



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>



Universitat Autònoma de Barcelona

**MARCADORS MOLECULARS COM A FACTORS DE PERSISTÈNCIA I
EVOLUCIÓ DE LES DISPLÀSIES CERVICALS LLEUS**

Memòria presentada per

Carla Lecumberri Estruch

Per optar al grau de

Doctora en Medicina i Cirurgia

Tesi realitzada sota la direcció dels doctors

Emilio Pérez Picañol i M Paz Cañadas Castillo

MARCADORS MOLECULARS COM A FACTORS DE PERSISTÈNCIA I EVOLUCIÓ DE LES DISPLÀSIES CERVICALS LLEUS

Memòria presentada per

Carla Lecumberri Estruch

Per optar al grau de

Doctora en Medicina i Cirurgia

Tesi realitzada sota la direcció dels doctors

Emilio Pérez Picañol i M Paz Cañadas Castillo

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva i Salut
Pública

Universitat Autònoma de Barcelona

Emilio Pérez Picañol

Carla Lecumberri Estruch

M Paz Cañadas Castillo

Bellaterra, Juny 2017

A la Uma

A l'Arnau

A la meva mare, al meu pare i al meu germà

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria agrair al Professor Emilio Pérez Picañol per haver acceptat la direcció d'aquesta tesis doctoral, per la seva paciència i optimisme, per tot el que he après sota la seva direcció i pel temps dedicat a les múltiples correccions de la tesis. Agrair-li també el seu paper indubtable en la meva formació com a ginecòloga i com a investigadora.

A la Dra. M Paz Cañadas Castillo, codirectora de la tesis, per tot el que m'ha ensenyat. Per les hores dedicades en la tesina i la tesis. Encara recordo el dia que ens vam conèixer, quan la vaig trucar per demanar-li ajuda per la integració viral. Des d'aquell moment, la motivació ha estat constant. Donar les gràcies per la seva implicació, la seva motivació, per emocionar-nos juntes quan els resultats sortien, i per ensenyar-me cada dia coses noves.

Agrair al Dr. Antoni Tarrats el seu suport, la seva implicació i pel seu interès en que aquest projecte sortís. Per tot el que m'ha ensenyat en la meva etapa de resident i d'adjunta i em segueix ensenyant.

Agrair als meus companys del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol que m'han acompanyat aquests darrers anys. Per tot el que he après amb vosaltres i espero seguir aprenent.

Agrair als meus companys de l'ASSIR la seva paciència en els moments de redacció, pels dies d'estrés en la fase final. Menció especial a la Roser Gol, per la seva amistat i pels moments de "coaching". A la Conchi per ser la meva companya de patologia cervical, per controlar-ho tot i per la seva amistat.

Agrair als pacients que van acceptar participar en l'estudi d'aquesta tesis i a tots els professionals que els van atendre. Agrair a l'Ester i la Blanca la seva col·laboració en la base de dades.

A l'Hospital Germans Trias i Pujol per concedir-me la beca de retenció de talents, punt de partida d'aquesta tesis.

A tot el personal del Servei d'Anatomia Patològica, en especial la Mariona Llatjós i Eva Castellà, per facilitar-me sempre la feina, per provar proves noves amb tota la motivació del món, per compartir el món VPH.

A tot el personal del Servei de Microbiologia, en especial a Elisa Martró, per la seva ajuda en la determinació del VPH.

Als laboratoris ROCHE Diagnostics® per haver-me facilitat els kits de CINTecPlus, gràcies Anna i Jaume per les hores dedicades i pel suport.

Agrair el Rafa, una peça clau d'aquesta tesis pels correus i les trucades a altes hores de la nit, sense ell aquest treball no hagués estat possible.

Als meus amics... per estar allà en els moments més delicats de la meva vida, perquè sóc com sóc en part per ells. Menció especial a la Mireia, per el seu suport estadístic en els moments finals del seu embaràs.

Agrair a la meva mare, per tot el que em va ensenyar, per tots els valors que em va transmetre i les ganes de seguir sempre aprenent que em va inculcar.

Agrair al meu pare, una de les persones que més m'ha ensenyat tan a nivell personal com a nivell professional. Per acompanyar-me i guiar-me en els moments més bonics i més durs de la meva vida. Per estar orgullós de mi cada dia, i emocionar-se amb cada petita fita que aconsegueixo. I per seguir-me ensenyant cada dia.

Al meu germà, Natxo per estar sempre allà.

A l'Arnau, per tot el suport que m'ha donat els darrers mesos, pels seus ànims en moments de debilitat, per creure en mi, per la vida que estem construint junts.

I a la meva filla Uma, perquè gràcies a ella ha canviat la meva manera de veure i de comprendre el món, perquè m'ha fet entendre coses, ha canviat el meu ordre de prioritats i perquè cada dia em fa créixer com a persona.

Índex

AGRAÏMENTS	5
ABREVIATURES.....	10
1. ESTAT ACTUAL DEL TEMA	14
VIRUS DE PAPIL·LOMA HUMÀ	16
ESTRUCTURA DEL VPH	16
TIPUS DE VPH. RELACIÓ AMB LA PATOLOGIA ONCOGÈNICA.	18
HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PER VPH	19
INTERACCIÓ VIRUS-HOSTE. IMMUNITAT DE LA INFECCIÓ PER VPH	20
EVASIÓ TUMORAL, PERSISTÈNCIA DE LA INFECCIÓ VIRAL	21
INFECCIONS PRODUCTIVA, TRANSFORMANT I LATENT	22
VIRUS DE PAPIL·LOMA HUMÀ I CÀNCER DE CÈRVIX	25
PREVALENÇA DE LA INFECCIÓ PER VPH A ESPANYA, EUROPA I EL MÓN.	28
DISTRIBUCIÓ I PREVALENÇA DELS DIFERENTS GENOTIPS DEL VPH A NIVELL MUNDIAL, EUROPA I ESPANYA.....	29
TRANSMISSIÓ DE LA INFECCIÓ PER VPH.....	32
COFACTORS D'ADQUISICIÓ.....	33
RISC DE PROGRESSIÓ. COFACTORS.....	34
ESTRATÈGIES DE PREVENCIÓ DEL CÀNCER DE CÈRVIX	36
PREVENCIÓ PRIMÀRIA: VACUNACIÓ	36
PREVENCIÓ SECUNDÀRIA: METODES DE CRIBRATGE	41
TÈCNiques DE CRIBRATGE.....	42
LESIONS PRECURSORES DEL CÀNCER DE COLL D'ÚTER	47
CLASSIFICACIÓ I DIAGNÒSTIC.....	47
DIAGNÒSTIC CITOLÒGIC.....	49
DIAGNÒSTIC HISTOLÒGIC	51
HISTORIA NATURAL DE LA LESIÓ CERVICAL	54
MANEIG CLÍNIC DE LES DISPLÀSIES CERVICALS.....	56
ASCUS	56
ASCUS H	58
LESIÓ ESCAMOSA INTRAEPITELIAL DE BAIX GRAU (LSIL).....	58
LESIÓ ESCAMOSA INTRAEPITELIAL D'ALT GRAU (HSIL)	59
OPCIÓNS TERAPÈUTIQUES EN LES DISPLÀSIES PREMALIGNES.....	61

CONDUCTA TERAPÈUTICA DE LES LESIONS DE BAIX GRAU: CIN-1	61
CONDUCTA TERAPÈUTICA DE LES LESIONS D'ALT GRAU: CIN-2/3	62
TIPUS DE TRACTAMENT	63
TRACTAMENTS DESTRUCTIUS.....	63
TRACTAMENTS ESCISSIONALS	64
OBSERVACIÓ SENSE TRACTAMENT	66
<u>METODES DE DETECCIÓ DE VPH</u>	67
MÈTODES PER AMPLIFICACIÓ DE SENYAL.....	68
MÈTODES D'AMPLIFICACIÓ MOLECULAR BASATS EN LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	70
MÈTODES DE DETECCIÓ ARN-VPH.....	73
PROTEÏNES DEL VPH	73
<u>2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI</u>	78
<u>3. HIPÒTESIS.....</u>	80
<u>4. OBJECTIUS</u>	82
<u>5. MATERIAL I MÈTODES</u>	84
DISSENY DE L'ESTUDI	84
ÀMBIT D'ESTUDI	84
SUBJECTES	84
RECOPIACIÓ DE LES MOSTRES	85
DEFINICIÓ DE LES VARIABLES	88
ANÀLISIS ESTADÍSTIC	93
ASPECTES ETICS.....	94
<u>6. RESULTATS</u>	96
ANÀLISIS DESCRIPTIU DE LA POBLACIÓ ESTUDI	96
EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CERVICALS.....	106
RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I ELS FACTORS EPIDEMIOLÒGICS.....	107
RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I ELS RESULTATS AL MOMENT BASAL	113
RELACIÓ ENTRE EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I DETECCIÓ DEL VPH-AR.....	116
RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I EL GENOTIPAT ESPECÍFIC	121
RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I LA DETECCIÓ DE P16/Ki-67.....	137
<u>7. DISCUSSIÓ</u>	142
ANÀLISIS DESCRIPTIU DE LA POBLACIÓ ESTUDI	142
EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CERVICALS.....	144
RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I ELS FACTORS EPIDEMIOLÒGICS	147

RELACIO ENTRE L'EVOLUCIO DE LA LESIÓ I LA DETECCIÓ DE VPH.....	150
RELACIO ENTRE L'EVOLUCIÓ I EL GENOTIPAT ESPECIFIC.....	155
RELACIO ENTRE L'EVOLUCIO DE LA LESIO I EL RESULTAT DE LA TINCIO DUAL.....	162
<u>8. CONCLUSIONS</u>	<u>167</u>
<u>9. BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>169</u>
<u>10. ANNEXES</u>	<u>183</u>

ABREVIATURES

ACO	Anticoncepció hormonal
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AEPCC	Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AGUS	Cèl·lules Glandulars Atípiques de significat indeterminat (Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance)
AIS	Adenocarcinoma In Situ
ARC	Agència per la investigació del càncer (Agency Research of Cancer)
ASC-US	Cèl·lules escatoses atípiques de significat indeterminat (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)
ASC-H	Cèl·lules escatoses atípiques en què no es pot descartar la lesió d'alt grau
CD4	Limfòcits T (valor analític)
CH2	Hybrid capture® II assay
CIN	Neoplàsia Intraepitelial Cervical
CIN1	Neoplàsia intraepitelial Cervical de primer grau
CIN2	Neoplàsia Intraepitelial Cervical de segon grau
CIN2+	Neoplàsia Intraepitelial Cervical de segon grau o superior
CIN3	Neoplàsia Intraepitelial Cervical de tercer grau
CIN3+	Neoplàsia Intraepitelial Cervical de tercer grau o superior
CIS	Carcinoma In Situ
CCU	Càncer de cèrvix uterí
DIU	Dispositiu Intrauterí
E	Early

FDA	Agència Americana del medicament i alimentació (Food and Drugs Agency)
H-SIL	Lesió intraepitelial d'alt grau (High Grade Squamous Intraepitelial Lesion)
IFCPC	The International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy
L	Late
LLETZ	Large Loop Excision of the transformation Zone
LCR	Long region control
L-SIL	Lesió intraepitelial de baix grau (Low Grade Squamous Intraepitelial Lesion)
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Natural Killer
ORF	Open reading frame
P53	Proteïna 53
PCR	Reacció en cadena de polimerasa
Rb	Retinoblastoma
SEGO	Societat Espanyola de Ginecologia i Obstetrícia
SIL	Lesió intraepitelial escatosa (Squamous Intraepitelial Lesion)
VIH	Virus de la Immunodeficiència Humana (Human Immunodeficiency Virus)
VPH	Virus del Papil·loma Humà (Human Papilloma Virus)
VPH-AR	Virus del Papil·loma Humà d'alt risc
VPH-BR	Virus del Papil·loma Humà de baix risc
TGI	Tracte genital inferior
VAIN	Neoplàsia intraepitelial de vagina
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIN	Neoplàsia intraepitelial de vulva

ZT

Zona de Transició

1. ESTAT ACTUAL DEL TEMA

INTRODUCCIÓ

El factor de risc més important pel desenvolupament del càncer cervical és la infecció persistent pels tipus d'alt risc oncogènic del Virus del Papil·loma Humà (VPH). Contràriament, l'absència de seqüències d'ADN del VPH en les mostres cervicals, representa un risc molt baix de desenvolupar càncer. En aquest context, el genotipatge del VPH és considerat la tècnica diagnòstica d'elecció dels futurs programes de cribratge de càncer relacionat amb VPH, i el mètode més adequat per la monitorització de l'impacte d'estratègies terapèutiques com la conització i la vacunació (1).

