretar como positivas biopsias que no lo son.⁵⁰

Por tanto, vemos que el diagnóstico definitivo se debe hacer de forma conjunta, valorando primero la Hematoxilina-Eosina y en función de ésta realizar p16 cuando sea necesario.

Con la utilización de la clasificación binaria y el uso de p16, se pretende conseguir una mayor exactitud diagnóstica para poder identificar las lesiones que deben tratarse.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si p16 se expresa como consecuencia de la reacción celular a la integración viral en la infección por VPH, su patrón inmunohistoquímico en lesiones CIN2 puede ser un marcador de riesgo de progresión y contribuir a la clasificación predictiva de estos casos.

3. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Analizar si la adición de un corte consecutivo teñido con p16 a la tinción con Hematoxilina-Eosina (HE) mejora la concordancia entre patólogos en el diagnóstico de las biopsias pequeñas de cérvix.
- Estudiar si la tinción con p16 puede predecir la evolución de lesiones diagnosticadas como Neoplasia Intraepitelial de Cérvix (CIN) 2.

4. OBJETIVOS DERIVADOS

- Analizar si el uso de la clasificación dicotómica – LSIL – HSIL - mejora la concordancia entre diferentes patólogos a la hora de valorar biopsias pequeñas de cérvix teñidas con HE en comparación con la observada con el uso de la clasificación clásica, CIN 1 – 2 – 3.
- Estudiar la concordancia entre patólogos al valorar biopsias teñidas con p16.

5. MATERIAL

5.1 Grupo estudio:

Se han seleccionado de entre todas las biopsias de cérvix que se registraron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Son Dureta, Servicio Balear de Salud, Palma de Mallorca entre los años 1999 y 2007, (6196 biopsias) aquellas que habían sido diagnosticadas de neoplasia intraepitelial de cérvix (CIN) grado 2 por los patólogos a cargo, en aquellos años, de la Patología Ginecológica.

5.2 Criterios de inclusión:

Para la valoración de hematoxilina-eosina (HE) y p16, se incluyeron las biopsias cuyo bloque estaba en el archivo, en buen estado de conservación, y con material macroscópicamente de tamaño valorable, mayor de 2 mm. La selección final incluyó 132 bloques de CIN2 (**"CASOS"**)

Para usar como **"CONTROLES"** se ha hecho una selección de 154 biopsias de cérvix, diagnosticadas en nuestro servicio del Hospital Universitario Son Espases*, entre 2015 y 2016.

Para la segunda parte del estudio (estudio de la evolución del CIN2), se seleccionaron entre los 132 **CASOS**, aquéllos pertenecientes a pacientes con historia clínica y seguimiento en el hospital. Hemos recuperado 116 historias clínicas para revisar.

Además, se han recogido de las historias clínicas de las pacientes:

- Edad
- Hábito tabáquico
- Técnica Anticonceptiva
- Estado Inmunológico
- Informe de la conización realizada. Se realiza conización en nuestro hospital a 109 pacientes, estudiando el resultado anatomopatológico.

El material sometido a evaluación en el presente estudio ha incluido, en consecuencia, 286 biopsias: 132 piezas diagnosticadas de CIN2 del histórico (entre 1999 y 2007) **(CASOS)** para evaluación y estudio de la evolución y 154 biopsias diagnosticadas recientemente como N.LIE, CIN1, CIN2 o CIN3, **(CONTROLES)**

La distribución final para cada uno de los tramos diagnósticos de los controles resultó la siguiente:

- 11 biopsias negativas
- 102 CIN 1
- 7 CIN 2*
- 34 CIN 3

** No se han seleccionado más biopsias CIN2 para no incrementar aún más el número de biopsias en esta categoría diagnóstica al tener ya los 132 **CASOS**.*

5. 3 Criterios de exclusión:

Biopsias demasiado pequeñas, bloques ausentes y pacientes sin ningún tipo de seguimiento en nuestro Hospital.

**En el año 2011 se cerró el Hospital Son Dureta trasladando a todo el personal y todos sus servicios al Hospital Universitario Son Espases.*

En la tabla que se adjunta a continuación, podemos ver un diagrama del trabajo realizado.

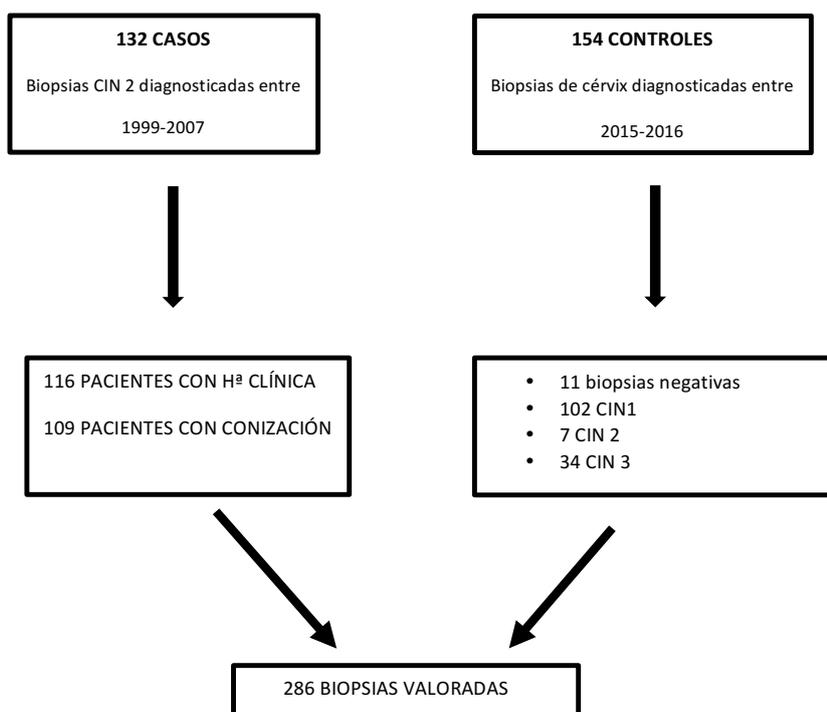


Tabla 2: Resumen del manejo del Material para este trabajo.

6. MÉTODO

Dos técnicos especialistas en Anatomía Patológica (NL y AB) realizaron dos cortes de los bloques de parafina de los **132 CASOS** incluidos, uno para teñir con Hematoxilina-Eosina (HE) y otro para teñir con p16.

No fue necesario realizar nuevos cortes de las 154 biopsias **CONTROL**, ya que las HE estaban en perfecto estado y cumplían los criterios de inclusión.

De estas 154 biopsias, se seleccionaron 52 al azar para realizar p16, para que los patólogos valoraran los 132 CASOS de CIN 2 mezcladas con otras biopsias, y así evitar sesgos.

Para la realización de p16 hemos utilizado el Kit CINtec® (Ventana Roche Diagnostics, Tucson, Arizona) para histología. Se ha utilizado con los equipos de tinción VENTANA BenchMarch ULTRA usando el sistema de detección OptiView DAB IHC. Uno de los sistemas disponibles para la realización de las técnicas de Inmunohistoquímica en los Servicios de Anatomía Patológica.

En el estudio han participado tres Patólogos evaluadores (GMC, JEST y JJTR) con más de veinte años de experiencia. Los tres son Patólogos Generales, uno de ellos con mayor dedicación al campo de la Patología Ginecológica (GMC) y otro con mayor dedicación a la Citopatología Ginecológica (JEST).

Los patólogos realizaron **cuatro rondas** diagnósticas:

1. **Primera ronda:** Evaluación de las HE

Los patólogos revaloraron las 132 biopsias diagnosticadas de CIN2 previamente, (CASOS) y establecieron un diagnóstico basado en la clasificación CIN1 – CIN 2 – CIN3, con seis categorías posibles:

- 0: biopsia negativa
- 1: CIN 1
- 2: CIN 2
- 3: CIN 3
- 4: Carcinoma

5: Adenocarcinoma

6: Biopsia no valorable

Para que la evaluación fuera ciega y sin sesgos por conocimiento previo, las 132 biopsias con diagnóstico inicial de CIN2 (**CASOS**) se mezclaron con las 154 con diagnóstico variable (**CONTROLES**).

A los 3 patólogos se les pasaron un total de 286 biopsias teñidas con HE, acompañadas de una tabla para que anotaran sus diagnósticos. Todos ellos valoraron los mismos cristales, en el mismo orden, de manera secuencial. Ninguno de ellos sabía el diagnóstico previo ni el diagnóstico del resto de patólogos.

2. Segunda ronda: Evaluación de p16

Se solicitó a los tres Patólogos la valoración de las 132 biopsias que habían sido teñidas con p16 de forma separada, sin ir acompañados de la HE correspondiente.

Se les pidió que las clasificaran según dos niveles de diagnóstico:

- **Positivo:** valor 1, tinción difusa e intensa de todo el espesor del epitelio.

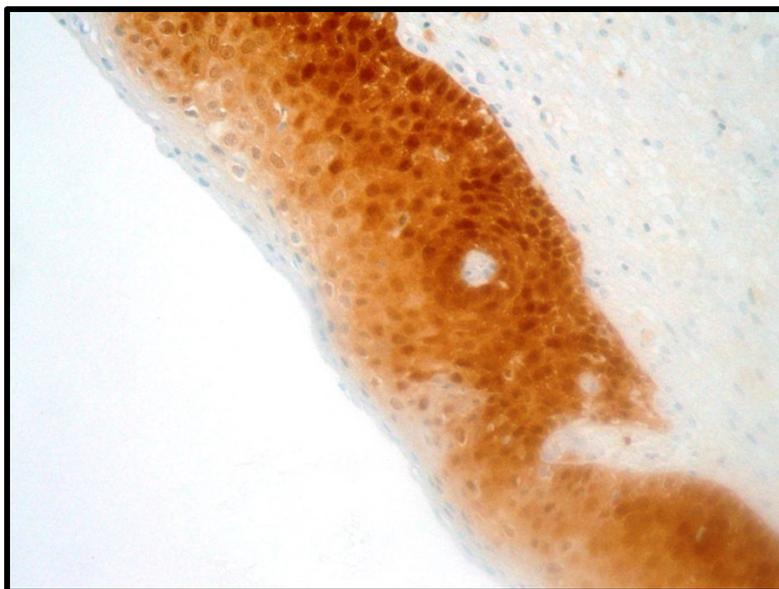


Figura 16: Ejemplo de biopsia de cervix teñida con p16 con resultado positivo.

• **Negativo:** valor 0, cualquiera de las otras opciones, sin tinción, tinción focal, tinción parcheada o difusa afectando sólo a la capa basal del epitelio.

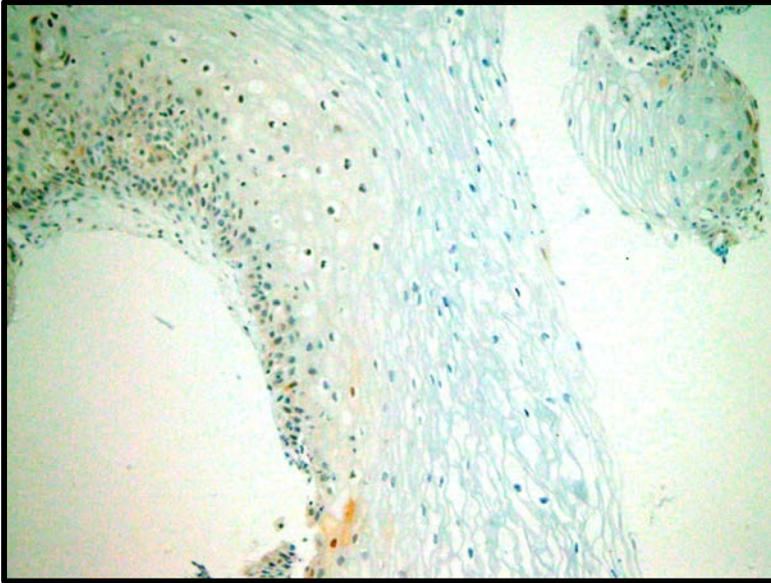


Figura 17: Ejemplo de biopsia de cérvix teñida con p16 con resultado negativo.

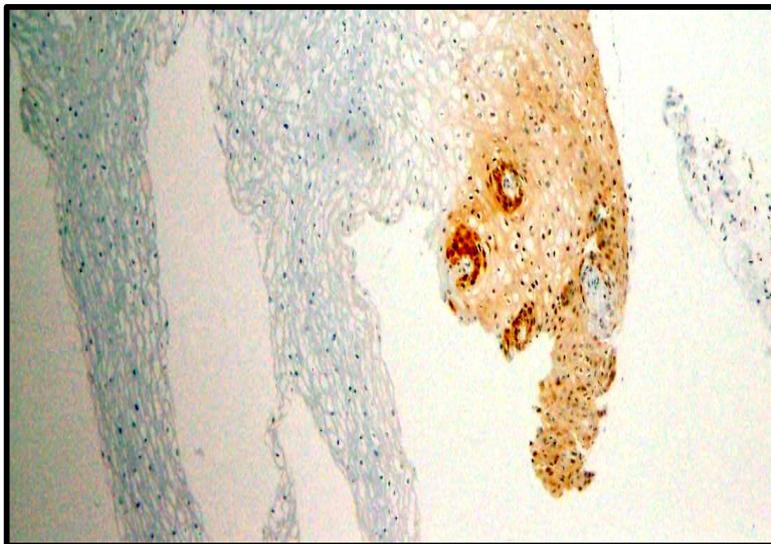


Figura 18: Ejemplo de biopsia de cérvix teñida con p16 con resultado negativo, ya que muestra una tinción débil y focal.

3. Tercera ronda: Evaluación de HE + p16

Como tercera ronda diagnóstica a los Patólogos evaluadores se les proporcionaron, las 132 biopsias **CASOS** más 52 biopsias **CONTROL** (elegidas al azar del total de 154) : total 184 biopsias revisadas con HE+p16. De todas ellas se les proporcionó la laminilla teñida con HE acompañada de su p16 correspondiente.

Para establecer el diagnóstico se utilizó la misma escala diagnóstica que en la primera ronda, ayudándose ahora de la tinción p16:

0: biopsia negativa

1: CIN 1

2: CIN 2

3: CIN 3

4: Carcinoma

5: Adenocarcinoma

6: Biopsia no valorable

4. Cuarta ronda: clasificación dicotómica con HE

Como cuarta y última ronda se les proporcionaron de manera secuencial, 50 HE - sólo HE- seleccionadas al azar de manera ciega, del total inicial de las biopsias (286) para que esta vez establecieran el diagnóstico de Negativo, Lesión de Bajo Grado (LSIL) o Lesión de Alto Grado (HSIL) (clasificación dicotómica).

Si sumamos todas las lecturas que han hecho los patólogos de las diferentes laminillas, tanto de HE como de p16, de forma separada y conjunta, teniendo en cuenta las cuatro rondas, obtenemos que en este trabajo se han realizado un total de 2508 lecturas.

A continuación podemos ver un esquema resumen, donde se recogen las laminillas que revisa cada patólogo en cada una de las rondas y las opciones diagnósticas.

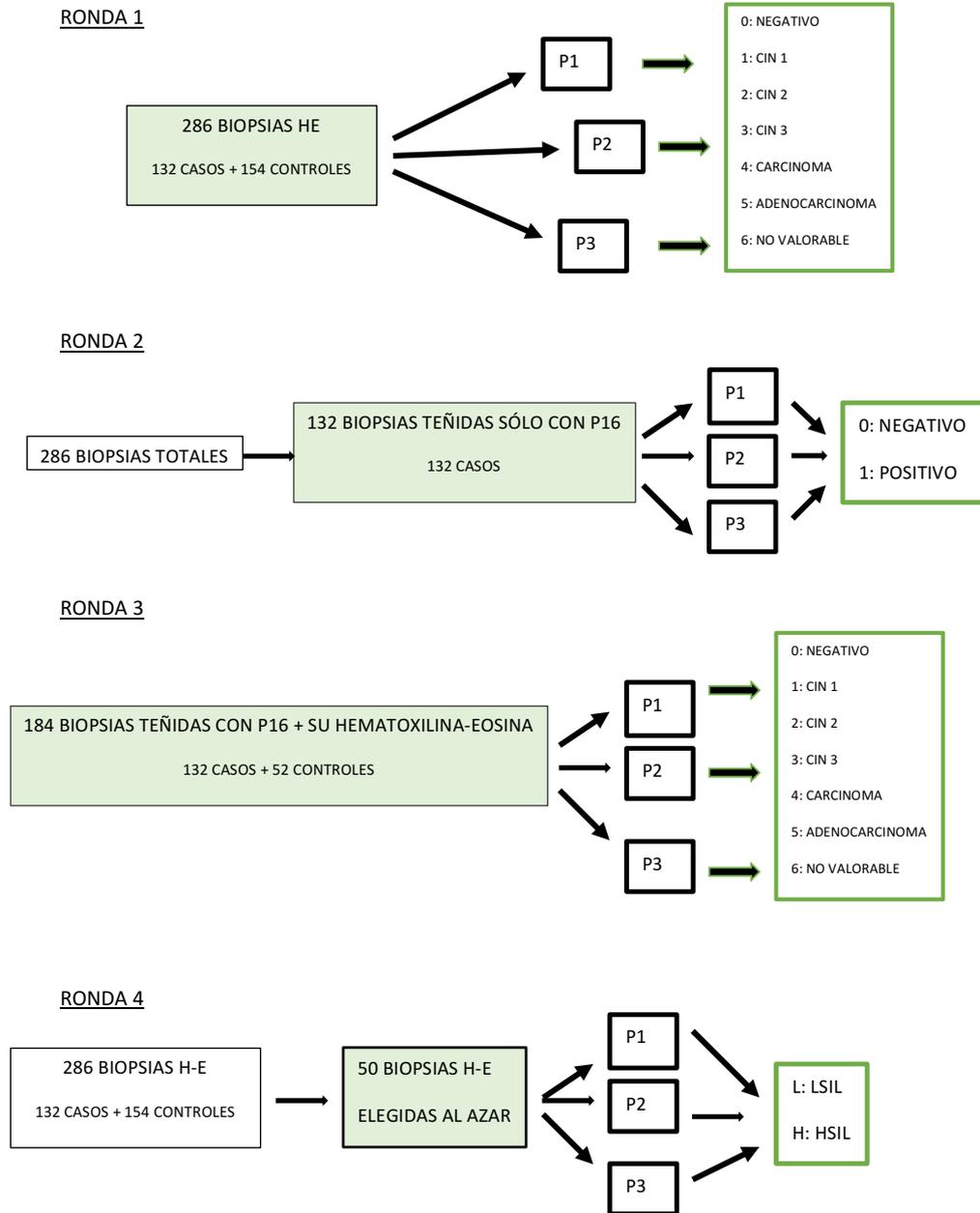


Tabla 3: Esquema de las diferentes rondas diagnósticas realizadas por los patólogos.

Recogidos todos los datos de las cuatro evaluaciones se han analizado:

- Concordancia interobservador al realizar el diagnóstico sólo con HE: **Ronda 1.**
- Concordancia interobservador a la hora de valorar p16: **Ronda 2.**
- Concordancia interobservador a la hora de valorar HE + p16 (**Ronda 3**) y concordancia intraobservador a la hora de establecer un diagnóstico sólo con HE (**Ronda 1**) vs HE + p16 (**Ronda 3**).
- Concordancia intraobservador a la hora de establecer un diagnóstico dicotómico de las biopsias (LSIL - HSIL): **Ronda 4.**

Por otro lado, se han estudiado las conizaciones que se realizaron posteriormente a la biopsia de CIN2. El resultado de estas conizaciones, se ha relacionado con el resultado de p16 de la biopsia previa, para valorar si la positividad previa de p16 se asociaba a un mayor número de HSIL en la pieza de conización.

Análisis estadístico

Los resultados de cada variable se presentan como media y desviación estándar, en el caso de las variables continuas, y utilizando el recuento de casos por cada categoría y su frecuencia relativa del total en el de las variables categóricas. En determinados estimadores se presenta su valor y su intervalo de confianza al 95%.

No se realizó formalmente un cálculo del tamaño muestral ya que se disponía de una muestra de mujeres participantes y sus muestras de conveniencia amplia.

La significación estadística en las tablas se compara en cada variable realizando una ANOVA inicial y posteriormente un test bilateral para las variables continuas, y una χ^2 para las categóricas. La correlación de Pearson y Spearman se utilizó para determinar la asociación entre variables continuas y discretas, respectivamente. Para determinar la concordancia entre los patólogos se utilizó el porcentaje de casos concordantes y el índice kappa, estimador que tiene en cuenta la concordancia atribuible al azar en la

proporción de la concordancia observada. A la hora de interpretar el valor de kappa es útil disponer, a pesar de su arbitrariedad, de una escala como la detallada en la tabla 4.

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Tabla 4. Fuente: Altman DG. Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall; 1991.⁵²

Finalmente, en todas las pruebas estadísticas realizadas se utilizó un nivel de significación estadística inferior al 0,05.

7. RESULTADOS

7.1 Características sociodemográficas

7.1.1 Edad:

Recogimos la fecha de nacimiento de todas las pacientes de las que habíamos estudiado una biopsia. Pudimos recoger la edad de todas las pacientes, ya que aunque no consiguiéramos recuperar todas las historias, la fecha de nacimiento se recoge en nuestra base de datos acompañando a la biopsia.

La edad media de las pacientes incluidas fue de 34 años.

	N	Mínima	Máxima	Media	Desviación Std.
EDAD al DX	286	17	68	34,62	8,731
Valid N	286				

Tabla 5: En esta tabla observamos la media de edad de las pacientes de todas las biopsias de cérvix estudiadas.

La media de las pacientes “casos” es de 33,77 años, oscilando entre 19 y 68 años.

Se consiguieron del archivo 116 historias clínicas de entre las 132 pacientes **CASOS** (pacientes con biopsia de CIN2 en nuestro hospital entre 1999 y 2007) para poder analizar los datos sociodemográficos. Las 16 pacientes restantes no tienen historia clínica ni seguimiento en nuestro hospital.

7.1.2 Tabaquismo:

Se recoge de las historias clínicas si las pacientes fuman, han fumado o no han fumado nunca. Se codifica numéricamente para facilitar el análisis estadístico.

0: No fumadora

1: Exfumadora

2: Fumadora activa

NC: No Consta. Hay un resto de 4 pacientes en las que no se recoge el dato en la historia.

	Frecuencia	Porcentaje
NC	4	3.4
0	35	30.2
1	3	2.6
2	74	63.8
Total	116	100.0

Tabla 6: En esta tabla recogemos los datos respecto al hábito tabáquico de las pacientes de nuestro estudio. Número total de pacientes en cada una de las categorías, y porcentaje de cada una de las categorías con respecto al total.

7.1.3 Anticoncepción:

Recogemos de las historias clínicas el uso de anticonceptivos y en el caso de utilizarlos, especificar cuál es. Igual que en ejemplos anteriores, codificamos numéricamente.

0: Ninguno

1: Anticoncepción hormonal

2: Dispositivo Intrauterino (DIU)

3: DIU hormonal*

4: Método definitivo (Ligadura de trompas)

NC: No Consta

	Frecuencia	Porcentaje
NC	19	16.4
0	52	44.8
1	34	29.3
2	4	3.4
4	7	6.0
Total	116	100.0

Tabla 7: En esta tabla observamos el número de usuarias de cada uno de los diferentes métodos y el porcentaje de cada uno de ellos con respecto al total.

**Vemos que no existe ninguna paciente que tenga registrado el uso de DIU hormonal, por este motivo el número 3 no aparece en la tabla.*

7.1.4 Estado Inmunitario

Recogemos el estado inmunitario de las pacientes, diferenciando si la inmunosupresión se debe al Virus de la Inmunodeficiencia Humana o si se debe al uso de fármacos inmunosupresores por diferentes causas. Codificamos numéricamente igual que en los casos anteriores.

NC: No consta

0: Normal

2: Tratamiento inmunosupresor

3: VIH

	Frecuencia	Porcentaje
NC	4	3.4
0	106	91.4
2	1	.9
3	5	4.3
Total	116	100.0

Tabla 8: En esta tabla observamos el estado inmunitario de las pacientes, representadas como números absolutos y como porcentaje del total.

7.2 Diagnóstico de las biopsias

Hemos codificado los diagnósticos, en todos los casos, de la siguiente manera:

- 0: Negativo
- 1: CIN1
- 2: CIN2
- 3: CIN3
- 4: Carcinoma
- 5: Adenocarcinoma
- 6: No valorable

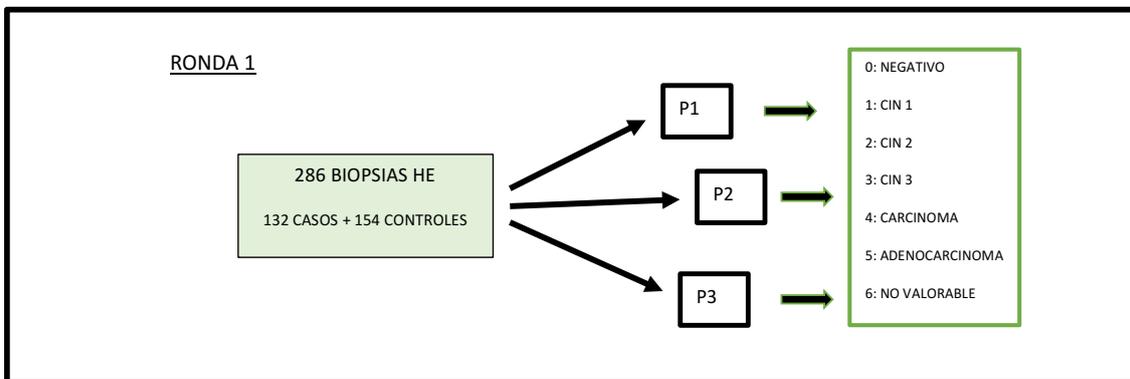


Figura 17: En esta figura observamos una representación esquemática de la ronda 1.

7.2.1 RONDA 1: Estudio de las biopsias sólo con la HE

- a. Diagnósticos con Hematoxilina Eosina (HE): los tres patólogos revisaron las 286 biopsias, estableciendo un diagnóstico basado en las 6 categorías citadas anteriormente. (Ver tablas de frecuencia de resultados en el Anexo 1)
- b. Comparaciones diagnósticas patólogos vs GOLD: Hemos comparado los diagnósticos hechos por cada uno de los patólogos con el diagnóstico que tenían estas biopsias en el archivo. A este diagnóstico lo hemos denominado "GOLD":
 - Patólogo 1 vs Diagnósticos del archivo (GOLD)

- Patólogo 2 vs Diagnósticos del archivo (GOLD)
- Patólogo 3 vs Diagnósticos del archivo (GOLD)

Con cada una de estas comparaciones, se establecieron unos índices Kappa de concordancia. (Ver tablas de resultados de la concordancia en el Anexo 2)

- c. Comparaciones diagnósticas entre cada uno de los patólogos: Hemos comparado los diagnósticos hechos por cada uno de los patólogos entre ellos sólo con HE, estableciendo también unos índices Kappa de concordancia.

A continuación presentamos las tablas obtenidas de las comparaciones realizadas entre los diagnósticos de cada uno de los patólogos sólo con HE para poder establecer unos índices de concordancia.

Tablas de concordancia entre el Patólogo 1 y el Patólogo 2 sólo con HE

		HE P2						Total	
		0	1	2	3	4	6		
HE P1	0	Count	7	1	0	0	0	0	8
		% within HE P2	30.4%	1.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.8%
	1	Count	16	86	23	1	0	4	130
		% within HE P2	69.6%	87.8%	17.4%	4.3%	0.0%	57.1%	45.5%
	2	Count	0	11	62	6	0	1	80
		% within HE P2	0.0%	11.2%	47.0%	26.1%	0.0%	14.3%	28.0%
	3	Count	0	0	46	16	3	0	65
		% within HE P2	0.0%	0.0%	34.8%	69.6%	100.0%	0.0%	22.7%
	6	Count	0	0	1	0	0	2	3
		% within HE P2	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%	28.6%	1.0%
	Total	Count	23	98	132	23	3	7	286
		% within HE P2	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 9: En esta tabla observamos los resultados del patólogo 1 en las filas y los resultados del Patólogo 2 en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. Las casillas sombreadas representan el porcentaje de concordancia para cada una de las categorías diagnósticas. Las categorías diagnósticas están codificadas numéricamente 0-1-2-3-4-6.