Segons la literatura actual els genotips més freqüentment aïllats en les lesions cervicals són el VPH 16 i el VPH 18. Estan associats amb el 70% dels càncers cervicals, el 50% de les displàsies cervicals d'alt grau i el 25% de les displàsies cervicals de baix grau. Tot i això, hi ha altres genotips de VPH d'alt risc com poden ser el VPH 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 70 i 85 que juguen un paper important en la patologia cervical.

La infecció persistent per VPH-AR és la principal causa de càncer de cèrvix. Un 70% de les dones han estat infectades per VPH en algun moment de la seva vida, però només un 15% desenvolupen malaltia. És per això, que els tests VPH DNA són molt útils en el cribratge primari, en identificar els diagnòstics falsos positius i la vigilància post tractament després d'una conització (2).

El concepte i la terminologia de les alteracions premalignes de l'epiteli cervical, han evolucionat paral·lelament al progrés del coneixement de la seva biologia i la seva història natural. Tal com ja hem esmentat actualment sabem que el factor etiològic del càncer cervical és la infecció persistent per VPH-AR. Classifiquem les lesions cervicals intraepitelials (SIL) en dos categories: baix grau (LSIL) i alt grau (HSIL). Aquesta divisió en dos grups es justifica per l'evidència que les LSIL corresponen bàsicament a infeccions víriques, en general autolimitades i només excepcionalment progressen a carcinoma, mentre que les HSIL corresponen a veraders canvis premalignes.

El diagnòstic d'una lesió de LSIL en una pacient obliga a la realització d'una colposcòpia amb biòpsia dirigida per descartar la presència d'una lesió cervical d'alt grau subjacent (CIN2+ que equival a CIN2, CIN3 o superior). Si es descarta la lesió d'alt grau es sotmet

a la pacient a controls semestrals per valorar la regressió, la persistència o l'evolució de la lesió.

L'evidència obtinguda en els darrers anys ha demostrat que aquestes lesions regressen espontàniament en un 80% dels casos, fet que fa plantejar-nos un mètode de cribratge de les LSIL amb objecte d'identificar les lesions amb alt risc de progressió (3).

L'elevat número de dones diagnosticades de LSIL després del cribratge citològic constitueixen una problemàtica no resolta. L'heterogeneïtat d'aquest grup respecte al verdader risc de desenvolupar un càncer invasiu, sovint motiva que un subgrup d'aquestes pacients es vegin perjudicades dels efectes desfavorables d'un tractament innecessari o d'una conducta expectant amb el risc potencial de que les lesions progressin fins desenvolupar un càncer.

A més a més, existeix un problema afegit: la correlació entre la citologia amb lesió d'alt grau HSIL i la lesió d'alt grau histològica no sempre són coincidents i oscil·len al voltant de 45-50% segons diferents sèries (4).

Per tant, per aconseguir un test que tingui una elevada especificitat i sensibilitat a nivell clínic, aquest hauria de detectar únicament aquells casos de LSIL que en un futur evolucionaran a CIN2+.

D'altra banda, tant amb els test de detecció de DNA del VPH com amb la tipificació viral, obtenim una elevada sensibilitat, de manera que no només es detecten precoçment un major número de lesions d'alt grau, sinó que també han permès que l'interval de temps del cribratge sigui major en pacients negatives. Tot i això, l'especificitat d'aquestes proves es baixa, sobretot si focalitzem en dones joves, amb un augment de les proves complementàries i del seguiment d'aquestes pacients.

Per aquesta raó, l'aplicació de diferents tests moleculars disponibles, entre ells l'ús de p16INK4a, el genotipat de determinats VPH, l'estudi de l'ARNm o la metilació VPH ofereixen futures perspectives de consolidar-se com a proves d'una sensibilitat alta, mantenint una elevada especificitat (5).

VIRUS DE PAPIL·LOMA HUMÀ

En la dècada dels anys 80, es va descriure la relació entre la infecció pel VPH i el càncer de cèrvix (6). A mitjans del anys 90 es va establir que el factor etiològic del càncer cervical de cèl·lules escamoses era el VPH (7) i més recentment, s'han identificat els genotips del VPH que estan relacionats amb aquests i altres càncers com el càncer de vulva, de vagina, de penis, anal o orofaringe (8).

Estructura del VPH

Els papil·lomavirus humans són membres de la família *papovaviridae*. Són virus petits d'ADN circular encapsulat d'aproximadament 8000 parelles de bases. Tenen una mida d'aproximadament 55nm.

La seqüència completa d'ADN de la majoria dels VPH ha estat descrita i presenta una organització gènica similar. A diferència d'altres virus, les proteïnes sintetitzades només corresponen a la traducció d'una sola cadena d'ADN viral. Això significa que els ARN missatgers (ARNm) són còpies d'una sola cadena.

La seva estructura genòmica és compartida pels més de 100 tipus seqüenciats fins al moment. El genoma del VPH està organitzat en tres regions diferenciades: la regió precoç, la regió tardana i finalment la regió no codificant.

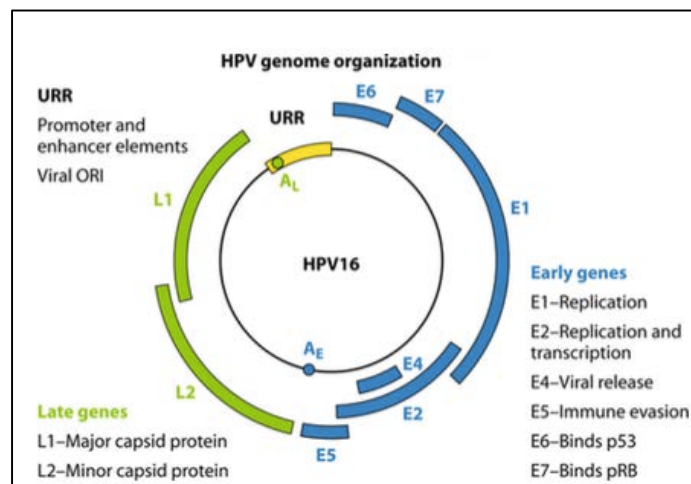


Figura 1: Esquema del genoma viral del VPH (9)

La regió precoç o també anomenada regió E (de la paraula anglesa Early) conté vuit gens d'expressió precoç (E1-E8) els quals codifiquen proteïnes implicades en la regulació i replicació viral. La regió tardana o regió L conté dos gens d'expressió tardana (L1-L2) l'expressió de la qual genera les proteïnes per l'encapsulatge de la coberta viral, la càpside. Existeix una regió de control, denominada *Long Control Region* (LCR) que és l'encarregada de controlar l'expressió dels gens E6 i E7 (10).

Els gens E1 i E2 estan involucrats en el control de la replicació i transcripció viral respectivament. La funció del gen E4 no és molt clara però sembla que estaria implicada en la maduració de les partícules virals. Els gens E6 i E7 presenten un paper important en la replicació i el manteniment d'un gran número de partícules virals d'ADN en les cèl·lules. Les proteïnes d'aquests gens immortalitzen i modulen la transcripció viral mitjançant la seva unió a p53 i al retinoblastoma (Rb) cel·lular. La proteïna del gen E5 juga un paper en la transformació cel·lular.

Els gens de les regions L1 i L2 codifiquen per les proteïnes de la càpside.

Les funcions particulars associades a cada gen, així com algunes de les seves propietats.

E6	<ul style="list-style-type: none">• Immortalitza i és responsable de transformació maligna
E7	<ul style="list-style-type: none">• Immortalitza i és responsable de transformació maligna
E2	<ul style="list-style-type: none">• Regula la transcripció viral• Cofactor de la replicació viral
E1	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la replicació viral• Manté la forma episomal del virus
E5	<ul style="list-style-type: none">• Baixa l'activitat de transformació• Traducció
L1 i L6	<ul style="list-style-type: none">• Responsable de la codificació de la càpside
E4	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la maduració de les partícules

Figura 2: Funcions principals de les proteïnes del VPH

Tipus de VPH. Relació amb la patologia oncogènica.

En l'actualitat s'han aïllat més de 100 tipus de VPH i almenys 40 d'aquests tipus infecten les mucoses ano-genitals. El reconeixement d'un nou tipus de VPH requereix diferències de més del 10% en la seqüència de parells de bases en els gens E6, E7 i L1.

Els VPH són específics d'espècie. Presenten, a més, una gran especificitat de teixit i localització: la infecció per aquests virus té lloc de forma exclusiva en epitelis de revestiment (en especial l'epiteli escamós).

Existeixen més de 35 tipus de VPH que afecten de forma casi exclusiva l'epiteli de la regió ano-genital (8).

Segons la capacitat oncogènica, es classifiquen els VPH en tipus de baix (VPH-BR) i d'alt risc (VPH-AR).

S'anomena VPH-BR aquells virus que tenen una capacitat de provocar càncer molt baixa. Aquests tipus poden, a més a més, provocar condilomes, papil·lomes laringis i papil·lomatosis respiratòria recurrent en nens i adults joves.

Els VPH-AR són els que trobem amb major freqüència associats a càncer de cèrvix. Els estudis epidemiològics atribueixen variacions poblacionals importants en la prevalença i en la relació causa/efecte dels diferents tipus virals. Els VPH tipus 16 i 18 es troben en el 70% dels casos de lesions malignes (50 i 20% respectivament); 45, 31, 33, 52, 58 i 35 es troben en un 20% de les lesions, per la qual cosa existeixen 8 tipus virals que són els responsables del 90% dels casos (8,11).

Taula 1: Classificació epidemiològica del tipus de VPH(12)

CLASSIFICACIO VPH	
VPH-AR	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 i 82
VPH POSSIBLE AR	26
VPH-BR	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 89 i CP6108

S'ha de tenir en compte que alguns tipus virals poden aparèixer en lesions canceroses com a resultat d'una coinfecció i no ser els agents etiològics causals de la transformació tumoral. Les lesions neoplàstiques cervicals, vaginals, vulvars i anals s'associen amb freqüència amb lesions d'alt risc i en menor mesura amb lesions de baix risc.

Historia natural de la infecció per VPH

El cicle vital del VPH requereix infectar les cèl·lules epitelials de la mucosa de la làmina basal, probablement a través d'una petita ferida o abrasió de la zona. En les cèl·lules de la làmina basal, l'expressió dels gens virals està fortament controlada per aquestes cèl·lules, tot i que hi ha una limitada expressió dels gens virals temprans E1, E2, E5 i especialment E6 i E7. Això dona lloc a una proliferació de les cèl·lules infectades. El cicle vital de virus continua amb l'expressió dels gens virals tardans E4, L1 i L2 en les cèl·lules suprabasals. El genoma circular del VPH es replica llavors i dona lloc a proteïnes estructurals. En les cèl·lules superiors de l'epidermis les partícules virals s'acoblen i s'alliberen. Les proteïnes E1 i E2 estan involucrades en la replicació i segregació del genoma episomal viral. La proteïna E2 actua només com un activador transcripcional de promotors virals a través de la seva habilitat per unir-se a seqüències específiques de la regió de control del VPH. Tot i això, en molts casos la proteïna E2 pot inhibir la transcripció viral, ja que pot suprimir l'expressió de E6 i E7. El gen E4 participa en la maduració de les partícules virals, mentre que E5 participa en les primeres etapes de la infecció, tot i que sembla que no juga un paper important en els estadis finals de la malaltia. L'expressió dels gens virals E6 i E7 són els més importants en la transformació maligna per la funció de les seves respectives proteïnes que són consistentment expressades en els càncers. Les proteïnes E6 i E7 immortalitzen i modulen la transcripció viral, unint-se E6 a p53 i activant la seva degradació i la proteïna unint-se a Rb, una proteïna supressora tumoral. Tot això condueix a una inestabilitat cromosòmica anormal i aneuploidia.