Índice Kappa de concordancia

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.	
Índice Kappa de concordancia	Kappa	.431	.038	12.157	.000
N of Valid Cases		286			

Tabla 10: Índice Kappa de concordancia para todos los diagnósticos emitidos con HE (286) entre el patólogo 1 y el patólogo 2.

Tabla de concordancia entre Patólogo 1 y Patólogo 3 con HE

		HE P3							Total	
		0	1	2	3	4	6			
HE P1	0	Count	0	8	0	0	0	0	0	8
		% within HE P3	0.0%	17.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.8%
	1	Count	1	35	85	7	1	0	1	130
		% within HE P3	50.0%	76.1%	74.6%	9.3%	2.2%	0.0%	33.3%	45.5%
	2	Count	1	2	28	39	10	0	0	80
		% within HE P3	50.0%	4.3%	24.6%	52.0%	22.2%	0.0%	0.0%	28.0%
	3	Count	0	0	1	29	34	1	0	65
		% within HE P3	0.0%	0.0%	0.9%	38.7%	75.6%	100.0%	0.0%	22.7%
	6	Count	0	1	0	0	0	0	2	3
		% within HE P3	0.0%	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	66.7%	1.0%
	Total	Count	2	46	114	75	45	1	3	286
		% within HE P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 11: En esta tabla observamos los resultados del patólogo 1 en las filas y los resultados del Patólogo 3 en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. Las casillas sombreadas en rosa representan el porcentaje de casos concordantes para cada una de las categorías diagnósticas. La sombreada en verde es el porcentaje de casos negativos para el Patólogo 3 que el Patólogo 1 ha diagnosticado como CIN1. Las categorías diagnósticas están codificadas numéricamente 0-1-2-3-4-6.

Índice Kappa de concordancia

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	.415	.039	11.895	.000
N of Valid Cases	286			

Tabla 12: Índice Kappa de concordancia para todos los diagnósticos emitidos con HE (286) entre el patólogo 1 y el patólogo 3.

Tabla de concordancia entre Patólogo 2 y Patólogo 3 con HE

		HE P3							Total	
			0	1	2	3	4	6		
HE P2	0	Count	0	16	7	0	0	0	0	23
		% within HE P3	0.0%	34.8%	6.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	8.0%
1	Count	Count	1	23	68	6	0	0	0	98
		% within HE P3	50.0%	50.0%	59.6%	8.0%	0.0%	0.0%	0.0%	34.3%
2	Count	Count	1	5	36	62	28	0	0	132
		% within HE P3	50.0%	10.9%	31.6%	82.7%	62.2%	0.0%	0.0%	46.2%
3	Count	Count	0	0	1	7	15	0	0	23
		% within HE P3	0.0%	0.0%	0.9%	9.3%	33.3%	0.0%	0.0%	8.0%
4	Count	Count	0	0	0	0	2	1	0	3
		% within HE P3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	4.4%	100.0%	0.0%	1.0%
6	Count	Count	0	2	2	0	0	0	3	7
		% within HE P3	0.0%	4.3%	1.8%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	2.4%
Total	Count	Count	2	46	114	75	45	1	3	286
		% within HE P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 13: En esta tabla observamos los resultados del patólogo 2 en las filas y los resultados del Patólogo 3 en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. Las casillas sombreadas en rosa representan el porcentaje de casos concordantes para cada una de las categorías diagnósticas. La sombreada en verde es el porcentaje de casos CIN3 para el Patólogo 3 que el Patólogo 2 ha diagnosticado como CIN2. La casilla sombreada en amarillo es el porcentaje de biopsias que el patólogo 3 ha diagnosticado como negativas y el patólogo 2 como CIN1. Las categorías diagnósticas están codificadas numéricamente 0-1-2-3-4-6.

Índice Kappa de concordancia

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	.410	.039	12.075	.000
N of Valid Cases	286			

Tabla 14: Índice Kappa de concordancia para todos los diagnósticos emitidos con HE (286) entre el patólogo 1 y el patólogo 3.

7.2.2 RONDA 2: Interpretación de p16

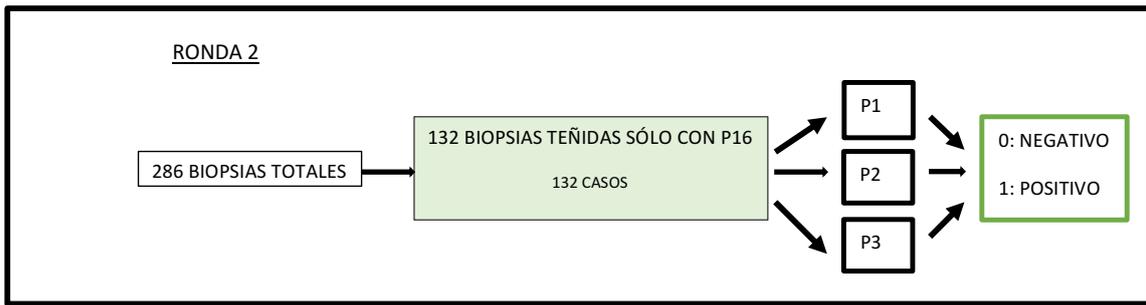


Figura 18: Representación esquemática de la segunda ronda.

Los 3 patólogos tuvieron que interpretar el p16 de los 132 CASOS sin la HE. Pasamos un documento explicativo (Anexo 3) sobre cómo valorar p16, explicando qué patrones se consideraban positivos o negativos, tratando de homogeneizar resultados. Se les dieron 3 opciones diagnósticas:

- 0: Negativo
- 1: Positivo
- 6: No Valorable

Para poder establecer un valor definitivo de p16, para poder relacionarlo con las conizaciones, se seleccionó como **VALOR DEFINITIVO DE P16** aquel resultado en el que coincidían dos o más patólogos. En un solo caso se obtuvieron 3 valores diferentes. En este caso se hizo revalorar por el patólogo 1 y el patólogo 2 para obtener un diagnóstico de consenso. (Las tablas de los resultados pueden consultarse en el Anexo 3)

También se establecieron comparativas entre los 3 patólogos a la hora de valorar p16, estableciendo unos índices Kappa de concordancia. (Ver tablas en Anexo 4)

7.2.3 RONDA 3: Interpretación de las biopsias valorando la HE junto con su p16

En esta tercera ronda se revisan un total de 184 biopsias. Este número lo obtenemos de seleccionar las 132 biopsias correspondientes a los “CASOS” mezcladas con una selección aleatoria de 52 biopsias más de entre las consideradas “CONTROLES” (Ver las tablas con los resultados en el Anexo 5).

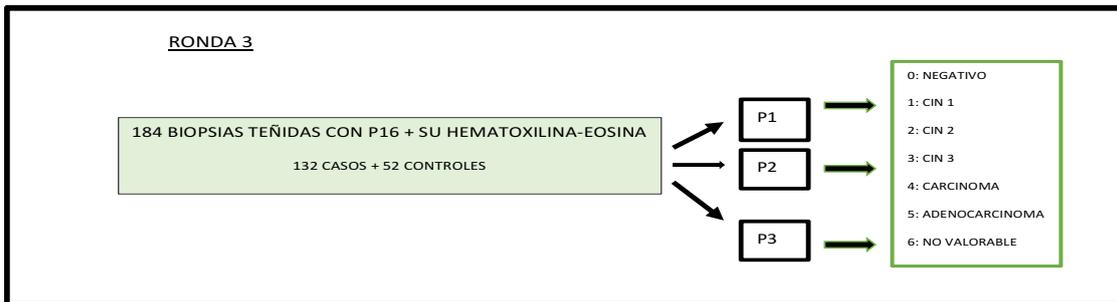


Figura 19: Esquema de la ronda 3.

Después del análisis de los resultados se compararon los diagnósticos realizados por cada uno de los patólogos estableciendo unos índices Kappa de concordancia interobservador (Ver las tablas a continuación) e intraobservador, al comparar los diagnósticos hechos por cada patólogo sólo con HE y con HE más p16 (ver las tablas en el Anexo 6).

Tablas de concordancia interobservador, utilizando HE y p16

- **Concordancia entre Patólogo 1 y Patólogo 2**

			HE p16 P2					Total	
			0	1	2	3	6		
HE p16 P1	0	Count	0	3	1	0	0	4	
		% within HE p16 P2	0.0%	5.3%	1.2%	0.0%	0.0%	2.2%	
	1	Count	12	44	3	0	0	59	
		% within HE p16 P2	100.0%	77.2%	3.5%	0.0%	0.0%	32.4%	
	2	Count	0	9	38	7	0	54	
		% within HE p16 P2	0.0%	15.8%	44.7%	26.9%	0.0%	29.7%	
	3	Count	0	1	43	19	0	63	
		% within HE p16 P2	0.0%	1.8%	50.6%	73.1%	0.0%	34.6%	
	6	Count	0	0	0	0	2	2	
		% within HE p16 P2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	1.1%	
	Total		Count	12	57	85	26	2	182
			% within HE p16 P2	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 15: En esta tabla observamos los resultados del patólogo 1 en las filas y los resultados del Patólogo 2 en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. Las casillas sombreadas representan el porcentaje de concordancia para cada una de las categorías diagnósticas. Las categorías diagnósticas están codificadas numéricamente 0-1-2-3-6. En este caso sólo se comparan 182 casos porque el patólogo 2 deja 2 casos sin valorar. Se consideran “pérdidas” y debemos eliminarlos para poder establecer las comparaciones correctamente.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.388	.048	8.714	.000
N of Valid Cases		182			

Tabla 16: Índice Kappa de concordancia para todos los diagnósticos emitidos con HE y p16 (182) entre el patólogo 1 y el patólogo 2. En este caso sólo se comparan 182 casos porque el patólogo 2 deja 2 casos sin valorar. Se consideran “pérdidas” y debemos eliminarlos para poder establecer las comparaciones correctamente.

- **Concordancia entre Patólogo 1 y Patólogo 3**

			HE p16 P3					Total
			0	1	2	3	6	
HE p16 P1	0	Count	4	0	0	0	0	4
		% within HE p16 P3	10.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%
	1	Count	34	25	0	0	0	59
		% within HE p16 P3	89.5%	29.8%	0.0%	0.0%	0.0%	32.1%
	2	Count	0	41	12	1	0	54
		% within HE p16 P3	0.0%	48.8%	26.1%	7.1%	0.0%	29.3%
	3	Count	0	18	34	13	0	65
		% within HE p16 P3	0.0%	21.4%	73.9%	92.9%	0.0%	35.3%
	6	Count	0	0	0	0	2	2
		% within HE p16 P3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0 %	1.1%
	Total	Count	38	84	46	14	2	184
		% within HE p16 P3	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %

Tabla 17: En esta tabla observamos los resultados del patólogo 1 en las filas y los resultados del patólogo 3 en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. Las casillas sombreadas representan el porcentaje de concordancia para cada una de las categorías diagnósticas. Las categorías diagnósticas están codificadas numéricamente 0-1-2-3--6.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.071	.042	1.872	.061
N of Valid Cases		184			

Tabla 18: Índice Kappa de concordancia para todos los diagnósticos emitidos con HE y p16 (184) entre el patólogo 1 y el patólogo 3.

- **Concordancia entre Patólogo 2 y Patólogo 3**

HE p16 P2 * HE p16 P3								
			HE p16 P3					Total
			0	1	2	3	6	
HE p16 P2	0	Count	11	1	0	0	0	12
		% within HE p16 P3	28.9%	1.2%	0.0%	0.0%	0.0%	6.6%
	1	Count	26	30	1	0	0	57
		% within HE p16 P3	68.4%	36.1%	2.2%	0.0%	0.0%	31.3%
	2	Count	1	46	34	4	0	85
		% within HE p16 P3	2.6%	55.4%	73.9%	30.8%	0.0%	46.7%
	3	Count	0	6	11	9	0	26
		% within HE p16 P3	0.0%	7.2%	23.9%	69.2%	0.0%	14.3%
	6	Count	0	0	0	0	2	2
		% within HE p16 P3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	1.1%
	Total	Count	38	83	46	13	2	182
		% within HE p16 P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 19: En esta tabla observamos los resultados del patólogo 2 en las filas y los resultados del patólogo 3 en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. Las casillas sombreadas representan el porcentaje de concordancia para cada una de las categorías diagnósticas. Las categorías diagnósticas están codificadas numéricamente 0-1-2-3--6.

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	262	.050	6.223	.000
N of Valid Cases		182			

Tabla 20: índice Kappa de concordancia para todos los diagnósticos emitidos con HE y p16 (182) entre el patólogo 2 y el patólogo 3.

7.2.4 RONDA 4: Selección de 50 biopsias al azar, sólo HE, para establecer el diagnóstico de Lesión de bajo grado (1) Lesión de alto grado (2) o negativa (0)

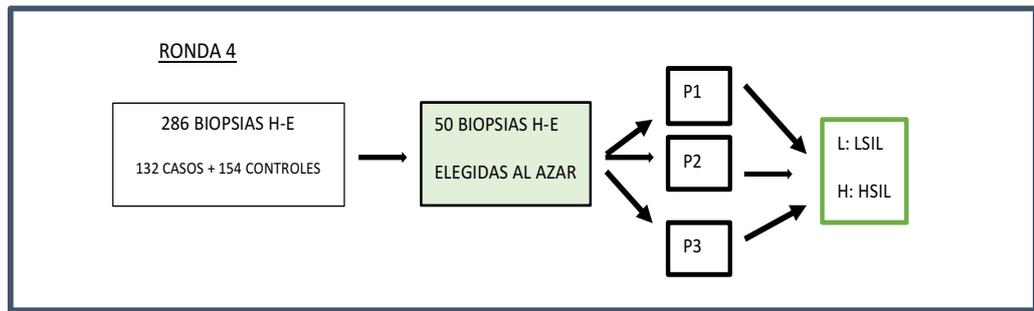


Figura 20: Esquema resumen de la Ronda 4.

- Se estudiaron 50 biopsias elegidas al azar del total de 286 para establecer un diagnóstico binario. (Ver tablas en anexo 7)
- Posteriormente se establecieron comparaciones entre los diagnósticos realizados por cada patólogo para poder obtener índices Kappa de concordancia (ver tablas de concordancia en Anexo 8. Tablas con índice Kappa a continuación)

Concordancia interobservador con la clasificación binaria

Patólogo 1 vs Patólogo 2

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.754	.094	5.350	.000
N of Valid Cases		50			

Tabla 21: índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (50) con HE utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 1 y el patólogo 2.

Patólogo 1 vs Patólogo 3

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.426	.118	3.236	.001
N of Valid Cases		50			

Tabla 22: índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (50) con HE utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 1 y el patólogo 3.

Patólogo 2 vs Patólogo 3

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.504	.111	3.892	.000
N of Valid Cases		50			

Tabla 23: índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (50) con HE utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 2 y el patólogo 3.

7.3 Recodificación de los diagnósticos

Para poder analizar la concordancia con la clasificación binaria en un mayor número de casos, siguiendo algunos ejemplos de la literatura, recodificamos los 286 diagnósticos iniciales hechos por los patólogos sólo con HE y también recodificamos los 184 diagnósticos hechos con HE y p16 como:

- 1: Aquellos casos diagnosticados como Negativo y CIN1 se recodifican como 1.
- 2: Aquellos casos diagnosticados como CIN2-CIN3-Carcinoma se recodifican como 2.
- 6: No Valorable

Esta recodificación se basa en separar los casos en función de la actitud clínica a tomar, es decir, separamos aquellos casos que sólo deben seguirse (Negativo y CIN 1) de aquellos que requieren tratamiento (CIN2-CIN3-Carcinoma).

Una vez hecha la recodificación, establecimos índices Kappa de concordancia entre patólogos (Las tablas con los porcentajes para cada una de las nuevas categorías diagnósticas las adjuntamos en Anexo 9)

A continuación presentamos las tablas con los índices Kappa de concordancia entre patólogos utilizando la clasificación binaria con HE sola y posteriormente añadiendo p16.

1. Concordancia Patólogo 1 vs Patólogo 2

a. Sólo con HE tras la recodificación.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.722	.039	12.912	.000
N of Valid Cases		286			

Tabla 24: Índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (286) con HE utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 1 y el patólogo 2.

b. Con HE y p16 tras la recodificación

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.840	.041	11.811	.000
N of Valid Cases		184			

Tabla 25: Índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (184) con HE y p16 utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 1 y el patólogo 2.

2. Concordancia Patólogo 1 vs Patólogo 3

a. con HE tras la recodificación

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.720	.040	12.718	.000
N of Valid Cases		286			

Tabla 26: Índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (286) con HE utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 2 y el patólogo 3.

b. con HE + p16 tras la recodificación

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.429	.051	7.385	.000
N of Valid Cases		184			

Tabla 27: Índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (184) con HE y p16 utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 1 y el patólogo 3.

3. Concordancia Patólogo 2 vs Patólogo 3

a. con HE tras la recodificación

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.654	.042	12.048	.000
N of Valid Cases		286			

Tabla 28: Índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (286) con HE utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 2 y el patólogo 3.

b. con HE + p16 tras la recodificación

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.457	.053	7.566	.000
N of Valid Cases		184			

Tabla 29: Índice Kappa de concordancia para los diagnósticos emitidos (184) con HE y p16 utilizando la clasificación binaria entre el patólogo 2 y el patólogo 3.

7.4 Estudio de las conizaciones posteriores a las biopsias de CIN2.

De los 132 CASOS de CIN2, tenemos conización en nuestro servicio de 109.

		Frecuencia	Porcentaje
Valid		23	17.4
	carcinoma	1	.8
	CIN1	11	8.3
	CIN2	30	22.7
	CIN3	60	45.5
	NEGATIVO	7	5.3
	Total	132	100.0

Tabla 30: En esta tabla analizamos el resultado anatomopatológico de las piezas de conización que siguieron a la biopsia. Vemos la frecuencia de cada una de las categorías y el porcentaje que representa cada una sobre el total.

7.5 Resultado de p16:

Tras la valoración de forma independiente por cada uno de los patólogos de las biopsias teñidas con p16, se decide un resultado de consenso, el que se repite en 2 ó 3 ocasiones.

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	33	25.0
	1	97	73.5
	6	2	1.5
	Total	132	100.0

Tabla 31: Muestra el resultado de consenso de p16. La frecuencia de cada una de las categorías y el porcentaje de cada una de ellas sobre el total.

7. 6 Resultado de las conizaciones estratificadas en función del valor de p16

			Resultado CONIZACIÓN						Total
			No Seguimiento	CARC.	CIN1	CIN2	CIN3	NEGATIVO	
p16 en Biopsia	0	Nº	4	0	8	5	11	5	33
		%	17.4%	0.0%	72.7%	16.7%	18.3%	71.4%	25.0%
	1	Nº	19	1	3	25	47	2	97
		%	82.6%	100.0%	27.3%	83.3%	78.3%	28.6%	73.5%
	6	Nº	0	0	0	0	2	0	2
		%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%	0.0%	1.5%
Total			23	1	11	30	60	7	132
			100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 32: En esta tabla reflejamos el resultado de las conizaciones estratificadas en función del valor de p16 de la biopsia previa.

8. ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS RESULTADOS

8.1 Características sociodemográficas

8.1.1 Edad

Uno de los primeros datos que recogimos de nuestras pacientes fue la edad al momento de realización de la biopsia, nuestras pacientes tiene un rango de edad que oscila entre 17 años la más joven y 68 años la más mayor. Nuestra serie tiene una edad media de **34 años**. Si estudiamos por separado las 132 pacientes “**CASOS**” la media de edad son **33,77 años** siendo la mayor de 68 años y de 19 años la más joven. Grandes series muestran que la edad media para el diagnóstico de lesiones precancerosas oscila entre los 25 y los 35 años.⁹ Estudios clásicos reflejan que el porcentaje de lesiones CIN 1 que remiten espontáneamente oscila entre el 60% y el 80%²³ según la serie, el 30% persisten, el 10% progresan a CIN3 y de éstos un 1% progresan a invasión. La probabilidad de remisión es menor a medida que aumenta la edad como también es menor la tasa de nuevas infecciones⁵³. Por tanto nuestra muestra se ajusta a la población de interés con respecto a la edad.

8.1.2 Tabaquismo

La infección por un VPH de alto riesgo se considera condición necesaria, pero no suficiente, del cáncer cervical. Existen una serie de cofactores de progresión, favorecedores de la persistencia. El primero, y de los más importantes, es el tabaco. El **tabaquismo** es el cofactor más importante de progresión, con un aumento de riesgo de hasta 3 veces frente a las no fumadoras¹⁶ De nuestra serie de pacientes, el **63,8%** eran fumadoras activas, frente a un 30,2% que referían no haber fumado nunca. Por tanto, nuestra serie concuerda también con lo que refleja la literatura, el 70% de las pacientes está o ha estado en contacto con el tabaco.

8.1.3. Anticoncepción Hormonal

Otro cofactor que ha demostrado tener importancia en la persistencia de la infección por VPH es el uso prolongado de anticonceptivos hormonales. El uso de anticonceptivos hormonales durante cinco años o más, incrementa hasta cuatro veces el riesgo de persistencia.¹⁶ De nuestra serie, el grupo mayoritario fue el que refería no utilizar ningún método anticonceptivo (44,8%) aunque el segundo grupo, fue el de las pacientes que utilizaban **anticoncepción hormonal (29,3%)**. La muestra presenta un comportamiento similar al de la población de esta edad en España. A diferencia de otros países el uso de la anticoncepción hormonal ha sido sustituido por el preservativo aunque de forma inconstante. Esto explica también el bajo uso de anticoncepción referido ya que muchas pacientes no consideran el preservativo como un método anticonceptivo.

8.1.4 Estado Inmunitario

El **estado Inmunitario** también es importante. Las pacientes inmunodeprimidas, debido a cualquier causa, están más predispuestas a la persistencia de la infección.⁵ En nuestra serie de pacientes, el grupo mayoritario refería tener un estado inmunitario sin alteraciones (91,4%), sólo contamos 5 pacientes VIH + y una en tratamiento crónico con corticoides lo que supone un **5,2%** de las pacientes.

8.2 Diagnóstico de las biopsias

8.2.1 Estudio de las biopsias con HE

- **Diagnóstico de las biopsias en el archivo**

Seleccionamos de forma retrospectiva un total de 286 biopsias (132 CASOS + 154 CONTROLES) para ser reanalizadas los patólogos. Estas biopsias ya habían sido diagnosticadas, y las pacientes tratadas en función de ese diagnóstico. Como no existen registros de incidencia de enfermedad preneoplásica, al tratarse de una enfermedad asintomática y no ser un cáncer propiamente dicho, los datos de incidencia que tenemos son estimativos.¹⁹ Por tanto a la hora de realizar nuestra serie, las proporciones son similares a las estimaciones existentes²⁴ aunque entre los casos estudiados hay, obviamente, un mayor número de biopsias con diagnóstico CIN2 (48,6%), puesto que el diagnóstico CIN2 es el punto de partida de nuestro estudio, y todos nuestros CASOS (132) son CIN2.

- **Revisión de casos**

Si analizamos la frecuencia de diagnósticos de cada uno de nuestros patólogos, veremos que tanto para el patólogo 1 como para el 3, su diagnóstico más frecuente es el de CIN1 representando un total de 45,5% para el patólogo 1 y un 39,9% para el patólogo 3. El diagnóstico más frecuente para el patólogo 2 fue de CIN2 (34,3%)

Tablas de concordancia

Para poder obtener diferentes índices de concordancia, hemos realizado múltiples comparaciones.

Primero hemos comparado los resultado del análisis de cada patólogo con los diagnósticos que tenían estas biopsias en el archivo (GOLD). Esta comparación me parece interesante, porque comparamos a cada uno de ellos con una misma serie.

Diagnóstico	PATÓLOGO 1	PATÓLOGO 2	PATÓLOGO 3	Galgano ⁵⁴	Klaes ³⁹
Negativo	45,5 %	63,6%	81,8%	86,5%	71%
CIN1	89,2%	68,6%	66,7%	61,9%	52%
CIN2	48,6%	71%	48,6%	47,6%	35%
CIN3	79,4%	35,3%	70,6%	75%	72%
KAPPA	0,502	0,465	0,415		0,6

Tabla 33 : En esta tabla recogemos el porcentaje de concordancia para cada categoría diagnóstica, de cada patólogo, comparado también con los resultados publicados en dos artículos de referencia. También incluimos el índice Kappa de concordancia total.

Si analizamos con más detalles los resultados, vemos que a la hora de analizar porcentajes de concordancia, el patólogo 1 y el patólogo 3 se aproximan a lo que recoge la literatura. La concordancia para diagnosticar CIN2 ronda el 35-45 % y se sitúa entre un 70-80% a la hora de diagnosticar CIN3^{39,53}

Los resultados del patólogo 2, se escapan un poco de lo esperado, puesto que su concordancia a la hora de diagnosticar CIN2 supera el 70%, en este caso, creemos que puede haber un sesgo, al ser conocedor de que el estudio versaba en torno al CIN2.

En todas las comparaciones, vamos a utilizar el índice Kappa de concordancia.

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Tabla 4 : Recordamos la tabla sobre la valoración del índice Kappa de concordancia.

En este caso vemos que los tres patólogos tiene un índice de concordancia entre 0,41 y 0,60 un índice de concordancia moderado.

Son buenos resultados, si los comparamos con los datos que refieren Bergeron, que encuentra que los índices K de concordancia oscilan entre 0,45 y 0,50, existiendo series anteriores donde la K no superaba el 0,2⁴⁴ En cambio, si lo comparamos con el 0,6 que nos da Klaes³⁹, nos puede parecer un resultado menos bueno, pero hay que tener en cuenta, que en su estudio se especifica, que este índice Kappa se obtiene mediante el análisis de las biopsias por “patólogos expertos” y en biopsias procedentes de conización. En nuestro caso, son patólogos generales, uno de ellos con “especial dedicación” a la patología ginecológica y analizando biopsias “punch” cosa que hace que la concordancia sea menor, porque las biopsias son más pequeñas. Según la bibliografía, los índices K pueden pasar de 0,49 en biopsia punch a 0,63 en piezas procedentes de conizaciones^{53,55}

Si comparamos los diagnósticos de cada patólogo con los demás, tenemos los siguientes resultados:

	P1 vs P2	P1 vs P3	P2 vs P3	Galgano ⁵⁴	Klaes ³⁹
Negativo	30,4%	17,4%	34,8%	86,5%	71%
CIN 1	87,8%	74,6%	59,6%	61,9%	52%
CIN 2	47%	52%	82,7%	47,6%	35%
CIN 3	69,6%	75,6%	33,3%	75%	72%
Kappa	0,43	0,41	0,41		0,6

Tabla 34: Resumen de resultados de porcentajes de concordancia e índice Kappa si comparamos a los patólogos entre sí valorando biopsias sólo con HE. Comparamos también con los resultados publicados. *(Estos resultados se recogen de las tablas de resultados presentadas en el apartado anterior)*

Esta tabla también refleja bastante bien lo esperado según la literatura, salvo las celdas sombreadas y con los números en negrita. En este caso, vemos que el patólogo 2 y el 3 coinciden en un porcentaje muy alto de CIN2 y menor de CIN3, esto se debe a que el patólogo 2 ha diagnosticado un número muy alto de CIN2, a expensas de bajar de categoría lesiones que el patólogo 3 ha considerado CIN3. Pero los índices K que es donde se mide la concordancia total, siguen estando por encima de 0,40 (concordancia moderada).

8.2.2 Interpretación de p16

Los 3 patólogos tuvieron que interpretar el p16 de los 132 casos sin la HE. Pasamos un documento explicativo (Ver Anexo 3) sobre como tenían que valorarlo, dándoles tres opciones, positivo, negativo o no valorable. Se estableció como valor definitivo de p16, el que resultaba de la mayor coincidencia de las tres lecturas: Si coincidían los 3 era obvio. Si había discrepancias, se elegía el que se repetía dos veces. En un solo caso se obtuvieron 3 valores diferentes. En este caso se solicitó una nueva lectura por el patólogo 1 y el patólogo 2 para obtener un diagnóstico de consenso.