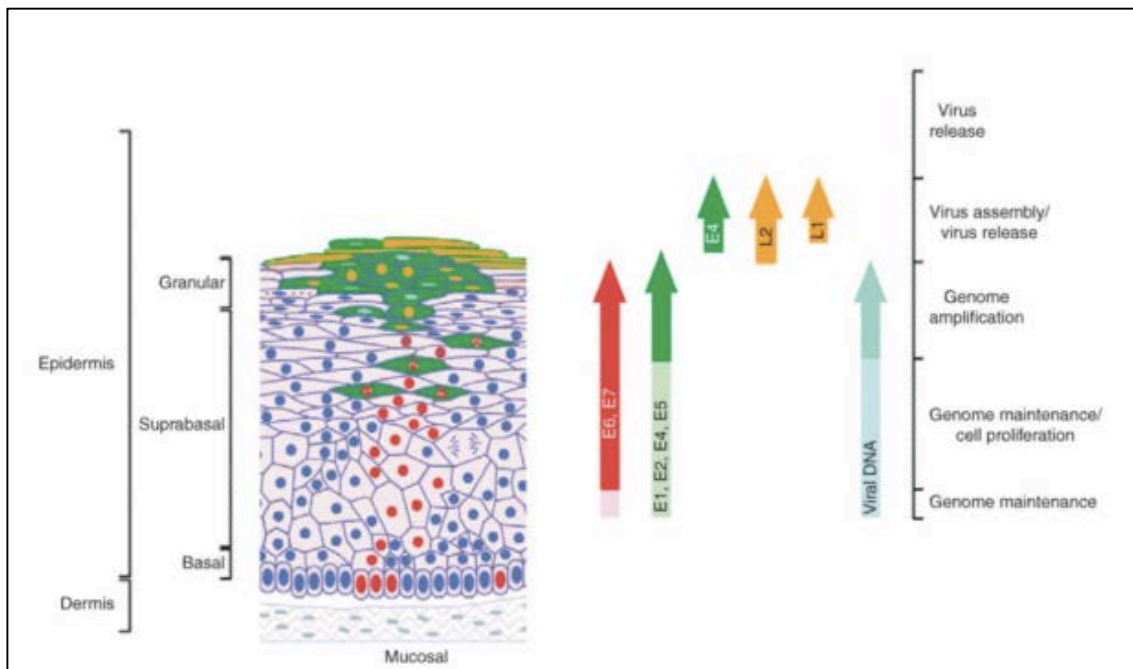


Figura 3: Història natural de la infecció per VPH. Infecció epitelial VPH (12)

Interacció virus-hoste. Immunitat de la infecció per VPH

La presència de partícules virals en la superfície de l'epiteli cervical i del tracte genital inferior procedeix del contacte sexual amb una parella infectada. En la majoria de situacions, aquestes partícules virals són eliminades de forma mecànica en ser arrossegades durant la descamació de l'epiteli estratificat, o bé pels agents de la immunitat específica, com els macròfags. En ambdós casos, aquestes partícules virals passen desapercebudes pels agents de vigilància immune específica i no provoquen efecte citopàtic ni resposta immunològica.

El primer pas per la infecció cel·lular requereix el contacte de les partícules virals amb la seva àrea natural de tropisme, situada en el terç inferior de l'epiteli on es repliquen les cèl·lules basals. Aquest contacte es veu afavorit pels micro-traumes ocasionats en la relació sexual i per les característiques favorables de l'epiteli com poden ser l'ectòpia i la metaplàsia escamosa, freqüents en dones joves. En aquests nivells, els agents de la immunitat inespecífica, fonamentalment inflamatoris i anticossos naturals mediat per la immunitat innata, són capaços d'eliminar una bona part de les partícules virals que colonitzen l'epiteli. En aquest cas, la resposta cel·lular pot produir mínimes alteracions a nivell histològic i no existeix resposta d'anticossos específics. Un

cop el VPH ha penetrat dins l'epiteli, és reconegut i capturat per les cèl·lules dendrítiques o de Langerhans, que actuen com a cèl·lules presentadores d'antígens (CPA) i constitueixen la connexió cel·lular entre el sistema immune innat i l'adaptatiu.

Com el VPH és un patogen intracel·lular estricte, requereix internalitzar-se en la cèl·lula hoste per tal que es consideri una infecció verdadera. Aquest mecanisme és bàsic per comprendre el mecanisme d'interacció virus-hoste i és la base on es sustenta la capacitat profilàctica de les actuals vacunes anti-VPH.

La internalització de les partícules, requereix el reconeixement de les mateixes per un receptor de la superfície de la cèl·lula que a la seva vegada provoca un canvi conformacional superficial que permet l'endocitosi de les mateixes.

Un cop s'ha produït la internalització en la cèl·lula, tots els mecanismes d'anticossos naturals o vacunals són inútils per resoldre la infecció, sent en individus competents la immunitat cel·lular l'encarregada d'eliminar el conjunt de cèl·lules infectades.

En casos on la immunitat cel·lular no sigui competent, la persistència del virus farà aparèixer canvis cel·lulars acumulatius derivats dels errors intrínsecs cel·lulars (13).

Evasió tumoral, persistència de la infecció viral

Molts virus son capaços de mantenir infeccions a llarg termini sense efectes citopàtics, però amb producció de virions, bé de forma crònica o bé amb reactivacions productives intermitents.

La persistència de la infecció viral requereix l'evasió de la detecció i l'eliminació de les cèl·lules virals pel sistema immune. Aquests processos d'evasió poden produir-se per diferents vies; en certs casos els virus presentaran antígens de superfície molt variables que condueixen a la síntesi d'un excés d'anticossos no neutralitzants, que poden arribar a interferir amb els realment neutralitzants. Un altre mecanisme d'evasió ha estat observat en certs tumors en els que la resposta immunitària és evitada mitjançant la depleció de l'expressió de molècules del complex d'histocompatibilitat principal (MHC). Aquest mecanisme d'evasió s'evidencia fonamentalment en aquells tumors en els que no es pot mimetitzar la presència d'antígens de superfície, per ser necessaris pel manteniment del fenotip tumoral.

La incapacitat del sistema immune per resoldre la infecció en un termini de temps curt o mig, generalment menor de dos anys augmenta les possibilitats que existeixi un dany cel·lular continuat i com a conseqüència un procés de susceptibilitat a la neoplàsia. La persistència d'infecció per sobre d'aquest termini consisteix un factor de risc demostrat i necessari per la transformació cel·lular (13).

Infeccions productiva, transformant i latent

Una vegada el virus ha aconseguit internar-se a la cèl·lula que ha de servir com a hoste, emprerà la maquinària biològica d'aquesta per desenvolupar un cicle vital que li permeti la seva replicació i disseminació, originant una *infecció productiva*. El temps de replicació, la seva cinètica, la seva capacitat d'interaccionar amb proteïnes cel·lulars i la possibilitat de destrucció del seu hoste dependran, no només del tipus o subtipus del virus, sinó també de les interaccions amb l'entorn. La capacitat dels VPH de bloquejar la funció de les proteïnes p53 i Rb, ambdues reguladores del cicle cel·lular amb una funció supressora tumoral, és exclusiva dels tipus d'alt risc i requereix una permissivitat immunològica i en molts casos, complexos processos d'integració viral i interrelació amb altres proteïnes del cicle cel·lular, que donarà lloc a la *infecció transformant*.

Tant el reconeixement de la infecció viral per la cèl·lula hoste com el tropisme específic de cada subtipus viral determinaran els efectes citopàtics en els teixits específics. Per aquesta raó, podem diferenciar entre *infecció latent*, que no mostrarà els seus efectes durant llargs períodes de temps, i *infecció productiva* amb efectes citopàtics pràcticament immediats. Podem classificar de forma diferent en funció d'aquests paràmetres el nivell immunogènic o antigènic de cada virus, cosa que servirà de base de coneixement per la construcció de vacunes profilàctiques o terapèutiques (13).

En el cèrvix uterí i altres òrgans s'han identificat lesions intraepitelials que representen passos intermedis en el procés pel qual les cèl·lules evolucionen des de la normalitat fins adquirir canvis premalignes. Aquesta evolució de l'oncogènesis en múltiples fases és conseqüència de successives alteracions genètiques desencadenades per la desregulació del cicle cel·lular derivada de la infecció per VPH d'alt risc (VPH-AR).

Una cèl·lula no infectada i competent en les seves funcions té un estricte mecanisme de control que s'encarrega d'iniciar el cicle cel·lular i reparar l'ADN prèviament a cada divisió cel·lular evitant que els errors genètics, inherents al procés de replicació i afavorits per certs cofactors com el tabac, s'acumulin en el genoma cel·lular.

Cada canvi genètic és detectat per un complex sistema de control del cicle cel·lular i reparat amb la mediació de proteïnes com p53 y Rb. La presència de seqüències genòmiques dels VPH d'alt risc és considerada pel sistema de control del cicle cel·lular com un esdeveniment irreparable i la cèl·lula infectada és conduïda a la apoptosis. El fet de que el sistema de control provoqui la mort cel·lular amb tot el seu contingut viral ha conduït al desenvolupament d'una estratègia defensiva, per part del VPH-AR, encaminada a l'evasió d'aquest procés de control cel·lular en les cèl·lules afectades, les conseqüències de la qual porten a una transformació neoplàsica i per tant l'evasió de la destrucció cel·lular.

Els VPH infecten les cèl·lules basals de l'epiteli cervical i aprofiten el procés de diferenciació de l'epiteli per sintetitzar les proteïnes que li permetran originar noves partícules víriques. Les cèl·lules epitelials infectades activen el seu mecanisme de defensa que consisteix en una revisió de la seqüència d'ADN abans de dividir-se. Aquest està dirigit per una seqüència de proteïnes entre les quals es destaca la p53 i la proteïna retinoblastoma (Rb). Quan la cèl·lula localitza l'ADN viral, en un procés perfectament regulat, intenta reparar l'error, i donat que aquest ADN és excessivament gran com per ser eliminat, p53 i Rb dirigeixen la cèl·lula cap a una mort cel·lular programada per apoptosis, evitant així que la cèl·lula serveixi de propagadora d'infecció. Els tipus de VPH-AR es protegeixen d'aquest mecanisme cel·lular sintetitzant unes proteïnes que bloquegen el sistema de defensa cel·lular. La traducció dels gens E6 i E7 donarà lloc a la síntesi de les proteïnes E6 i E7 que respectivament seran capaces de bloquejar a p53 i Rb del cicle cel·lular i evitar la mort de la cèl·lula per apoptosis, utilitzant-la com a centre de producció de partícules virals (12–15)

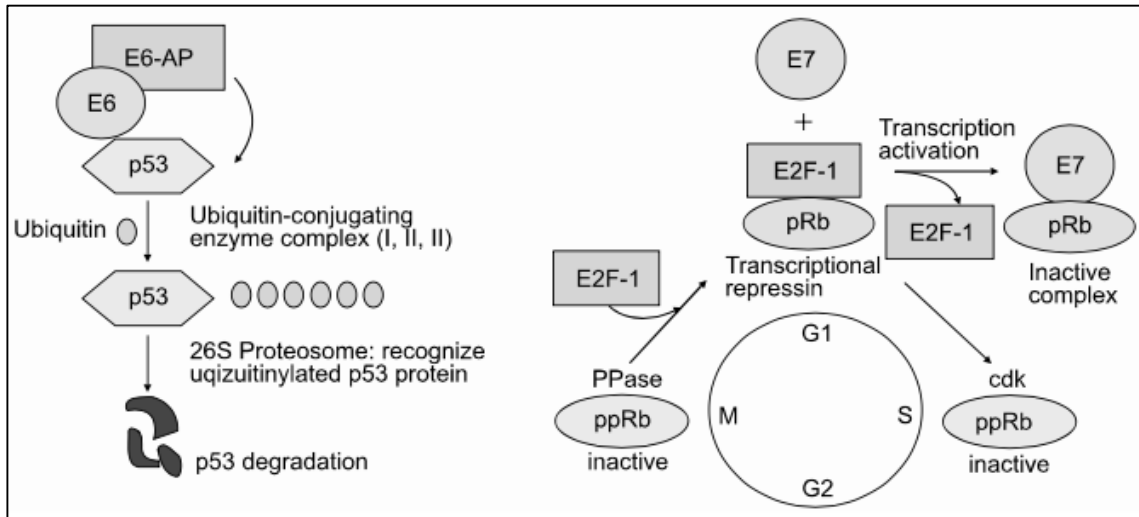


Figura 4: Degradació i inactivació dels supressors tumorals pRb i p53 per les oncoproteïnes E6 i E7 (14)

VIRUS DE PAPIL·LOMA HUMÀ I CÀNCER DE CÈRVIX

Un dels descobriments més importants en la investigació etiològica del càncer dels últims 25 anys ha estat la demostració de la relació causal entre la infecció persistent de determinats genotips del Virus de Papil·loma Humà (VPH) i el posterior desenvolupament del càncer de cèrvix.

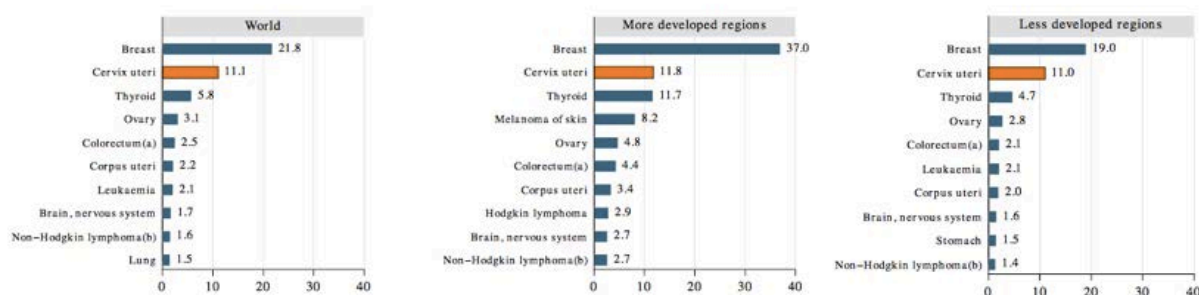


Figura 5: Comparació de la freqüència dels càncers en dones de 15 a 44a, en el món, països desenvolupats i països en vies de desenvolupament (16)

El càncer de cèrvix és el segon càncer més comú i letal a nivell mundial amb estimacions de 527.624 casos/any i unes 265.000 morts/any. Més del 80% dels càncers cervicals diagnosticats i les morts relacionades succeeixen en països en vies de desenvolupament (17).

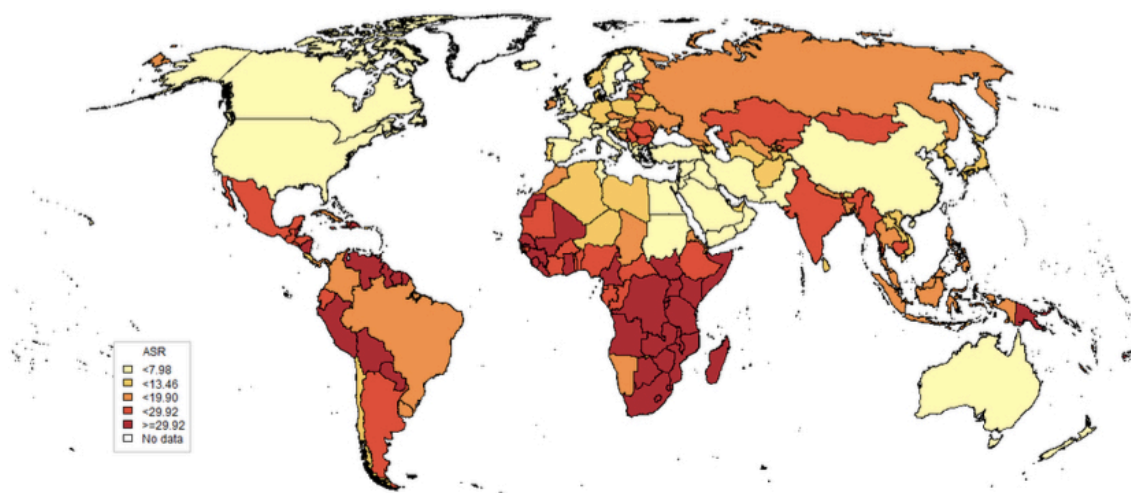


Figura 6: Tasa d'incidència estandaritzada de càncer de cèrvix per edat al món (18)

A Europa es diagnostiquen 58.373 càncer de cèrvix anuals, i el càncer cervical presenta una incidència baixa (menor a 11,4/100.000) mentre que en països en vies de desenvolupament, la incidència és superior a 30/100.000.

A Espanya, la incidència del càncer cervical és una de les més baixes d'Europa, concretament 7,8/100.000 habitants amb 2.511 nous càncers diagnosticats anualment (dades del 2012). El càncer de cèrvix representa la desena causa de neoplàsia en les dones i si ens fixem en el subgrup de dones d'entre 15 i 44 anys el situem en segona posició.

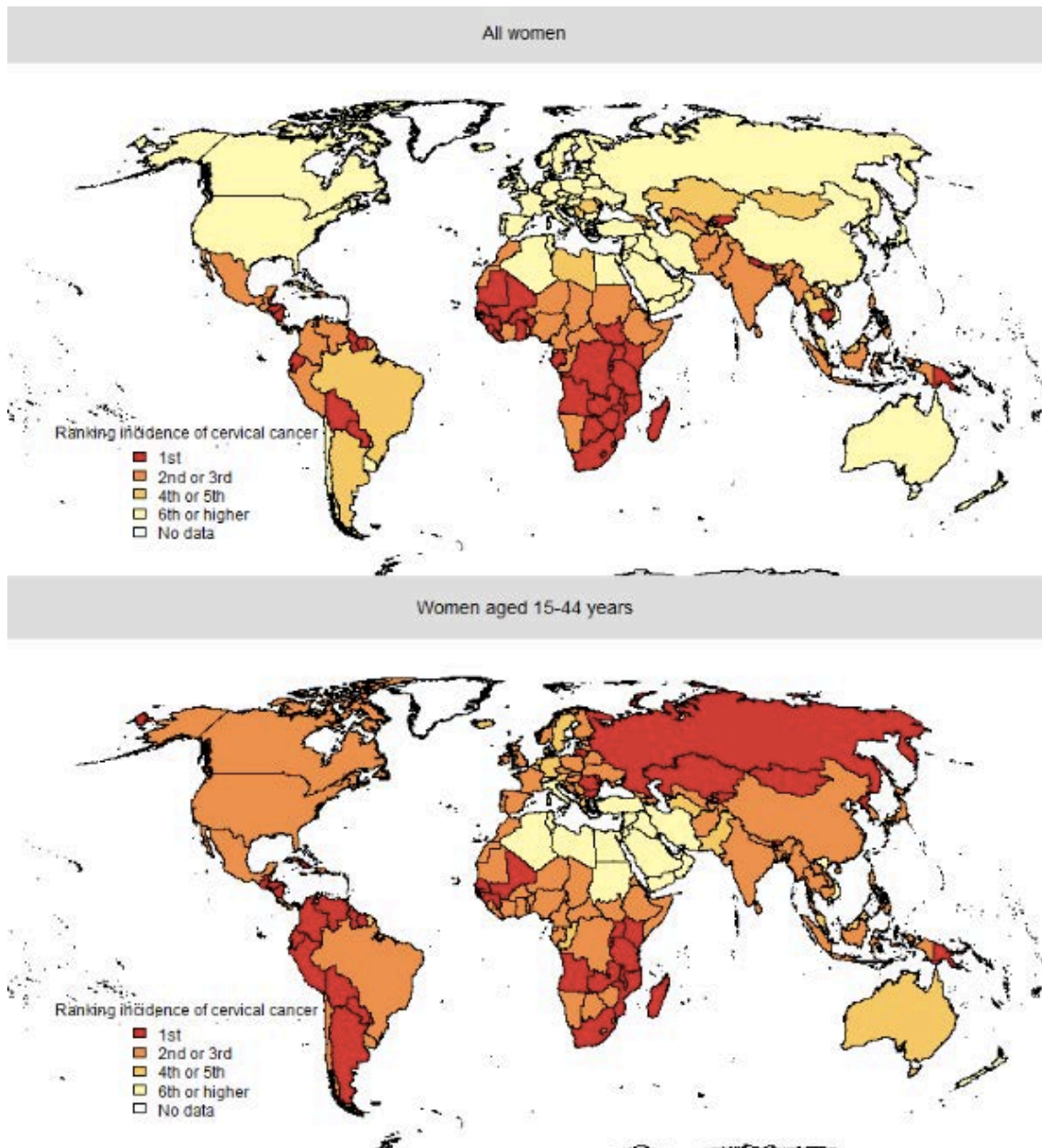


Figura 7: Rànquing del càncer cervical versus altres tipus de càncer a nivell mundial, en totes les dones i dones de 15 a 44 anys (17)

El càncer de cèrvix és la tercera causa de mortalitat en totes les dones a nivell mundial, però si ens fixem en dones d'entre 15 i 44 anys, el situem en segona posició. Si establim un rànquing entre els diferents països, molts països d'Amèrica del Sud, Rússia i gran part del continent africà el situen com a primera causa de mort en dones d'entre 15 i 44 anys.

A Espanya s'estima que l'any 2016 es van produir 848 morts per càncer de cèrvix, amb una mortalitat de 2,1/100.000 habitants. És la tretzena causa de mort en dones de totes les edats i tercera causa de mort si ens fixem en les dones d'entre 15 i 44 anys (16).