Aunque la literatura releja diferentes maneras para valorar p16, algunos establecen una puntuación (*Score*) considerando unos valores intermedios si se observa tinción parcheada y focal.⁵³

En nuestro caso, para decidir cómo se valoraba p16, es decir qué criterios se utilizaban para considerar la tinción como positiva o negativa, se siguieron los criterios publicados por C. Bergeron⁴⁴ quien consideraba sólo positivos aquellos casos que muestran una tinción fuerte y difusa afectando a todo el espesor del epitelio, el resto de casos los considera negativos. Existe una publicación reciente de Liu y colaboradores, en la que se clasifican como positivas aquellas tinciones fuertes y difusas, como negativas aquellas con tinción focal y débil y después describe que existen toda una serie de casos “ambiguos” o no clasificables, porque no pueden encuadrarse en ninguna de estas dos categorías. En este estudio en el 70% de los casos ambiguos la determinación de VPH-AR fue negativa⁴⁶.

El porcentaje de positividad para cada patólogo es variable:

	Patólogo 1	Patólogo 2	Patólogo 3	Consenso
% Positividad	76,3%	76,6%	61,5%	74,6%

Tabla 35: Resumen del porcentaje de positividad de p16 según la interpretación de cada patólogo. La cuarta columna representa el porcentaje de positivos resultante tras establecer los valores de consenso.

Vemos que los porcentajes de positividad son bastante parecidos, aunque el patólogo 3 tiene un porcentaje de positividad notablemente inferior.

Los índices K de concordancia a la hora de interpretar p16 reportados en la literatura son variables, desde 0,73 reportado por Meserve³⁷, 0,89 de Bergeron⁴⁴

Nuestra concordancia para interpretar p16 como positivos es la siguiente:

	P1 vs P2	P1 vs P3	P2 vs P3	Meserve ³⁷	Galgano ³⁴	Bergeron ⁴⁴
Kappa	0,82	0,649	0,625	0,73	0,87	0,89

Tabla 36: En esta tabla resumimos el índice Kappa de concordancia entre los diferentes patólogos a la hora de interpretar las biopsias de p16 como positivas, mostrando también datos publicados en la literatura.

Al comparar estos resultados, llama la atención el índice Kappa de las dos comparaciones que implican al patólogo 3. Recordemos que, como se muestra en la tabla 34 de este mismo apartado, era el patólogo que diagnosticaba menos positivos. Esto se puede explicar, si tenemos en cuenta que, a pesar de que la mayoría de artículos explican la facilidad de interpretación de p16, encontramos diferentes criterios de positividad según los artículos que revisemos, no existen unos criterios de

positividad de consenso. En el artículo de Bergeron, se les hace un entrenamiento de treinta minutos a los patólogos que debían interpretar el p16.⁴⁴ Nosotros pasamos a cada uno de nuestros tres patólogos, una hoja explicativa de cómo debían interpretarlo, sólo como positivo o negativo, eliminando valores intermedios, explicando que sólo debían considerar positivas aquellas biopsias que mostraban una tinción intensa y difusa afectando a todo el espesor del epitelio.

Estas diferencias pueden deberse, a la dificultad para interpretar la positividad, o al criterio diferente del patólogo 3, ya que es notablemente diferente al de los otros dos. Como recoge la literatura, algunos autores se conforman con una positividad intensa y difusa sólo de un 5% de la celularidad, mientras que otros quieren ver positividad en más del 50% para considerarlo positivo⁵¹

Por tanto, esto pone de manifiesto, que la positividad o negatividad de p16, también es una cuestión de interpretación. No es una prueba tan objetiva y tan “fácilmente” interpretable y hasta el día hoy, no existen ni guías ni valores de consenso.

8.2.3 Estudio de las biopsias con HE junto con su p16

En esta tercera ronda se revisan un total de 184 biopsias. Este número lo obtenemos de seleccionar las 132 biopsias correspondientes a los "CASOS" mezcladas con un grupo aleatorio de 52 biopsias más seleccionadas de entre las recientes, CONTROLES.

Si analizamos las frecuencias diagnósticas para cada una de las categorías diagnósticas de cada uno de los patólogos, vemos que el Patólogo 1 diagnostica una mayoría de CIN3 (35,3%), el patólogo 2 una mayoría de CIN2 (46,7%) y el patólogo 3 una mayoría de CIN 1 (45,7%).

Si estudiamos el porcentaje de diagnósticos de alto grado (CIN2 + CIN3) tras la utilización de p16 queda de la siguiente manera:

Patólogo 1: 64,6%

Patólogo 2: 61 %

Patólogo 3: 32,6%

Vemos que el patólogo 3 considera la mitad de las biopsias de alto grado, que los patólogos 1 y 2 tras la interpretación de p16. Esto está acorde con su menor interpretación de positividad para p16. Como él ha considerado muchos menos p16 positivos, también considerará muchas menos biopsias de alto grado.

Estas diferencias afectaran de manera notable a la concordancia en la interpretación de las biopsias.

	P1 vs P2	P1 vs P3	P2 vs P3	Klaes ³⁹
NEGATIVAS	0%	10,5%	28,9%	94%
CIN 1	77,2%	29,8%	36,1%	91%
CIN 2	44,7%	26,1%	73,9%	100%
CIN 3	73,1%	92,9%	69,2%	99%
KAPPA	0,38	0,07	0,26	

Tabla 37: Comparación de los porcentajes de concordancia entre patólogos estratificados por categorías, con su índice Kappa total, incluyendo un valor de referencia, tras la interpretación de las biopsias junto con su p16.

Si analizamos estos datos, vemos que los porcentajes de concordancia son muy variables, y muy inferiores a los reportados en la literatura, y los índices Kappa son muy bajos, muy inferiores a lo esperado, y muy inferiores a los que obtuvimos en el análisis sólo con hematoxilina-eosina.

	P1-P2 HE	P1P2 P16	P1P3HE	P1P3P16	P2P3HE	P2P3P16	Bergeron ⁴⁴ HE	Bergeron ⁴⁴ HEP16
K	0,43	0,38	0,41	0,07	0,41	0,26	0,566	0,749

Tabla 38: En esta tabla podemos ver un resumen de los índices kappa obtenidos en cada serie comparados con la literatura. Los sombreados en naranja recogen la concordancia a la hora de interpretar las biopsias entre el patólogo 1 y el 2, primero sólo con HE (0,43) y después con HE y p16 (0,38).

Lo mismo analizamos para las comparaciones entre patólogo 1 y 3 (sombreado en verde) y para las comparaciones entre el patólogo 2 y el patólogo 3 (sombreado en amarillo).

Comparando cada pareja, sombreadas del mismo color, vemos que cuando les damos a los patólogos el p16, en todos los casos la concordancia empeora en todos los casos, y de manera más notable en las comparaciones que implican al patólogo 3. En cambio, en los datos reportados en la literatura la concordancia mejora mucho con p16. En la tabla 38 vemos los datos aportados por la Dra Bergeron.⁴⁴

Si estudiamos otras series, como la de Meserve, por ejemplo, aunque la mejoría no es tan notable, también mejora, pasando de 0,67 sin p16 a 0,69 cuando se añade esta tinción adicional.³⁷

También hemos analizado la concordancia intraobservador tras la realización de p16, es decir, comparar los diagnósticos que hizo cada patólogo, primero sólo con Hematoxilina y después los que hizo tras la valoración de p16. Si analizamos los tres índices Kappa que hemos obtenido vemos lo siguiente:

Índice Kappa:

- Patólogo 1: 0,456
- Patólogo 2: 0,592
- Patólogo 3: 0,323

Vemos cómo los patólogos 1 y 2 son bastante concordantes, mientras que el patólogo 3 tiene un índice Kappa consigo mismo de 0,323 (se considera débil). Recordemos que fue el patólogo con menor índice de positividad.

Llegados a este punto, nos planteamos a qué pueden deberse estas diferencias y por qué nuestros resultados son tan diferentes a los publicados en la literatura, ya que en nuestro estudio añadir p16 a la HE hace que empeoren los índices de concordancia en todos los casos.

Una de las posibles causas, es que p16 haya hecho de **factor de confusión**, sobre todo para el patólogo 3. Nosotros lo hemos proporcionado indiscriminadamente para todas las biopsias, independiente del diagnóstico de las mismas.

Este procedimiento no está recomendado, tanto el estudio LAST⁴¹ como otras publicaciones, recomiendan sólo realizarlo en unos casos concretos que son los siguientes:

- Duda entre negativo y CIN 2 – 3
- Diagnóstico CIN 2
- Desacuerdo entre patólogos
- No de rutina en Negativo, CIN1 o CIN 3

Estas recomendaciones son reforzadas en series posteriores, ya que realizar p16 indiscriminadamente, puede llevar a sobrediagnósticos y sobretratamientos⁵¹.

Además en nuestro caso, hemos proporcionado las laminillas teñidas con p16 sin ninguna formación, sólo con la información por escrito sobre qué patrón de tinción considerar positivo y qué patrón de tinción considerar negativo, y los patólogos 2 y 3 no tienen experiencia en su utilización.

Por otro lado, analizando más profundamente los diferentes estudios publicados que hemos ido comentando, vemos que una de las series más importantes, la de Bergeron, parte de unas biopsias diagnosticadas siguiendo la categoría CIN (CIN 1 – CIN 2 – CIN 3) como es nuestro caso, pero a la hora de establecer los datos de concordancia, apoyándose en que el manejo de las pacientes es el mismo para las pacientes con CIN 2 y CIN 3, las agrupa en una misma categoría – HSIL- y las biopsias diagnosticadas de CIN1, como no se debe intervenir ya que el 80% de las mismas regresan, las agrupa con las biopsias negativas y al grupo resultante lo llama LSIL. Con esta nueva clasificación establece los índices Kappa de concordancia, que ya hemos presentado anteriormente (ver k de Bergeron et al en tabla 38).⁴⁴

Meserve también analiza la concordancia en los diagnósticos tras la p16 en HSIL, agrupando bajo esta categoría las biopsias CIN2+³⁷.

Horn y colegas, también publican una serie, en la que empiezan a analizar las concordancias por pares de patólogos con la clasificación CIN, para acabar analizando los datos con la clasificación binaria, que resulta más consistente.⁵⁴

En este contexto, decidimos realizar otro análisis aplicando el mismo sistema de codificación que se aplica en los artículos referidos anteriormente. Así podremos establecer unos nuevos índices de concordancia. Recodificamos las biopsias, llamando LSIL a lo diagnosticado como Normal o CIN 1 y como HSIL a lo diagnosticado como CIN 2 y CIN 3.

Con esta recodificación, volvemos a establecer índices de concordancia entre los diferentes patólogos sólo con hematoxilina, y después con HE y p16.

	P1-P2 HE	P1-P2 P16	P1-P3 HE	P1-P3 P16	P2-P3 HE	P2-P3 P16	BERGERON HE ⁴⁴	BERGERON P16 ⁴⁴
K	0,722	0,840	0,720	0,429	0,654	0,457	0,566	0,749

Tabla 39: Resumen de los resultados obtenidos tras la reclasificación de las biopsias siguiendo una clasificación binaria en sólo dos categorías, agrupadas por parejas y comparados con la literatura. Se compara tanto la K de la valoración con HE y después con HE +p16.

Analizando estos datos en profundidad, lo primero que observamos es la mejora de la concordancia diagnóstica entre patólogos sólo con HE si se utiliza la clasificación binaria.

	P1P2 CIN	P1P2 REC*	P1P3CIN	P1P3REC	P2P3CIN	P2P3REC
KAPPA	0,43	0,722	0,41	0,720	0,41	0,654

Tabla 40: Resumen de los índices Kappa de concordancia entre las diferentes parejas de patólogos sólo con HE utilizando la clasificación clásica (CIN) y con los mismos casos recodificando los diagnósticos. (*REC=Resultados recodificados)

Al tener sólo dos categorías diagnósticas, los resultados son mucho más reproducibles. Esta aseveración, ya se puede encontrar en publicaciones de principio de la década de

los 90, en las que ya se observan las discrepancias y las bajas concordancias diagnósticas en la clasificación en tres categorías, y donde ya se empieza a sugerir una clasificación binaria, apoyándose en que quizá el CIN 1 no es una entidad “realmente” preneoplásica, lo llaman “CIN borderline”, que sólo requiere seguimiento, mientras que el CIN2 y el CIN3 son los que verdaderamente se tratan y tienen verdadero potencial de persistencia y progresión. En este momento eran estudios preliminares, buscando homogenizar nomenclatura y facilitar manejo, aquí sin apoyarse en ninguna inmunohistoquímica³³.

De ello se deduce que para los patólogos resulta más sencillo optar entre dos alternativas que introducir una fase intermedia de diagnóstico para lo que no existen criterios precisos de clasificación.

Por tanto, si pedimos a los patólogos que analicen biopsias y las clasifiquen en alto y bajo grado, la concordancia va a ser mejor. Intuyendo esto, antes de la recodificación de todas las biopsias, les pasamos una selección aleatoria de 50 biopsias del pool de las 286, para que establecieran un diagnóstico de alto o bajo grado, y aunque la muestra era pequeña (50 biopsias) ya vimos que la concordancia era mucho mejor, sólo con Hematoxilina Eosina.

Las k que tuvimos para esta ronda diagnóstica (la cuarta ronda), las mostramos a continuación:

- Patólogo 1 vs patólogo 2: 0,754 (0,43)
- Patólogo 1 vs patólogo 3: 0,426 (0,41)
- Patólogo 2 vs patólogo 3: 0,504 (0,41)

En los tres casos mejora, si lo comparamos con los resultados obtenidos con la clasificación CIN – los vuelvo a mostrar entre paréntesis-

Por tanto, analizando estos resultados y los reflejados en la tabla 38, podemos deducir, que los patólogos coinciden más si tienen que interpretar las biopsias como alto y bajo grado, que como CIN 1 – CIN 2 – CIN 3.

Si volvemos a la tabla 39, la concordancia entre el patólogo 1 y el 2 mejora al añadir p16. Pasamos de una Kappa de 0,722 a una de 0,84. Este caso refleja claramente lo reportado en la literatura.