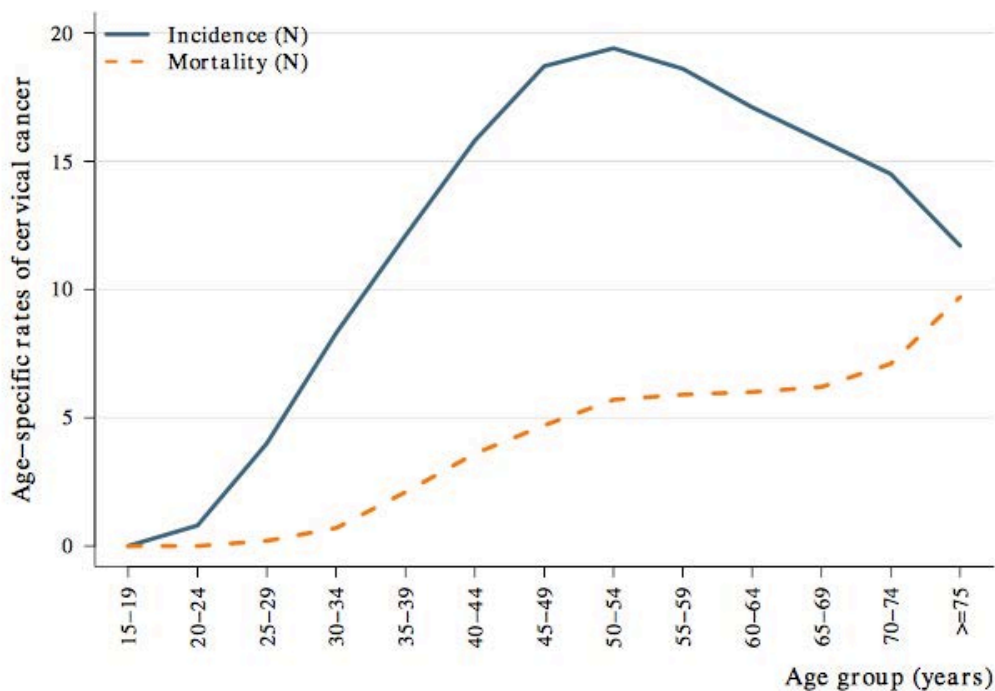


Figura 8: Incidència del càncer cervical i mortalitat a Espanya per edat (19)

Prevalença de la infecció per VPH a Espanya, Europa i el món.

La infecció per VPH és la malaltia de transmissió sexual més freqüent a nivell mundial. S'identifica freqüentment en el tracte genital masculí i femení sense lesions clíniques. La seva prevalença és molt elevada en homes i dones sexualment actives, i evoluciona de forma natural cap a la curació espontània en el 80% dels casos.

És difícil fer estimacions del volum de dones portadores de VPH i de les lesions associades. Una aproximació de la prevalença d'ADN de VPH en la població femenina oscil·laria entre el 5% i el 10% en els països desenvolupats i unes xifres lleugerament superiors al 15% en països en vies de desenvolupament.

La prevalença d'ADN de VPH també varia en funció dels grups d'edat. En la segona dècada de la vida s'estima una prevalença entre el 20-25%, però en alguns grups d'adolescents la infecció pot arribar a afectar fins al 70% dels individus. A partir de la tercera dècada comença a disminuir considerablement i a partir dels 35anys es manté estable en uns valors pròxims al 5-10%.(8,18,19)

Taula 2: Prevalença d'infecció per VPH en dones amb citologia normal a Espanya i comparativament a Europa i al món (29,144)

País/Regió	Dones examinades	Prevalença del VPH (%)
Espanya	4.018	9,0 (8,1-9,9)
Europa	41.726	9,7 (9,69-9,9)
Món	436.430	11,4 (11,3-11,5)

Distribució i prevalença dels diferents genotips del VPH a nivell mundial, Europa i Espanya

En dones amb citologia normal, els cinc genotips més freqüents a nivell mundial per ordre són el VPH 16, el VPH 18, el VPH 31, el VPH 58 i el VPH 52, representant entre tots el 50% de totes les infeccions per VPH.

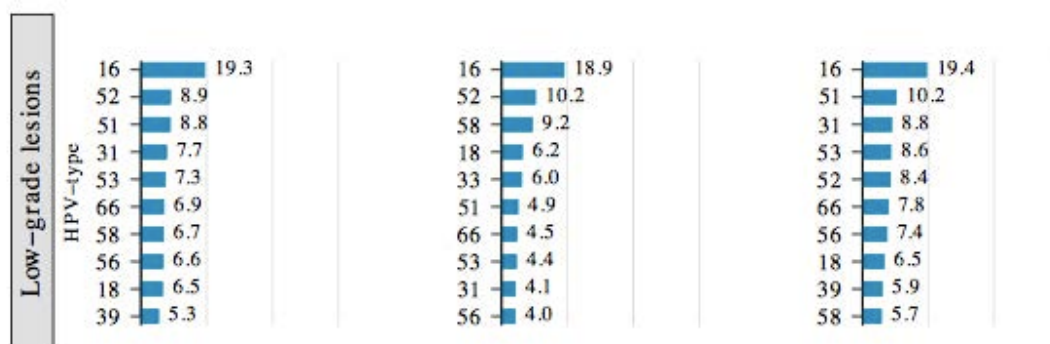


Figura 9: Prevalença del VPH en lesions de baix grau a nivell mundial, països en vies de desenvolupament i països desenvolupats

La positivitat global per VPH en les lesions intraepiteliais de baix grau (LSIL) oscil·la segons els diferents estudis entre 29% i el 100%. La darrera revisió de l'Institut Català d'Oncologia (ICO) , actualitzada l'abril d'aquest any, determina que, a nivell mundial el VPH tipus 16 és el més freqüent en aquestes pacients (19,3%), seguit del VPH 52 (8,9%), VPH 51 (8,8%), 31 (7,7%), 53 (7,3%), 66 (6,9%), 58 (6,7%), 56 (6,6%) i 18 (6,5%). El VPH tipus 16 va ser el tipus més prevalent a nivell mundial, tot i que la representació del VPH tipus 18 va presentar una variabilitat significativa (8,19–21).

A destacar, que en països en vies de desenvolupament el VPH tipus 18 té una prevalença major i que la determinació de VPH 31 és molt menor. En els països desenvolupats, la detecció del VPH tipus 31 està en tercera posició, i la detecció de VPH torna a disminuir fins a la vuitena posició.

A continuació observem les prevalences de les lesions cervicals de baix, alt grau i càncer cervical a Espanya:

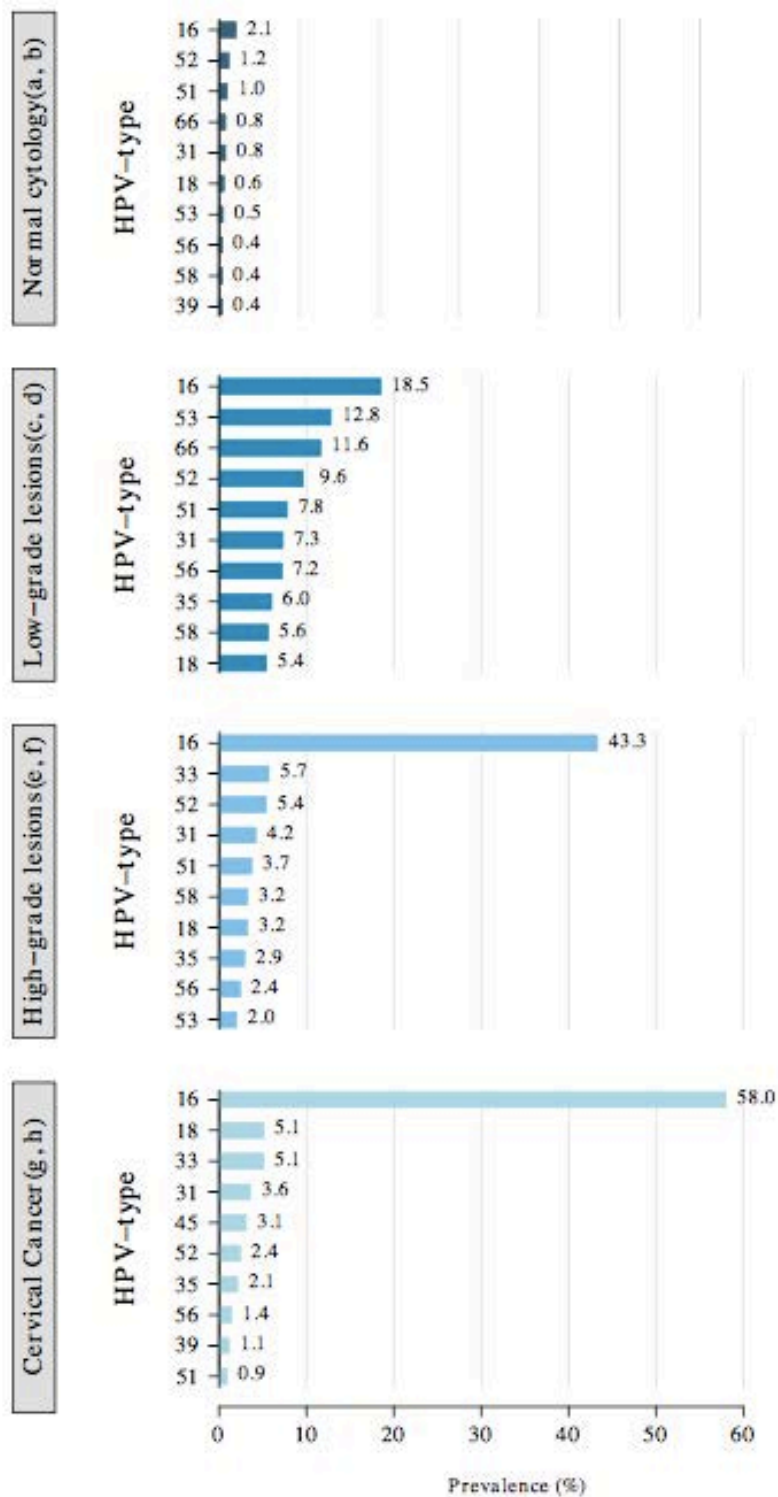


Figura 10: Distribució dels 10 genotips de VPH més freqüents en dones amb citologia normal, lesions de baix grau, lesions d'alt grau i càncer de cèrvix a Espanya(16)

La figura anterior mostra la prevalença del VPH específic per pacients amb citologies normals, lesions de baix grau, lesions d'alt grau o càncer cervical a Espanya. Així, en les

lesions cervicals de baix grau, observem que el genotip més freqüentment aïllat és el VPH 16 (18,5%), seguit del VPH 53 (12,8%), VPH 66 (11,6%), VPH 52 (9,6%), VPH 51 (7,8%), VPH 31 (7,3%), VPH 56 (7,2%), VPH 35 (6,0%), VPH 58 (5,6%) i VPH 18 (5,4%) (17).

Un exhaustiu meta-anàlisi de 53 estudis publicats fins al febrer de 2002 va incloure un total de 4338 casos de lesions intraepitelials d'alt grau (HSIL). Els tipus de VPH més comuns identificats són, per ordre descendent de prevalença, els VPH 16, 31, 58, 18, 33, 52, 35, 51, 56, 45, 39, 66 i 6. Els vuit tipus més comuns en el càncer de cèrvix, exceptuant la menor freqüència del VPH 18 i la absència del VPH 45. El VPH tipus 16 és el tipus més comú en les HSIL en totes les regions mundials incloses a l'anàlisi (22).

En dones amb càncer de cèrvix, els genotips de VPH més freqüents a nivell mundial són el VPH 16, el VPH 18, el VPH 58, el VPH 33, el VPH 45, el VPH 31, el VPH 52 i el VPH 35, que representen el 91% del total de casos de càncer invasor. A Europa, el VPH 16 representa el 60% dels casos de càncer invasor, seguit del VPH 18 (10-15%) i el VPH 33 (5%). A Espanya, el VPH 16 representa prop del 50% dels casos de càncer de cèrvix, seguit del VPH 31 (5%), el VPH 18 (4%), VPH 45 (4%) i el VPH 33 (3%) (8,19,22,23).

El continent africà és la zona amb major prevalença d'infecció per VPH (22%), sent les dones africanes les que tenen més risc de desenvolupar un càncer de coll uterí per ser les que segueixen menys el cribratge. L'edat precoç d'inici de relacions sexuals amb homes adults, homes amb múltiples parelles, les pobres condicions higièniques i la infecció per VIH poden ser alguns dels factors que expliquen l'alta prevalença de VPH en aquesta zona.

Transmissió de la infecció per VPH

Tant l'home com la dona poden ser portadors asimptomàtics de la infecció per VPH. El virus es transmet amb facilitat per contacte sexual a través d'erosions mínimes produïdes en el moment del coit. Els òrgans més susceptibles de ser infectats són el cèrvix uterí i la línia pectínia del canal anal.

Tot i que sabem que la transmissió coital és la via més freqüent, degut al trauma del coit, s'han estudiat altres mecanismes de transmissió, com pot ser la via materno-fetal o per fomites.

El fet que existeixi una freqüència major de carcinomes al cèrvix uterí és degut a la presència d'una zona de transformació en la unió escamocolumnar, zona molt inestable on existeix un canvi continu de l'epiteli glandular a escamós.

Els VPH aprofiten la dinàmica cel·lular per replicar-se i en el cèrvix es beneficien de la maduració de l'epiteli metaplàsic per expressar els seus gens de forma seqüencial. En primer lloc, en les capes basals, els gens precoços i després en les capes superficials més diferenciades s'expressen les seves proteïnes tardanes (L1 i L2), que formen la càpside i permeten l'ensamblatge de les noves partícules virals que s'alliberen i repeteixen el cicle infecciós.

Cofactors d'adquisició

El procés de carcinogènesi cervical suposa la implicació d'una sèrie d'esdeveniments, el més important dels quals és l'activitat sexual, ja que és l'esdeveniment que permet l'entrada del VPH en les cèl·lules basals de l'epiteli cervical. Si la infecció inicial no es resol i es fa persistent, pot iniciar-se un procés d'oncogènesi que pot induir lesions escamoses intraepitelials (CIN) de diversos graus (CIN1, CIN2, CIN3/carcinoma in situ), moltes d'elles reversibles. És important destacar que les taxes de regressió de les lesions de CIN són molt elevades. El 70% de les lesions en estadis inicials (LSIL/CIN1) regressen en el primer any i el 80% de forma acumulada en el segon i aconsegueixen eliminar la infecció i normalitzar l'epiteli cervical. Només el 20% de les lesions CIN2+ regressen a la normalitat.

En la infecció per VPH i el procés de carcinogènesi intervenen una sèrie de factors i cofactors, alguns dels quals afavoreixen la regressió de la malaltia mentre que d'altres modulen la progressió de la mateixa. Els factors de risc que augmenten la probabilitat d'adquirir i infectar-se per VPH són l'edat precoç de les relacions sexuals i el número de parelles al llarg de tota la vida. L'ús sistemàtic del condó i la circumcisió masculina s'han identificat com factors que el disminueixen (24).

Risc de progressió. Cofactors

Tot i que la infecció per VPH és molt freqüent, la majoria de pacients fan l'aclariment de la malaltia. Per tant, és necessària la presència d'altres cofactors que intervinguin en la carcinogènesi un cop instaurada la infecció.

Existeixen tres grups de cofactors potencials:

- Cofactors mediambientals:
 - **Paritat:** Diversos estudis associen paritat elevada i càncer cervical. El motiu d'aquesta associació podrien ser els factors hormonals associats a l'embaràs, el traumatisme cervical el moment del part o la major persistència de la zona de transformació exocervical (25).
 - **Anticonceptius hormonals:** L'ús a llarg termini dels anticonceptius orals podria augmentar el risc de càncer de cèrvix (26).
 - **Tabac:** El tabaquisme és un dels factors ambientals més uniformement identificats amb el risc de patir lesions precanceroses i càncer cervical. En dones infectades per VPH, el tabac és el cofactor més important de progressió, amb un augment del risc de 2-4 vegades més que les no fumadores (27).
 - **Immunosupressió:** La resposta immunològica deficient al VPH predisposa a la persistència de la infecció (28).
 - Immunodepressió iatrogènica: les pacients trasplantades que reben teràpia immunodepressora tenen major risc d'infectar-se pel VPH i de desenvolupar un CIN
 - Immunodepressió per VIH: les dones amb VIH contrauen més fàcilment la infecció per tipus de VPH d'alt risc i tenen un risc augmentat de lesions intraepitelials i càncer. El VIH altera la història natural del VPH, provocant un comportament més agressiu i amb més recidives.
 - **Infeccions associades:** les dones amb coinfecció per VPH i VHS-2 o *Chlamydia trachomatis* sembla que tenen una major prevalença de càncer cervical. Aquest fet també podria estar relacionat amb l'alteració de la immunitat local (29).

- Cofactors virals

- **Genotip viral:** El VPH-AR tenen més risc de desenvolupar malaltia cervical. Els VPH més freqüentment implicats en el desenvolupament del càncer cervical són el VPH tipus 16 i 18 provocant fins el 70% dels càncers (30).
- **Càrrega viral:** És un marcador de malaltia persistent. Una càrrega viral elevada implica una major probabilitat d'integració de l'ADN viral en el genoma de l'hoste. Tot i això és discutible la utilitat de la càrrega viral per pronosticar l'evolució a càncer ja que s'han trobat casos de neoplàsies invasores amb càrrega viral baixa. A més a més, la quantificació de la càrrega viral depèn en molts casos, de la presa de la mostra (31).
- **Integració:** La integració de l'ADN viral en l'ADN de l'hoste és determinant en la transformació maligna. Hi ha estudis que suggereixen la capacitat del VPH tipus 16 pot induir la transformació maligna sense que hi hagi integració (32).
- **Coinfecció per diferents tipus de VPH:** Podria augmentar el risc de progressió.

- Cofactors de l'hoste

Les variacions genètiques individuals dels gens relacionats amb la resposta immunitària, humoral i cel·lular poden influir en la persistència de la infecció per VPH i la seva progressió a càncer.

ESTRATÈGIES DE PREVENCIÓ DEL CÀNCER DE CÈRVIX

La prevenció del càncer de cèrvix és un dels aspectes més importants de la ginecologia preventiva. L'objectiu principal d'un mètode de cribratge és la reducció de la mortalitat per CCU, reducció de la incidència de càncer invasor i microinvasor, descens de la incidència de CIN3 i augment de les taxes de detecció de CIN3+. A més a més, ha d'évitar la detecció de lesions cervicals no progressives que suposa un sobrediagnòstic i per tant evitar tractament innecessaris i disminuir els costos (33).

Actualment, disposem de dues estratègies de prevenció; primària mitjançant la vacunació o secundària mitjançant els programes de cribratge de càncer de cèrvix.

PREVENCIÓ PRIMÀRIA: VACUNACIÓ

La prevenció primària consisteix en realitzar una actuació abans que aparegui la malaltia, sobre els factors causals i de risc modificables que influeixen en la etiologia.

La vacunació contra el VPH es va incorporar al calendari de vacunacions sistemàtiques de Catalunya l'any 2008, seguint una estratègia consensuada amb la resta de comunitats autònomes i l'Estat al Consell Interterritorial del Sistema Nacional de Salut (CI del SNS).

Disposem de dues vacunes profilàctiques contra el VPH. Aquestes vacunes estan compostes per partícules semblants als virus natius (VLPs). Es tracta d'estructures esfèriques conformades a partir de la propietat d'ensamblatge de la proteïna L1, gen estructural immunogen major de la càpside viral, obtinguda per recombinació genètica al laboratori. No són infeccioses perquè els hi falta ADN del VPH. Tenen una morfologia similar als virions i no tenen capacitat infectiva, replicativa ni oncogènica.

Taula 3: Diferències entre les dues vacunes contra VPH(37)

Característiques		
Laboratori	<i>GlaxoSmithKline</i>	<i>MerckResearchLaboratoris Sanofi Pasteur/MSD</i>
Nom comercial	Cervarix®	Gardasil®
Principi actiu	VLPs : 16, 18 (20µg, 20µg)	VLPs: 6, 11, 16, 18 (20µg, 40µg, 40µg, 20µg)
Sistema d'expressió de la proteïna L1	Baculovirus que utilitza cèl·lules Hi-5 Rix4446 derivades de Trichoplusia	Saccharomyces cerevisiae CANADE 3C-5
Adjuvant	Formulació AS04: 500 µg d'hidròxid d'alumini i 50 µg de monofosforil lípid A	225µg d'hidroxfosfat sulfat d'alumini amorf

Indicacions de la vacunació:

Nenes de 9 a 14 anys: Màxima prioritat pel seu màxim potencial preventiu.

Dones fins a 25-26 anys: Alta prioritat per l'evidència de l'alt potencial preventiu.

Dones de 27 a 45 anys: No és eficient la vacunació des de la perspectiva de Salut Pública, per tant hem d'individualitzar cada cas. Tot i això múltiples estudis demostren que la majoria de dones sexualment actives podrien beneficiar-se per la vacunació.

Homes: Aprovada en nens de 9 a 15 anys i en la protecció de berrugues genitals i anals i AIN en homes homosexuals fins als 26 anys.

Taula 4: Règim de vacunació en funció de la vacuna administrada

GARDASIL	CERVARIX
De 9 a 13 anys (inclòs) Administració seguint pauta de 2 o 3 dosis (0 i 6 mesos; 0, 2 i 6 mesos)	De 9 a 14 anys Administració seguint pauta de 2 dosis (0, 5-13 mesos)
A partir de 14 anys Administració seguint pauta de 3 dosis (0,2 i 6 mesos)	A partir de 15 anys Administració seguint pauta de 3 dosis (0, 1 i 6 mesos)

La vacunació a Catalunya té una cobertura de 74,7% en nenes de 12a, cobertura del 3,5% en dones de 25 a 45 anys.

Característiques de les vacunes

La duració de la protecció és desconeguda. A dia d'avui, els estudis indiquen que les vacunes són efectives i no existeix disminució de la protecció, podria se de per vida.

Ambdues vacunes són altament immunògenes, segures i eficaces contra les lesions preneoplàsiques del tracte genital inferior femení, mantingudes en el temps de la mig post-vacunació. Com a efectes secundaris, els més freqüents són els símptomes locals com dolor eritema i inflor, d'entre els símptomes generals, els més freqüents son la cefalea i la fatiga.

La vacuna tetravalent ofereix eficàcia front les berrugues genitals en dones i homes i contra lesions precursoras del càncer anal en homes. Ambdues vacunes presenten algun grau de protecció creuada contra els tipus no vacunals (especialment la bivalent). Això és degut a que l'adjuvant general una resposta immunitària cel·lular i sistèmica.

La vacunació sistemàtica té la potència de reduir en 2/3 parts el número de morts per càncer de cèrvix al món, en el cas que es vacuessin totes les dones i si la vacuna tingués una protecció de llarga durada, fet que encara desconeixem degut a la comercialització relativament nova de les vacunes.

Vacuna nonavalent

El Gardasil 9 és una vacuna nonavalent recombinant adjuvada no infecciosa. Està preparada a partir de partícules similars al virus (VLPs) altament purificades de la proteïna L1 de la càpside major de 9 tipus de VPH (6,11,16,18,31,33,45,52 i 58). S'utilitza el mateix hidroxifosfat sulfat d'alumini amorf com adjuvant de la vacuna Gardasil. Les VLPs no poden infectar cèl·lules, reproduir-se ni causar malaltia. Es creu que l'eficàcia de les vacunes de VLP L1 està mediada pel desenvolupament de la resposta immune humoral.

Basant-se en estudis epidemiològics, es preveu que Gardasil 9 protegeixi front els tipus de VPH que causen aproximadament: el 90% dels càncers cervicals, més del 95% dels adenocarcinoma in situ (AIS), el 75-85% de les neoplàsies cervicals intraepitelials (CIN2-3) d'alt grau, el 85-90% dels càncers vulvars relacionats amb el VPH, el 90-95% de les neoplàsies vulvars intraepitelials (VIN2-3) d'alt grau relacionades amb el VPH, el 80-85% dels càncers vaginals relacionats amb el VPH, el 75-85% de les neoplàsies vaginals intraepitelials (VaIN 2-3) d'alt grau relacionats amb el VPH, el 90-95% dels càncers anals relacionats amb el VPH, el 85-90% neoplàsies anals intraepitelials (AIN2-3) d'alt grau relacionats amb el VPH i el 90% de les berrugues genitals (34,35).