En las comparaciones que implican al patólogo 3 (*subrayados en morado*), tanto en la comparación con el patólogo 1 como en la comparación con el patólogo 2, con el uso de p16, la concordancia empeora con el uso de p16 (los índices kappa tras el uso de p16 son más bajos). Aunque si bien la comparación sólo con HE mejora con la recodificación, no conseguimos que la concordancia mejore al añadir p16. Por tanto, p16 no ayuda a mejorar la concordancia cuando las comparaciones implican al patólogo 3.

8.3 Análisis de las conizaciones

Si revisamos la tabla de la conización posterior a la biopsia, los datos que obtenemos son los siguientes:

			Resultado CONIZACIÓN					Total	
			No Seguimiento	CARC.	CIN1	CIN2	CIN3		NEGATIVO
p16 en Biopsia	0	Nº	4	0	8	5	11	5	33
		%	17.4%	0.0%	72.7%	16.7%	18.3%	71.4%	25.0%
	1	Nº	19	1	3	25	47	2	97
		%	82.6%	100.0%	27.3%	83.3%	78.3%	28.6%	73.5%
	6	Nº	0	0	0	0	2	0	2
		%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%	0.0%	1.5%
Total			23	1	11	30	60	7	132
			100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 32: Resultado de las conizaciones que siguen a la biopsia de CIN2 estratificadas en función del valor de p16 de la misma. Sombreado en verde encontramos los resultados esperables y en rojo los que van en contra de lo esperado.

De las 132 biopsias **“CASOS”** CIN 2 tenemos estudio anatomopatológico posterior en nuestro laboratorio de 109. Hay 23 biopsias (reflejadas en la columna “No seguimiento” de la tabla) que aunque se le ha hecho la p16 y se ha interpretado, no tienen seguimiento.

De estas 109 conizaciones, 78 tienen la biopsia previa p16 positiva, y de estas 78 con la p16 previa positiva, 72 van seguidas de una conización con lesión de alto grado (25 CIN2 y 47 CIN3), y 1 con diagnóstico de carcinoma invasor. Esto supone un 93,58%.

De las 5 conizaciones restantes, con biopsia previa p16 positiva, nos encontramos con 3 CIN1 y 2 conos negativos.

De las 109 biopsias CIN2 con cono posterior, 29 fueron p16 negativas y de éstas 29 p16 negativas, 13 van seguidas de una conización Negativa o con lesión de bajo grado, (CIN 1) lo que supone 44,8%. Las 16 restantes van seguidas de una conización CIN2 (5) o CIN3 (11), lo que representa un 55,18%.

A modo de conclusión podemos extrapolar, que una p16 positiva en una biopsia diagnosticada como CIN2+ muy probablemente irá seguida de una lesión de alto grado en la conización, pero una biopsia que en la HE parece un CIN2, aunque tenga p16 negativa, existe una probabilidad no despreciable, de que vaya seguida de una lesión de alto grado. Si bien es verdad que nuestra *n* es pequeña y que las diferencias entre los dos grupos, cuando hablamos de biopsias p16 negativas, no son significativas.

En nuestro trabajo hemos analizado las conizaciones realizadas a los dos meses de la biopsia. Como refleja la literatura, estas lesiones de alto grado –CIN2- p16 negativas, son las que tendrán una mayor probabilidad de regresar con el tiempo, por tanto serían tributarias de seguimiento.²³

Según nuestros datos, tenemos una p16 con:

Sensibilidad: $73/91=0,80$ (80%)

Especificidad: $13/18=0,72$ (72%)

VPP: $73/78= 0,93$ (93%)

VPN: $13/29= 0,44$ (44%)

Si comparamos estos datos con los reportados en la literatura vemos que Galgano reporta datos de sensibilidad y especificidad para CIN2+ con p16 positivo de 86,7% y 82,8% respectivamente, y Zhang de 99 % y 95%^{53,26}.

De esta tabla lo que podemos extrapolar, es la sensibilidad y el VPP de p16 para detectar CIN2+ son muy buenos, como prueba de Triaje, no como prueba de cribado.

La probabilidad de que una paciente con p16 positiva tenga una lesión de alto grado es alta. Nos ayudaría a seleccionar aquellas pacientes con HE dudosa.

Pero al tener un VPN más bajo debemos ir con cautela a la hora de interpretar una lesión como negativa sólo en base a p16.

Por tanto el análisis morfológico mantiene su carácter dominante y la tinción con p16 u otros, deben considerarse técnicas complementarias.

9. DISCUSIÓN

El diagnóstico anatomopatológico de las lesiones intraepiteliales de cérvix ha planteado, desde siempre, la dificultad de clasificación de los grados intermedios, mostrando unos datos muy bajos de concordancia entre patólogos para el diagnóstico de los mismos. Ello puede deberse a que, históricamente, los criterios de clasificación de las lesiones, se han basado en criterios morfológicos arbitrarios, sujetos a la interpretación subjetiva de cada patólogo. En las clasificaciones clásicas, no se tenía en cuenta la historia natural de la enfermedad.

La opción por una clasificación binaria: SIL de alto o bajo grado, pretende establecer la clasificación de las lesiones basándose en lo que ya se conoce de la biología de la infección por el VPH-AR, es decir, separar las lesiones en función de su potencial de malignización:

- Lesiones de bajo grado (LSIL): que representan las lesiones transitorias que sólo deben seguirse;
- Lesiones de alto grado (HSIL) con verdadero potencial de malignización.

Esta clasificación obliga al patólogo a tomar partido siempre, aunque se sabe de la ausencia de unos criterios morfológicos claros de clasificación. De este modo se facilita la toma de decisiones clínicas y se separan aquellos casos en los que se espera mayoritariamente una remisión espontánea, de aquellos que se beneficiarían de una conducta intervencionista para evitar su evolución a etapas de mayor gravedad.

Sin embargo, la clasificación binaria por ella misma no obvia la persistencia de patrones que ponen a prueba la capacidad de decisión del patólogo. En este contexto la información adicional ofrecida por una inmunohistoquímica como p16, vinculada a la reacción celular frente a la infección por VPH, se percibía como una ayuda al patólogo para resolver estos casos.

La muestra estudiada en este trabajo de tesis refleja, desde el punto de vista epidemiológico, la población del país que presenta las lesiones cervicales que son

objeto de estudio y las muestras se han escogido de forma consecutiva sin que existan riesgos de sesgo.

Se han añadido controles contemporáneos para evitar sesgos de los patólogos lectores.

Una de las fortalezas del estudio ha sido la colaboración de tres patólogos dispuestos a lecturas sucesivas, pero en condiciones distintas, de muestras cegadas. Ello refleja un alto grado de honestidad profesional y de colaboración. Sin embargo, es también una de sus limitaciones. La discordancia, casi sistemática, entre uno de los lectores con respecto a los otros dos pone de manifiesto algo presente también en el día a día de la práctica clínica: la prevalencia de criterios individuales sobre los objetivos en el diagnóstico anatomopatológico de algunos patrones complejos.

En este contexto la tinción con p16 ha mostrado capacidad de mejorar la concordancia entre patólogos que ya tenían previamente el mayor grado de concordancia pero no ha corregido la discordancia que el tercer lector presentaba con la tinción clásica de HE.

No resulta extraño, teniendo en cuenta que esta discordancia del tercer lector, aparece también en la lectura limitada a las muestras teñidas con p16 a pesar de los estrictos criterios de lectura establecidos. Por tanto, la contribución de información adicional no compensa la subjetividad de la lectura en situaciones inciertas.

Otra limitación del estudio es el reducido tamaño de la muestra de pacientes conizadas, y el corto periodo de seguimiento, para poder valorar adecuadamente la capacidad de predicción adicional que representa la tinción con p16. También en este punto la práctica clínica está sujeta a elementos de decisión ajenos al diagnóstico patológico y ello limita la evaluación del valor de esta información aportada "a posteriori".

Debe también señalarse que cuando, siguiendo la metodología de Bergeron, se reagrupan los diagnósticos CIN con criterios binarios, la contribución potencial de p16

aumenta y con ello se refuerza la idea de que, en los casos dudosos y con los criterios establecidos, esta tinción habría contribuido positivamente a la bondad de la decisión en la clasificación binaria.

10. CONCLUSIONES

1. La proteína p16 puede ser útil como complemento al diagnóstico histológico con HE, en aquellos casos de duda, en los que el patólogo carezca de elementos para establecer un diagnóstico de alto o bajo grado.
2. El tamaño de nuestra muestra no nos permite afirmar que p16 es un marcador de progresión. Necesitamos series más largas con un mayor tiempo de seguimiento.
3. Se debe limitar la tinción complementaria con p16 a casos seleccionados y tras una formación específica. Es necesario establecer unos estándares de interpretación consensuados de p16.
4. La clasificación binaria per se, mejora mucho la concordancia entre patólogos.

Por lo tanto, podemos concluir que la valoración de la sobreexpresión de la proteína p16 en casos seleccionados mejorará la concordancia entre patólogos entrenados para la interpretación de esta tinción. Todavía es pronto para afirmar que pueda predecir la capacidad evolutiva de las lesiones.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Zur Hausen H.: Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974;13:650-6
- 2 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al.: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189: 12-9
- 3 Papanicolaou GN.: A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1946; 51:316-28
- 4 Bosch FX, Robles C, Díaz M, Arbyn M, Baussano I, Clavel C et al.: HPV-FASTER: broadening the scope for prevention of HPV-related cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:119-32
- 5 Muñoz N, Bosch X, San Jose S, Herrero R, Meijer, JLMDelgado. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
- 6 Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers.* 2007; 23: 297-313
- 7 Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M et al.: Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology.* 2018; 516:86-101
- 8 zur Hausen H.: Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature.* 2002; 2: 342-350
- 9 Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S.: Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007;370:890-907
- 10 Cuzick J.: Molecular triage as a part of cervical screening. Ponencia en Eurogin 2017. Ámsterdam

- 11 Bergeron C, Ronco G, Reusenbach M, Wentzense N, Arbyn M, Stoler M et al.: The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer*. 2015;136:2741-51
- 12 Levine A, Finlay C, Hinds P.: P53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell*. 2004. S116: S67-S69
- 13 Munger K, Howley PM.: Human Papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*. 2002. 89: 213-228
- 14 Gravitt PE, Winer RL.: Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*. 2017. 9 (10). pii: E267. doi: 10.3390/v9100267
- 15 Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA et al.: Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13:78-88
- 16 Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N.: Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research*. 2002. 89: 191-199
- 17 de Sanjosé S, Cortés J, Méndez C, Puig-Tintoré L, Torné A, Roura E et al: Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population. Results from the AFRODITA survey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008. 140: 234-240.
- 18 <http://ci5.iarc.fr/CI5-XI/Default.aspx>. Acceso 15.02.18
- 19 Quinn M, Babb O, Jones J, Allen E.: Effect of screening on incidence of and mortality from cancer de cérvix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ* 1999. 318: 904-8.
- 20 Makkonen P, Heinävaara S, Sarkeala T, Anttila A: Impact of organized and opportunistic Pap testing on the risk of cervical cancer in young women - A case-control study from Finland. *Gynecol Oncol*. 2017; 147: 601-606
- 21 Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M et al.: Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014; 383:524-32)

- 22 Torné A, del Pino M, Cusidó M, Alameda F, Andía A, Castellsagué X et al.: Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. Prog Obstet Ginecol. 2014; 57 (Supl. 1):1-53
- 23 Miralpeix E, Genovés J, Solé J, Mancebo G, Lloveras B, Bellosillo B, Alameda F, Carreras R. Usefulness of p16^{INK} staining for managing histological high-grade squamous intraepithelial cervical lesions. Mod Pathol 2016; 00: 1-7.
- 24 http://www.aepcc.org/wp-content/uploads/2016/01/AEPCC_revista02.pdf. Acceso 24-02018
- 25 Zhang Q, Li W, Kanis MJ, Qi G, Li M, Yang X et al. : Oncologic and obstetrical outcomes with fertility-sparing treatment of cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2017; 8:46580-46592
- 26 Kyrgiou M, Athanasiou A, Kalliala IEJ, Paraskevaïdi M, Mitra A, Martin-Hirsch PP et al.: Obstetric outcomes after conservative treatment for cervical intraepithelial lesions and early invasive disease. Cochrane Database Syst Rev. 2017 Nov 2;11:CD012847. doi: 10.1002/14651858.CD012847
- 27 Marra F, Cloutier K, Oteng B, Marra C, Ogilvie G.: Effectiveness and cost effectiveness of human papillomavirus vaccine: a systematic review. Pharmacoeconomics. 2009; 27:127-47
- 28 Anttila A, Ronco G, Working Group on the Registration and Monitoring of Cervical Cancer Screening Programmes in the European Union; within the European Network for Information on Cancer (EUNICE).: Description of the national situation of the cervical cancer screening in the member states of the European Union. Eur J Cancer. 2009. 45:2685-2708
- 29 Cirisano FD.: Management of pre-invasive disease of the cervix. Semin Surg Oncol. 1999; 16:222-7
- 30 Govan AD, Haines RM, Langley FA, Taylor CW, Woodcock AS.: The histology and cytology of changes in the epithelium of the cervix uteri. J Clin Pathol. 1969;22:383-95

- 31 Buckley CH, Butler, EB, Fox H.: Cervical Intreepithelial Neoplasia. *J. Clin. Pathol.* 1982; 35:1-13
- 32 Richart RM.: Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973; 8:301-28.
- 33 Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DMD, Gradwell E et al.: Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN) intra and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology.* 1990. 16: 371-376
- 34 Solomon D.: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: developed and approved at the National Cancer Institute Workshop in Bethesda, Maryland, December 12-13, 1988. *Hum Pathol.* 1990; 21:704-8.
- 35 Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. for the Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop.: The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287:2114-9.
- 36 McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, Date A, Caughley LM et al.: Inter and Intraobserver variation in the histopathological reporting of cervical squamous intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998; 105:206-10.
- 37 Meserve E, Berlin M, Mori T, Krum R, Morgan T. Reducing Misclassification Bias in Cervical Dysplasi Risk Factor Analysis with p16_BAased Diagnoses. *Journal of Lower Genital Tract Disease.* 2014; 18: 266-272.
- 38 Reusenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, von Knebel M, Arbyn M. P16 Immunohistochemistry in cervical Biopsy Specimens. A systematic Review and Meta-Analysis of the Interobserver Agreement. *Am J Clin Pathol.* 2014; 142: 767-772.
- 39 Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman R, Schimdt D, Stoler M, von Knebel M. P16 Immunohistochemistry Improves Interobserver Agreement in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26: 1389-1399.