La indicació de Gardasil 9 es basa en:

- Immunogenicitat no inferior entre Gardasil 9 i la vacuna Gardasil en nenes de 9 a 15 anys d'edat, dones i homes de 16 a 26 anys. L'eficàcia front la infecció persistent i malaltia relacionada amb els VPH 6,11,16 i 18 és comparable a la vacuna antiga de Gardasil.
- Demostració de l'eficàcia front la infecció persistent i malaltia relacionada amb els tipus 31, 33, 45, 52 i 58 de VPH en nenes i dones de 16 a 26 anys d'edat (36).

Factors de risc

Múltiples estudis han estudiat els possibles factors de risc, tant d'adquisició de la infecció per VPH, com de persistència. En la prevenció primària és important incidir en els factors de risc per tal d'intentar disminuir el risc de contagi.

Entre els factors de risc d'adquisició del VPH ens trobem:

- Inici precoç de les relacions sexuals
- Adquisició de nous companys sexuals
- Interval curt entre companys sexuals
- Numero de companys sexuals
- Company sexual masculí de risc
- Ús no sistemàtic de preservatiu
- Coinfecció amb altres malalties de transmissió sexual com la *Chlamydia Trachomatis* i l'*Herpes simple II*.

Entre els factors promotors en la transició d'infecció VPH a lesió precursora:

- Multiparitat
- Tabaquisme
- Contraceptius hormonals
- Altres malalties de transmissió sexual

Existeixen, d'altra banda, factors protectors front la infecció per VPH com pot ser la circumcisió masculina, la utilització de DIU, la participació en programes de cribatge i la participació en programes de vacunació.

Una bona prevenció primària obliga a fer una promoció de la salut, tot incidint en aquells factors de risc, tant d'infecció per VPH com per persistència de la mateixa un cop l'hem adquirit.

PREVENCIÓ SECUNDÀRIA: METODES DE CRIBRATGE

El càncer de coll d'úter és la segona neoplàsia més freqüent en el món en les dones d'entre 15 i 44 anys. El cribratge de dones sanes mitjançant citologia cervical ha demostrat clarament la seva eficàcia, donat que la seva aplicació de forma adequada i sistemàtica en determinats països ha aconseguit reduir en un 70-80% la incidència i mortalitat per càncer cèrvix uterí (CCU). Aquest benefici es deu a la detecció de lesions premalignes asimptomàtiques, el diagnòstic de les quals i el seu conseqüent tractament evita la progressió a carcinoma invasor ((37).

En les darreres dècades, múltiples estudis han demostrat que el VPH és l'agent causal de pràcticament tots el càncers de cèrvix i de les seves lesions precursors (6,38,39).

Un numero limitat de genotips de VPH han estat implicat en la carcinogènesi del càncer. Així els VPH tipus 16 i 18 són els responsables del 70% de càncers a nivell mundial. Tot i això, més del 90% de les infeccions són transitòries i per tant irrelevantes des del punt de vista oncogènic.

Durant els primers anys de vida sexual, s'observa una elevada incidència d'infecció per VPH, però la majoria de lesions son transitòries i desapareixen espontàniament. Les dones majors de 30 anys experimenten una clara disminució de la prevalença d'aquestes lesions, però el percentatge d'infeccions en aquestes dones és més persistent, fet que explica un major risc i incidència de lesions precursors a partir d'aquesta edat. Per tant, les proves de detecció del VPH constitueixen un marcador molt sensible i precoç del risc de càncer de cèrvix i de les lesions precursors, especialment en dones majors de 30 anys.

En els darrers anys, la majoria de societats científiques han inclòs en les seves recomanacions les proves de detecció del VPH en diferents àmbits de la prevenció secundària del CCU (pacients mal cribades, posttractament, selecció de conducta en citologies anormals)

La *European Guidelines for quality assurance un cervical càncer screening*, publicada l'any 2010, recomana una política de cribratge pels països europeus (40). El CCU és un problema de salut a nivell mundial amb 500.000 casos nous detectats, dels quals més

d'un 80% es detecten a països en vies de desenvolupament. A la unió europea, es diagnostiquen anualment 34.000 nous casos i més de 16.000 morts són secundàries a aquesta neoplàsia (40).

La baixa incidència en països industrialitzats es deu, en part, a l'efectivitat dels programes de cribratge organitzats, que han aconseguit un increment de la detecció de les lesions invasores en estadis precoços i a la detecció o tractament de les lesions precursors, disminuint la seva incidència.

Tècniques de cribratge

La introducció de la **citologia cervical** per la prevenció del càncer de cèrvix ha estat un dels esdeveniments més significatius en la reducció del CCU. En alguns països amb cribratge poblacional s'ha vist reduïda la seva incidència fins al 70%. Tot i això, la citologia és un mètode amb baixa sensibilitat i especificitat. Aquestes xifres justifiquen un exhaustiu control de qualitat i la necessitat de repetir la presa citològica freqüentment.

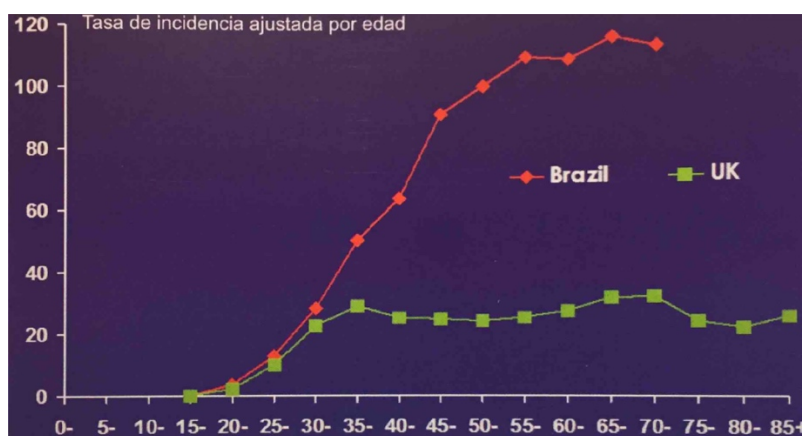


Figura 11: Efecte del cribratge sobre la incidència de càncer de cèrvix (sense cribratge, Brasil- Cribratge poblacional, UK) (41)

Les limitacions dels cribratge citològic són:

- La inassistència al programa de cribratge
- Els resultats depenen de la qualitat de la presa
- És un mètode d'interpretació subjectiu
- La lectura monòtona pot causar errors d'interpretació

- Baixa sensibilitat per CIN2+, requereix repetició del cribratge
- Baixa especificitat, molts diagnòstics de citologies ASCUS/LSIL
- No detecta bé les lesions glandulars precursors
- No disminueix la incidència d'adenocarcinoma
- Requereix un seguiment estricte després d'un resultat anormal

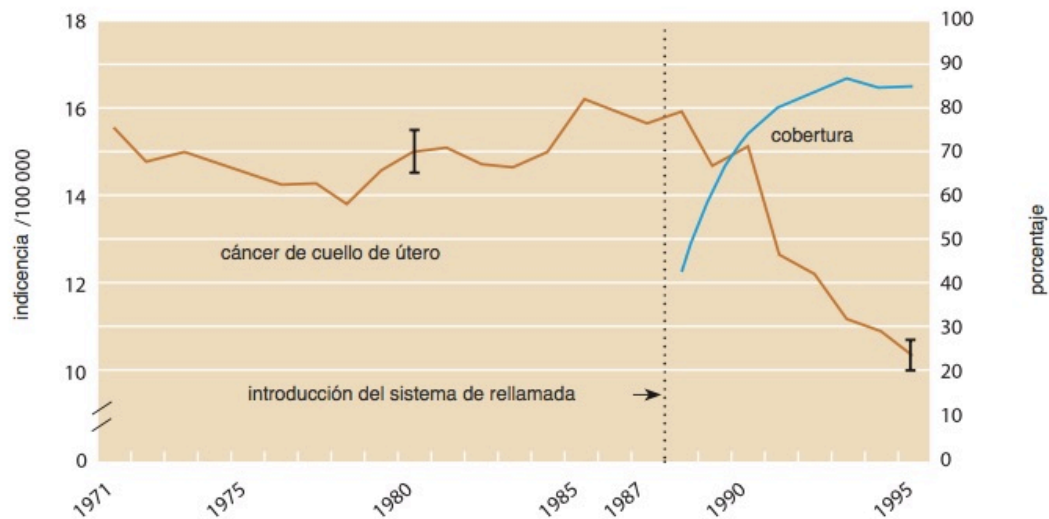


Figura 12: Repercussió de la cobertura de cribratge sobre la incidència de càncer cervical. Introducció de la trucada i retrucada(42)

La sensibilitat per detectar CIN2+ és molt variable en els diferents estudis, amb una mitja de 57,5% (límits: 18,6%, 76,7%) en els estudis més recents de laboratoris europeus i americans, poc acceptable per un test de cribratge.

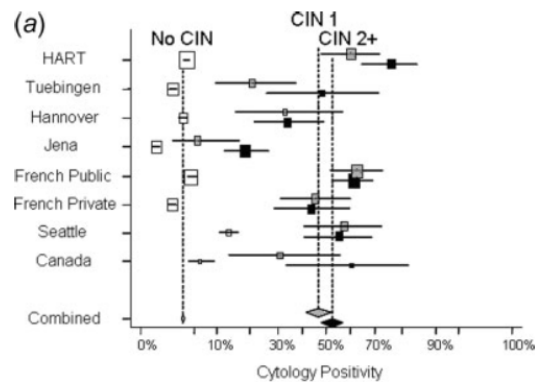


Figura 13: Sensibilitat de la citologia per detectar lesió cervical

Donat que la citologia única té una sensibilitat limitada per detectar CIN2+, la repetició periòdica del cribratge citològic corregeix aquest dèficit. La sensibilitat depèn directament de la qualitat de la mostra obtinguda en la presa, la lectura monòtona dels frotis i la seva interpretació subjectiva, que expliquen la baixa reproductibilitat de la prova.

L'especificitat de la citologia per la detecció de CIN2+ és, tanmateix, subòptima ja que, tot i que en estudis descriuen xifres de fins al 95,5% (43), això succeeix a expenses d'un augment del numero de falsos positius (FP).

La baixa reproductibilitat i sensibilitat de la citologia ha portat a plantejar-nos el paper del VPH en la prevenció secundària, ja sigui associat a citologia (co-test) o com tècnica inicial de cribratge. Múltiples estudis han demostrat que la prova de VPH és més sensible per la detecció de CIN3, tot i que la seva especificitat, i per tant el VPP son menors, especialment en el grup de dones joves menors de 30anys, on la prevalença d'infecció transitòria és alta (44).