- 40 Waxman AG, Chelmow, Darragh T, Lawson H, Mosciki A. Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Obstet Gynecol.* 2012; 120: 1465-71.
- 41 Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD et al.: The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendation From the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Journal of Lower Genital Tract Disease.* 2012 ; 3: 205-242
- 42 Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M et al.: 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2012;120:166-72.
- 43 Silva DC, Gonçalves AK, Cobucci RN, Mendonça RC, Lima PH, Junior GC. Immunohistochemical expression of p16, ki67 and p53 in cervical lesions- A systematic review. *Pathol Res Pract.* 2017; 213: 723-729.
- 44 Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk M, Keller T, Ridder R. Conjunctive p16 Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133:395-406
- 45 Umphress B, Sanchez B, Paintal A, Nayar R, Maniar K. Utility of CK7 vs p16 as a Prognostic Biomarker in CIN2. *Am J Surg Pathol* 2018; 42: 479-484.
- 46 Liu Y, Alqatari M, Sultan K, Ye F, Gao D, Sigel K et al. Using p16 Immunohistochemistry to Classify Morphologic Cervical Intraepithelial Neoplasia 2: Correlation of Ambiguous Staining Patterns with HPV Subtypes and Clinical Outcome. *Hum Pathol.* 2017; 66: 144-151.
- 47 Ordi J, García S, del Pino M p16INK4a identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol.* 2009;28:90-97
- 48 Shain A, Kwok S, Folkins A, Kong C. Utility of p16 Immunohistochemistry in Evaluating Negative Cervical Biopsies Following High-risk Pap Test Results. *Ame J Surg Pathol.* 2018; 42: 69-75.

- 49 Wright T. CERTAIN study. Ponencia. IPV Society. Ciudad del Cabo 2017
- 50 Sagasta A, Castillo P, Saco A, Torné A, Esteve R, Marimon L et al.: p16 staining has limited value in predicting the outcome of histological low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Mod Pathol.* 2016; 29:51-9
- 51 Clark JL, Lu D, Kalir T, Liu Y.: Overdiagnosis of HSIL on cervical biopsy: errors in p16 immunohistochemistry implementation. *Hum Pathol.* 2016; 55:51-6
- 52 Altman DG. *Practical statistics for medical research.* New York: Chapman and Hall; 1991.
- 53 Discacciati MG, De Souza CA, d'Otavianno MG, Angelo-Andrade LA, Westin MC, Rabelo-Santos SH et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 155: 204-208.
- 54 Galgano M, Castle P, Atkins K, Brix W, Nassau S, Stoler M. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34: 1077-1087
- 55 Horn et al. Immunostaining for p16 used as a Conjunctive tool Improves Interobserver Agreement of the Histologic Diagnosis of Cervical intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2008. 32 (4): 502-512
- 56 Reusenbach M, Wentzensen N, Dijkstra M, von Knebel M, Arbyn M. P16 Immunohistochemistry in Cervical Biopsy Specimens. A systematic Review and Meta-Analysis of the Interobserver Agreement. *Am J Clin Pathol.* 2014; 142: 767-772

12. ANEXOS

Anexo 1

Presentamos las frecuencias de resultados para cada categoría diagnóstica de cada uno de los patólogos al valorar las 286 laminillas sólo con HE. Las categorías diagnósticas se clasifican de la siguiente manera:

0: NEGATIVO

1: CIN 1

2: CIN 2

3: CIN 3

4: CARCINOMA

6: NO VALORABLE

Patólogo 1

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
0	8	2.8	2.8
1	130	45.5	48.3
2	80	28.0	76.2
3	65	22.7	99.0
6	3	1.0	100.0
Total	286	100.0	

Tabla 40: En esta tabla mostramos los resultados del Patólogo 1. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera el porcentaje con respecto al total de cada categoría y en la

cuarte el porcentaje acumulado. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 1 diagnostica 130 CIN 1, lo que representa un 45,5% de sus diagnósticos.

Patólogo 2

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
0	23	8.0	8.0
1	98	34.3	42.3
2	132	46.2	88.5
3	23	8.0	96.5
4	3	1.0	97.6
6	7	2.4	100.0
Total	286	100.0	

Tabla 41: En esta tabla mostramos los resultados del Patólogo 2. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera el porcentaje con respecto al total de cada categoría y en la cuarta el porcentaje acumulado. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 2 diagnostica 98 CIN 1, lo que representa un 34,3% de sus diagnósticos.

Patólogo 3

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
NSNC	2	.7	.7
0	46	16.1	16.8
1	114	39.9	56.6
2	75	26.2	82.9
3	45	15.7	98.6
4	1	.3	99.0
6	3	1.0	100.0
Total	286	100.0	

Tabla 42: En esta tabla mostramos los resultados del Patólogo 3. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera el porcentaje con respecto al total de cada categoría y en la cuarta el porcentaje acumulado. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 3 diagnostica 114 CIN 1, lo que representa un 39,9% de sus diagnósticos.

Anexo 2**Comparaciones entre cada uno de los patólogos y el diagnóstico del archivo (GOLD)****Patólogo 1 vs Gold:**

		Gold				Total		
		0=neg	CIN1	CIN2	CIN3			
Patólogo1	0	Count	5	3	0	0	8	
		% within Gold	45.5%	2.9%	0.0%	0.0%	2.8%	
	1	Count	6	91	32	1	130	
		% within Gold	54.5%	89.2%	23.2%	2.9%	45.6%	
	2	Count	0	7	67	6	80	
		% within Gold	0.0%	6.9%	48.6%	17.6%	28.1%	
	3	Count	0	1	36	27	64	
		% within Gold	0.0%	1.0%	26.1%	79.4%	22.5%	
	6	Count	0	0	3	0	3	
		% within Gold	0.0%	0.0%	2.2%	0.0%	1.1%	
	Total		Count	11	102	138	34	285
			% within Gold	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 43: En esta tabla se muestra los porcentajes de concordancia entre el patólogo 1 (filas) y los diagnósticos de las biopsias en el archivo (Gold) mostrados en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. La diagonal sombreada en calabaza, muestra los porcentajes concordantes.

Índice Kappa de concordancia

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	.502	.039	13.208	.000
N of Valid Cases	286			

Tabla 44: Esta tabla muestra el índice Kappa de concordancia al comparar los diagnósticos establecidos por el patólogo 1 y los que tenemos en el archivo (GOLD)

Patólogo 2 vs Gold

		Gold				Total		
		0=neg	CIN1	CIN2	CIN3			
Patólogo2	0	Count	7	16	0	0	23	
		% within Gold	63.6%	15.7%	0.0%	0.0%	8.1%	
	1	Count	2	70	25	1	98	
		% within Gold	18.2%	68.6%	18.1%	2.9%	34.4%	
	2	Count	1	12	98	20	131	
		% within Gold	9.1%	11.8%	71.0%	58.8%	46.0%	
	3	Count	0	0	11	12	23	
		% within Gold	0.0%	0.0%	8.0%	35.3%	8.1%	
	4	Count	0	0	2	1	3	
		% within Gold	0.0%	0.0%	1.4%	2.9%	1.1%	
	6	Count	1	4	2	0	7	
		% within Gold	9.1%	3.9%	1.4%	0.0%	2.5%	
	Total		Count	11	102	138	34	285
			% within Gold	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 45: En esta tabla se muestra los porcentajes de concordancia entre el patólogo 2 (filas) y los diagnósticos de las biopsias en el archivo (Gold) mostrados en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. La diagonal sombreada en calabaza, muestra los porcentajes concordantes.

Índice Kappa de concordancia

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	.465	.041	11.633	.000
N of Valid Cases	286			

Tabla 46: Esta tabla muestra el índice Kappa de concordancia al comparar los diagnósticos establecidos por el patólogo 2 y los que tenemos en el archivo (GOLD)

Patólogo 3 vs GOLD

		Gold				Total		
		0=neg	CIN1	CIN2	CIN3			
Patólogo3		Count	0	1	1	0	2	
		% within Gold	0.0%	1.0%	0.7%	0.0%	0.7%	
	0	Count	9	31	6	0	46	
		% within Gold	81.8%	30.4%	4.3%	0.0%	16.1%	
	1	Count	2	68	41	2	113	
		% within Gold	18.2%	66.7%	29.7%	5.9%	39.6%	
	2	Count	0	1	67	7	75	
		% within Gold	0.0%	1.0%	48.6%	20.6%	26.3%	
	3	Count	0	0	21	24	45	
		% within Gold	0.0%	0.0%	15.2%	70.6%	15.8%	
	4	Count	0	0	0	1	1	
		% within Gold	0.0%	0.0%	0.0%	2.9%	0.4%	
	6	Count	0	1	2	0	3	
		% within Gold	0.0%	1.0%	1.4%	0.0%	1.1%	
	Total		Count	11	102	138	34	285
			% within Gold	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 47: En esta tabla se muestra los porcentajes de concordancia entre el patólogo 3 (filas) y los diagnósticos de las biopsias en el archivo (Gold) mostrados en las columnas. Las comparaciones se establecen por columnas. La diagonal sombreada en calabaza, muestra los porcentajes concordantes.

Índice Kappa de concordancia

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	.415	.038	11.941	.000
N of Valid Cases	286			

Tabla 48: Esta tabla muestra el índice Kappa de concordancia al comparar los diagnósticos establecidos por el patólogo 3 y los que tenemos en el archivo (GOLD)

Anexo 3

Valoración de p16

Se pasaron a cada patólogo los 132 cortes teñidos con p16 pertenecientes a los casos, sin su Hematoxilina, sólo el p16. Las lamillas se acompañaron de un documento (*reproducido a continuación**) explicativo sobre qué considerar positivos y qué considerar negativo, tratando de homogeneizar resultados.

*Valoración de p16:

- **Positivo:** valor 1: Tinción intensa y difusa afectando a todo el espesor del epitelio.
- **Negativo:** valor 0: Ausencia de tinción, tinción débil, focal, parcheada o limitada a la capa basal del epitelio.
- **No Valorable:** valor 6

Presentamos las tablas de frecuencia de resultados de cada uno de los patólogos. En estas tablas está representada el número de casos para cada categoría diagnóstica (columna Frecuencia) y el porcentaje de cada categoría con respecto al total (columna Porcentaje)

Patólogo 1

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	31	23.7
	1	100	76.3
	Total	131	100.0
Missing	6	1	

Tabla 49: En esta tabla podemos ver los resultados de interpretación de p16 del patólogo 1.

Patólogo 2

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	30	23.4
	1	98	76.6
	Total	128	100.0
Missing	6	4	
Total		132	

Tabla 50: En esta tabla podemos ver los resultados de interpretación de p16 del patólogo 2.

Patólogo 3

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	50	38.5
	1	80	61.5
	Total	130	100.0
Missing	6	2	
Total		132	

Tabla 51: En esta tabla podemos ver los resultados de interpretación de p16 del patólogo 3.

Valor de p16 de consenso

Una vez analizados cada uno de los resultados de los patólogos, se establece un valor de p16 de consenso. El valor resultante se obtiene analizando caso por caso el resultado de cada patólogo, y se elige el que se repite dos o tres veces. Los datos de frecuencia se muestran a continuación.

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	33	25.4
	1	97	74.6
	Total	130	100.0
Missing	6	2	
Total		132	

Tabla 52: En esta tabla se muestran los resultados de p16 de consenso.

Anexo 4

Se comparan los resultados de interpretación de p16 de cada uno de los patólogos con los demás y se establecen unos valores de concordancia INTER observador para interpretación de p16.

Concordancia entre patólogo 1 y patólogo 2

PATÓLOGO 1 * PATÓLOGO 2					
			PATÓLOGO 2		Total
			0	1	
PATÓLOGO 1	0	Count	26	4	30
		% within PATÓLOGO 2	86.7%	4.1%	23.4%
	1	Count	4	94	98
		% within PATÓLOGO 2	13.3%	95.9%	76.6%
Total		Count	30	98	128
		% within PATÓLOGO 2	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 53: Porcentaje de concordancia entre el patólogo 1 y el patólogo 2 a la hora de valorar p16. Sombreado en calabaza tenemos los porcentajes concordantes en cada categoría. Las Comparaciones se hacen por columnas.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.826	.059	9.343	.000
N of Valid Cases		128			

Tabla 54: Índice Kappa de concordancia entre patólogo 1 y patólogo 2 a la hora de valorar p16.

Concordancia entre patólogo 1 y patólogo 3

PATÓLOGO 1 * PATÓLOGO 3					
			PATÓLOGO 3		Total
			0	1	
PATÓLOGO 1	0	Count	30	0	30
		% within PATÓLOGO 3	60.0%	0.0%	23.1%
	1	Count	20	80	100
		% within PATÓLOGO 3	40.0%	100.0%	76.9%
Total		Count	50	80	130
		% within PATÓLOGO 3	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 55: Porcentaje de concordancia entre el patólogo 1 y el patólogo 2 a la hora de valorar p16. Sombreado en calabaza tenemos los porcentajes concordantes en cada categoría. Las Comparaciones se hacen por columnas.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.649	.068	7.899	.000
N of Valid Cases		130			

Tabla 56: Índice Kappa de concordancia entre patólogo 1 y patólogo 3 a la hora de valorar p16.

Concordancia entre patólogo 2 y patólogo 3

PATÓLOGO 2 * PATÓLOGO 3					
			PATÓLOGO 3		Total
			0	1	
PATÓLOGO 2	0	Count	29	1	30
		% within PATÓLOGO 3	59.2%	1.3%	23.4%
	1	Count	20	78	98
		% within PATÓLOGO 3	40.8%	98.7%	76.6%
Total		Count	49	79	128
		% within PATÓLOGO 3	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 57: Porcentaje de concordancia entre el patólogo 2 y el patólogo 3 a la hora de valorar p16. Sombreado en calabaza tenemos los porcentajes concordantes en cada categoría. Las Comparaciones se hacen por columnas.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.625	.070	7.519	.000
N of Valid Cases		128			

Tabla 58: Índice Kappa de concordancia entre patólogo 1 y patólogo 3 a la hora de valorar p16.

Anexo 5

Presentamos las frecuencias de resultados para cada categoría diagnóstica de cada uno de los patólogos al valorar las 184 laminillas con HE junto con su p16. Las categorías diagnósticas se clasifican de la siguiente manera:

0: NEGATIVO

1: CIN 1

2: CIN 2

3: CIN 3

4: CARCINOMA

6: NO VALORABLE

Patólogo 1

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	4	2.2
	1	59	32.1
	2	54	29.3
	3	65	35.3
	6	2	1.1
	Total	184	100.0
Missing		102	
Total		286	

Tabla 59: En esta tabla mostramos los resultados del Patólogo 1. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera, el porcentaje con respecto al total de cada categoría. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 1 diagnostica 59 CIN 1, lo que representa un 32,1 % de sus diagnósticos.

**Aparece una última fila "Missing" en la que aparecen los 102 casos que no se han valorado en esta ronda. No se computan a la hora de hacer las comparaciones.*

Patólogo 2.

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	12	6.6
	1	57	31.3
	2	85	46.7
	3	26	14.3
	6	2	1.1
	Total	182	100.0
Missing		102	
	4	2	
	Total	104	
Total		286	

Tabla 60: En esta tabla mostramos los resultados del Patólogo 2. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera, el porcentaje con respecto al total de cada categoría. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 2 diagnostica 57 CIN 1, lo que representa un 31,3 % de sus diagnósticos.

**Aparecen al final una fila "Missing" en la que aparecen los 102 casos que no se han valorado en esta ronda y una fila de la categoría diagnóstica 4 (carcinoma escamoso) que al ser el único patólogo que los diagnostica quedan fuera de los porcentajes. No se computan a la hora de hacer las comparaciones.*

Patólogo 3.

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	38	20.7
	1	84	45.7
	2	46	25.0
	3	14	7.6
	6	2	1.1
	Total	184	100.0
Missing		102	
Total		286	

Tabla 61: En esta tabla mostramos los resultados del Patólogo 3. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera, el porcentaje con respecto al total de cada categoría. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 1 diagnostica 84 CIN 1, lo que representa un 45,7 % de sus diagnósticos.

**Aparece una última fila "Missing" en la que aparecen los 102 casos que no se han valorado en esta ronda. No se computan a la hora de hacer las comparaciones.*

Anexo 6

Tablas de concordancia INTRA observador para cada patólogo entre su diagnóstico sólo con HE y después con HE y p16.

Con los resultados de la valoración de las HE por separado y después con los resultados emitidos tras la valoración de la HE con su p16 se establecieron una serie de comparaciones. Ahora mostramos las comparaciones entre los diagnósticos emitidos por cada patólogo en cada uno de los dos supuestos.

Patólogo 1

HE P1 * HE p16 P1 Crosstabulation								
		HE p16 P1					Total	
		0	1	2	3	6		
HE P1	0	Count	0	1	0	0	0	1
		% within HE p16 P1	0.0%	1.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%
	1	Count	2	51	14	1	0	68
		% within HE p16 P1	50.0%	86.4%	25.9%	1.5%	0.0%	37.0%
	2	Count	1	7	30	32	0	70
		% within HE p16 P1	25.0%	11.9%	55.6%	49.2%	0.0%	38.0%
	3	Count	0	0	10	32	0	42
		% within HE p16 P1	0.0%	0.0%	18.5%	49.2%	0.0%	22.8%
	6	Count	1	0	0	0	2	3
		% within HE p16 P1	25.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	1.6%
	Total	Count	4	59	54	65	2	184
		% within HE p16 P1	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 62: En esta tabla se muestran los porcentajes de concordancia entre los resultados emitidos por el patólogo 1. En las filas los resultados emitidos por el patólogo 1 sólo con HE y en las columnas HE + p16. Las comparaciones se establecen por columnas. En diagonal sombreados en gris los casos coincidentes.

Índice Kappa de Concordancia					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.456	.051	9.430	.000
N of Valid Cases		184			

Tabla 63: Índice Kappa de concordancia para intraobservador para el patólogo 1.

Patólogo 2

			HE p16 P2					
			0	1	2	3	6	
HE P2	0	Count	5	2	0	0	0	7
		% within HE p16 P2	41.7%	3.5%	0.0%	0.0%	0.0%	3.8%
	1	Count	7	44	9	0	0	60
		% within HE p16 P2	58.3%	77.2%	10.6%	0.0%	0.0%	33.0%
	2	Count	0	9	73	15	0	97
		% within HE p16 P2	0.0%	15.8%	85.9%	57.7%	0.0%	53.3%
	3	Count	0	1	3	11	0	15
		% within HE p16 P2	0.0%	1.8%	3.5%	42.3%	0.0%	8.2%
	6	Count	0	1	0	0	2	3
		% within HE p16 P2	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%	100.0%	1.6%
	Total	Count	12	57	85	26	2	182
		% within HE p16 P2	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 64: En esta tabla se muestran los porcentajes de concordancia entre los resultados emitidos por el patólogo 2. En las filas los resultados emitidos por el patólogo 2 sólo con HE y en las columnas HE + p16. Las comparaciones se establecen por columnas. En diagonal sombreados en gris los casos coincidentes.

Índice Kappa de concordancia		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.592	.050	11.833	.000
N of Valid Cases		182			

Tabla 65: Índice Kappa de concordancia para intraobservador para el patólogo 2.

Patólogo 3

			HE p16 P3					Total
			0	1	2	3	6	
HE P3		Count	0	0	1	0	0	1
		% within HE p16 P3	0.0%	0.0%	2.2%	0.0%	0.0%	0.5%
	0	Count	16	6	0	0	0	22
		% within HE p16 P3	42.1%	7.1%	0.0%	0.0%	0.0%	12.0%
	1	Count	21	44	3	1	0	69
		% within HE p16 P3	55.3%	52.4%	6.5%	7.1%	0.0%	37.5%
	2	Count	1	32	26	5	0	64
		% within HE p16 P3	2.6%	38.1%	56.5%	35.7%	0.0%	34.8%
	3	Count	0	2	16	8	0	26
		% within HE p16 P3	0.0%	2.4%	34.8%	57.1%	0.0%	14.1%
	6	Count	0	0	0	0	2	2
		% within HE p16 P3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	1.1%
	Total	Count	38	84	46	14	2	184
		% within HE p16 P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 66: En esta tabla se muestran los porcentajes de concordancia entre los resultados emitidos por el patólogo 3. En las filas los resultados emitidos por el patólogo 3 sólo con HE y en las columnas HE + p16. Las comparaciones se establecen por columnas. En diagonal sombreados en gris los casos coincidentes.

Índice Kappa de concordancia Patólogo 3					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.323	.052	7.389	.000
N of Valid Cases		184			

Tabla 67: Índice Kappa de concordancia para intraobservador para el patólogo 3.

Anexo 7

Se seleccionan al azar 50 HE de las 286 para que los patólogos valoren aplicando la clasificación binaria:

1: LSIL (lesión de bajo grado)

2: HSIL (lesión de alto grado)

Presentamos a continuación las tablas con las frecuencias de resultados para cada uno de los patólogos.

Patólogo 1

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	1	22	44.0
	2	28	56.0
	Total	50	100.0
Missing		236	
Total		286	

Tabla 68: En esta tabla mostramos los resultados del patólogo 1. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera, el porcentaje con respecto al total de cada categoría. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 1 diagnostica 22 LSIL, lo que representa un 44 % de sus diagnósticos.

**Aparece una última fila "Missing" en la que aparecen los 236 casos que no se han valorado en esta ronda. No se computan a la hora de hacer las comparaciones.*

Patólogo 2

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	1	20	40.0
	2	30	60.0
	Total	50	100.0
Missing		236	
Total		286	

Tabla 69: En esta tabla mostramos los resultados del patólogo 2. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera, el porcentaje con respecto al total de cada categoría. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 2 diagnostica 20 LSIL, lo que representa un 40 % de sus diagnósticos.

Patólogo 3

		Frecuencia	Porcentaje
Valid	0	2	4.0
	1	25	50.0
	2	23	46.0
	Total	50	100.0
Missing		236	
Total		286	

Tabla 70: En esta tabla mostramos los resultados del patólogo 3. En la primera columna se representa las categorías diagnósticas, en la segunda el número de veces que se ha establecido este diagnóstico, en la tercera, el porcentaje con respecto al total de cada categoría. Así, a modo de ejemplo, el patólogo 3 diagnostica 25 LSIL, lo que representa un 50 % de sus diagnósticos.

**Aparece una última fila "Missing" en ambas tablas, en la que aparecen los 236 casos que no se han valorado en esta ronda. No se computan a la hora de hacer las comparaciones.*

Anexo 8**Concordancia INTERobservador con la clasificación binaria**

Tras analizar las frecuencias de resultados para estos 50 casos con la clasificación binaria, se establecieron unas tablas de concordancia.

Patólogo 1 vs Patólogo 2

			P2 H/L		Total
			1	2	
P1 H/L	1	Count	18	4	22
		% within P2 H/L	90.0%	13.3%	44.0%
	2	Count	2	26	28
		% within P2 H/L	10.0%	86.7%	56.0%
Total		Count	20	30	50
		% within P2 H/L	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 71: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 2 (columnas). Sombreado en lila aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Patólogo 1 vs patólogo 3

P1 H/L * P3 H/L						
			P3 H/L			Total
			0	1	2	
P1 H/L	1	Count	2	16	4	22
		% within P3 H/L	100.0%	64.0%	17.4%	44.0%
	2	Count	0	9	19	28
		% within P3 H/L	0.0%	36.0%	82.6%	56.0%
Total		Count	2	25	23	50
		% within P3 H/L	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 72: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 3 (columnas). Sombreado en lila aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Patólogo 2 vs patólogo 3

			P3 H/L			Total
			0	1	2	
P2 H/L	1	Count	2	16	2	20
		% within P3 H/L	100.0%	64.0%	8.7%	40.0%
	2	Count	0	9	21	30
		% within P3 H/L	0.0%	36.0%	91.3%	60.0%
Total		Count	2	25	23	50
		% within P3 H/L	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 73: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 3 (columnas). Sombreado en lila aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Anexo 9

Mostramos las tablas de concordancia tras la recodificación de los diagnósticos entre los diferentes patólogos. Primero comparamos los diagnósticos realizados sólo sólo con HE y a continuación con HE y p16.

Se establecen dos categorías diagnósticas:

1: Negativo y CIN 1

2: CIN2-CIN3-CARCINOMA

6: NO VALORABLE

Concordancia Patólogo 1 vs Patólogo 2 con sólo con HE tras la recodificación

			HE P2			Total
			1	2	6	
HE P1	1	Count	110	24	4	138
		% within HE P2	90.9%	15.2%	57.1%	48.3%
	2	Count	11	133	1	145
		% within HE P2	9.1%	84.2%	14.3%	50.7%
	6	Count	0	1	2	3
		% within HE P2	0.0%	0.6%	28.6%	1.0%
Total		Count	121	158	7	286
		% within HE P2	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 74: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 2 (columnas) de los diagnósticos hechos con sólo con HE. Sombreado en azul aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Concordancia Patólogo 1 vs Patólogo 2 tras la recodificación con HE y p16

			HE p16 P2			Total
			1	2	6	
HE p16 P1	1	Count	59	4	0	63
		% within HE p16 P2	85.5%	3.5%	0.0%	34.2%
	2	Count	10	109	0	119
		% within HE p16 P2	14.5%	96.5%	0.0%	64.7%
	6	Count	0	0	2	2
		% within HE p16 P2	0.0%	0.0%	100.0%	1.1%
Total		Count	69	113	2	184
		% within HE p16 P2	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 75: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 2 (columnas) de los diagnósticos hechos con con HE y p16. Sombreado en azul aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Concordancia Patólogo 1 vs Patólogo 3 con HE tras la recodificación

			HE P3			Total
			1	2	6	
HE P1	1	Count	129	8	1	138
		% within HE P3	80.1%	6.6%	33.3%	48.3%
	2	Count	31	114	0	145
		% within HE P3	19.3%	93.4%	0.0%	50.7%
	6	Count	1	0	2	3
		% within HE P3	0.6%	0.0%	66.7%	1.0%
Total		Count	161	122	3	286
		% within HE P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 76: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 3 (columnas) de los diagnósticos hechos con sólo con HE. Sombreado en azul aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Concordancia Patólogo 1 vs Patólogo 3 con HE + p16 tras la recodificación

			HE p16 P3			Total
			1	2	6	
HE p16 P1	1	Count	63	0	0	63
		% within HE p16 P3	51.6%	0.0%	0.0%	34.2%
	2	Count	59	60	0	119
		% within HE p16 P3	48.4%	100.0%	0.0%	64.7%
	6	Count	0	0	2	2
		% within HE p16 P3	0.0%	0.0%	100.0%	1.1%
Total		Count	122	60	2	184
		% within HE p16 P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 77: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 1 (filas) y el 3 (columnas) de los diagnósticos hechos con HE y p16. Sombreado en azul aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Concordancia Patólogo 2 vs Patólogo 3 con HE tras la recodificación

			HE P3			Total
			1	2	6	
HE P2	1	Count	115	6	0	121
		% within HE P3	71.4%	4.9%	0.0%	42.3%
	2	Count	42	116	0	158
		% within HE P3	26.1%	95.1%	0.0%	55.2%
	6	Count	4	0	3	7
		% within HE P3	2.5%	0.0%	100.0%	2.4%
Total		Count	161	122	3	286
		% within HE P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 78: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 2 (filas) y el 3 (columnas) de los diagnósticos hechos con sólo con HE. Sombreado en azul aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

Concordancia Patólogo 2 vs Patólogo 3 con HE + p16 tras la recodificación

HE p16 P2 * HE p16 P3 Crosstabulation						
			HE p16 P3			Total
			1	2	6	
HE p16 P2	1	Count	68	1	0	69
		% within HE p16 P3	55.7%	1.7%	0.0%	37.5%
	2	Count	54	59	0	113
		% within HE p16 P3	44.3%	98.3%	0.0%	61.4%
	6	Count	0	0	2	2
		% within HE p16 P3	0.0%	0.0%	100.0%	1.1%
Total		Count	122	60	2	184
		% within HE p16 P3	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 79: En esta tabla podemos observar las comparaciones entre el patólogo 2 (filas) y el 3 (columnas) de los diagnósticos hechos con HE y p16. Sombreado en azul aparecen los casos coincidentes. Las comparaciones se han establecido por columnas.