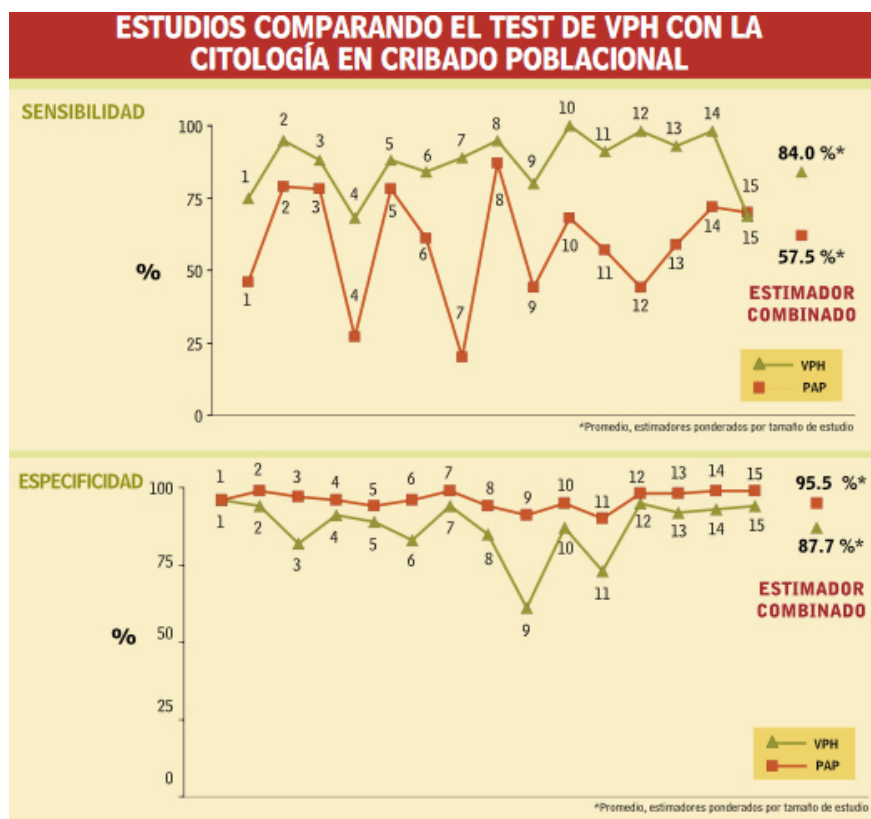


Figura 14: Comparació de la detecció de VPH amb la citologia en el cribratge de HSIL/càncer de cèrvix(45)

Nombrosos estudis ens demostren que la detecció del **VPH-AR** és més sensible en la detecció de CIN2+, però menys específic. Això és degut al caràcter transitori de les lesions cervicals de baix grau.

Per tal que el test del VPH pugui ser utilitzat correctament en el cribratge s'han de seguir unes directrius que minimitzin el numero de falsos positius clínics i falsos negatius clínics. Els dos tests validats per la detecció de VPH (HC2 i PCR) han demostrat sensibilitats clíniques del 90-95% per CIN2+ en múltiples estudis, però una especificitat baixa (87%) degut al caràcter transitori de moltes de les infeccions per VPH.

En general, en qualsevol prova de cribratge la primera prova a realitzar sempre ha de ser la més sensible i, si és positiva, realitzar una prova que augmenti l'especificitat de la prova. El subgrup més conflictiu és en dones menors de 30 anys, on la prevalença arriba fins al 30% i la detecció per VPH-AR no estaria indicada.

El desenvolupament de noves tècniques moleculars tenen com a objectiu discernir entre aquelles pacients que presenten un veritable risc, de les que no. Existeixen tres possibles tècniques moleculars acceptades per calcular el risc d'evolució a CIN2+ un cop tenim el VPH-AR: genotipat VPH 16 i 18 (Cobas 4800[®]), tinció dual (CINtec Plus[®]) i detecció ARNm E6/E7 (Aptima[®]).

Situació actual a Catalunya

A Catalunya, el programa de cribratge és oportunista i la població diana són dones entre 25 y 65 anys. Es recomana citologia cada 3 anys després de dos citologies valorables amb resultat negatiu en l'interval d'un any. La determinació del VPH es realitza en casos d'ASCUS, dones mal cribades a partir del 40 anys i control post tractament.

Dades recents posen de manifest una cobertura de cribratge entre les dones de 25-65 anys propera al 40%, molt inferior als objectius recomanats.

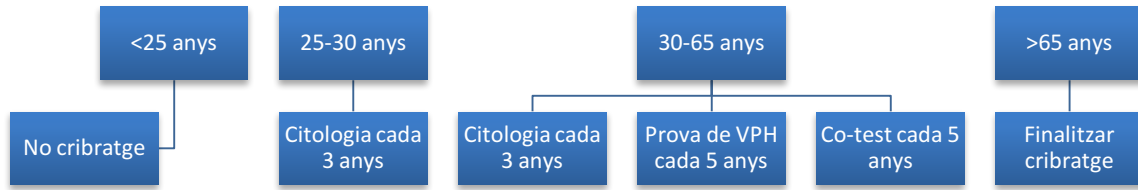


Figura 15: Estratègies de cribratge en funció del subgrup d'edat(42)

Aquestes recomanacions són aplicables a la població general, ja que s'han descrit subpoblacions que no serien candidates a aquest tipus de cribratge. El fet d'haver patit una lesió cervical prèvia es recomana perllongar el cribratge 20 anys des de la curació de la malaltia ja que es considera que encara podria persistir el risc de càncer de cèrvix. En pacients immunocompromeses es recomana cribratge de cèrvix anual, per tal de detectar precoçment noves infeccions i reactivacions, que en aquestes pacients podrien tenir un desenvolupament més ràpid.

LESIONS PRECURSORES DEL CÀNCER DE COLL D'ÚTER

CLASSIFICACIÓ I DIAGNÒSTIC

Les terminologia de les lesions cervicals ha canviat en els darrers anys, modificant-se paral·lelament amb el coneixement de la seva biologia i història natural.

La demostració de canvis similars en displàsies greus i el carcinoma in situ va conduir durant els anys 70 a la introducció del concepte neoplàsia cervical intraepitelial (CIN) classificant les lesions en tres graus. Avui en dia aquesta classificació és la que fem servir a la histologia. L'any 1990 s'introdueix a nivell mundial el sistema Bethesda per descriure les alteracions citològiques, incloent nous conceptes sobre la infecció VPH. (46,47)

Taula 5: Correlació entre la terminologia displàsia/carcinoma in situ, CIN y Bethesda(52)

Terminologia displàsia	de Terminologia original	CIN	Terminologia modificada	CIN	Sistema Terminologia (1991)	Bethesda. LIE
Normal	Normal		Normal		Dintre dels límits normals (infecció)	
Atípia	Atípia coilocítica, condiloma pla		CIN de baix grau		ASCUS/AGUS	L-LIE
Displàsia lleu	CIN1		CIN de baix grau		L-LIE	
Diplàsia moderada	CIN2		CIN d'alt grau		H-LIE	
Displàsia greu						
Carcinoma in situ	CIN3		CIN d'alt grau		H-LIE	
Carcinoma invasor	CIN3 Carcinoma invasor		CIN d'alt grau Carcinoma invasor		H-LIE Carcinoma invasor	

El sistema Bethesda substitueix el terme neoplàsia pel de lesió intraepitelial, dividint en dues categories, lesions de baix grau i lesions d'alt grau. Les lesions de baix grau corresponen a infeccions víriques, generalment auto limitades i amb tendència a la desaparició espontània. Les lesions d'alt grau corresponen a vertaders canvis premalignes i per tant amb una veritable tendència a progressar a càncer cervical. Es va introduir el concepte de ASC-US/AG-US per aquelles pacients on no estava clar si els canvis observats en les cèl·lules escamoses o glandulars corresponien a una lesió

preinvasiva o a canvis reparatius. La darrera classificació Bethesda es va actualitzar l'any 2001.

Tipus de mostra:

Cal indicar frotis convencional o citologia líquida o altres.

Qualitat de la mostra:

Satisfactòria per a l'avaluació (cal descriure la presència o l'absència de component endocervical o de zona de transformació i qualsevol altre factor limitant de la qualitat)

Insatisfactòria per a l'avaluació (cal especificar el motiu)

Interpretació/resultat

1. Negatiu per lesió intraepitelial o malignitat
 - a. Quan no hi ha evidència cel·lular de neoplàsia
 - b. Microorganismes:
 - i. Trichomonas vaginalis
 - ii. Fongs morfològicament compatibles amb Candida spp
 - iii. Alteració de la flora intestinal suggestiva de vaginosis bacteriana
 - iv. Bactèries morfològicament compatibles amb Actynomices spp
 - v. Alteracions cel·lulars associades al virus de l'herpes simple
 - c. Altres troballes no neoplàstiques
 - Altres troballes no neoplàstiques associades a:
 - Inflamació, radiació, DIU
 - Cèl·lules glandulars d'aparença benigna en situació posthisterectomia
 - Atrofia
2. Altres:
 - Cèl·lules endometrials (en una dona >40 anys d'edat)
3. Anormalitats en cèl·lules epitelials
 - Cèl·lules escatoses
 - ASC
 - ASC-US
 - ASC-H: No es pot descartar H-SIL
 - LSIL que compren:
 - VPH/displàsia lleu/CIN1
 - HSIL que compren:
 - Displàsia moderada i greu, CIS/CIN II i III amb signes sospitosos d'invasió (si se sospita una invasió)
 - Carcinoma escatós
 - Cèl·lules glandulars:
 - Atípies a:
 - Cèl·lules endocervicals (no especificar o especificar amb comentaris)
 - Cèl·lules endometrials (no especificar o especificar amb comentaris)
 - Cèl·lules glandulars (no especificar o especificar amb comentaris)
 - Atípia de cèl·lules glandulars
 - Adenocarcinoma endocervical in situ
 - Adenocarcinoma:
 - Endocervical
 - Endometric
 - Extrauterí
 - No especificat
 - Altres neoplàsies malignes

Figura 16: Classificació citològica Bethesda 2001

Darrerament s'ha establert una nova terminologia anomenada LAST (*Lower anogenital Squamous Terminology*) que inclou els coneixements actuals sobre la infecció VPH, incorpora l'ús de biomarcadors i facilita la comunicació entre professionals. Aquesta classificació ha estat recollida en la darrera classificació de la OMS per les neoplàsies del tracte genital femení publicada l'any 2014.

La terminologia LAST classifica les lesions escamoses intraepitelials (SIL) histològiques associades en dos graus, lesions de baix grau (LSIL) i lesions d'alt grau (HSIL). La classificació utilitza la mateixa terminologia que s'utilitza en el resultat citològic en el sistema de Bethesda i fa servir criteris similars.

Una de les principals novetats és la determinació immunohistoquímica de p16 que permet una millor categorització de les lesions "frontera" entre baix i alt grau, classificades fins a dia d'avui com a HSIL/CIN2 mitjançant criteris exclusivament morfològics. Les lesions HSIL/CIN2 p16-positives, s'inclouen en la categoria HSIL donat el risc real de progressió i les lesions HSIL/CIN2 p16-negatives es reclassifiquen com LSIL donat el seu comportament benigne i baix risc de progressió (42).

Diagnòstic citològic

La tècnica per la correcta presa de la citologia cervical es basa en la correcta observació de cèl·lules provinents de l'exocèrvix i de l'endocèrvix, raó per la qual s'ha de visualitzar la zona de transformació.

Es valoren els canvis morfològics cel·lulars: mida del nucli, cromatina, relació nucli-citoplasma, desenvolupament i maduració cel·lular i atípies.

Actualment disposem de la citologia convencional i de la citologia en medi líquid.

La citologia convencional o triple toma consisteix en la extensió de la mostra endocervical i vaginal en una lamineta. Posteriorment es fixa amb un spray fixador per evitar la distorsió cel·lular i finalment es procedeix a la tinció amb la tècnica de Papanicolau pel seu estudi microscopi.

La citologia cervical en medi líquid, la presa de la mostra s'introdueix en una solució fixadora on es conserven i es dispersen les cèl·lules. Les cèl·lules es separen per centrifugació o filtració i es transfereixen al portaobjectes amb una capa molt fina o monocapa per ser tenyides o visualitzades al microscopi (48).

La citologia líquida o en capa fina permet oferir una sèrie d'avantatges sobre la citologia convencional, especialment en millorar la lectura dels frotis en eliminar els grumolls, sang i altres artefactes, amb el consegüent augment de mostres satisfactòries per la seva valoració, requerir menys temps i poder utilitzar el material per estudis moleculars posteriors.

LSIL (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion)

Les displàsies lleus corresponen a lesions en el terç basal de l'epiteli, poc accentuades amb abundant citoplasma, i freqüentment acompanyat de canvis paranuclears (coilocítics) i paraqueratosis. Aquesta infecció es caracteritza per un increment de l'activitat mitòtica amb atípia citològica i dispolaritat i augment de cèl·lules immadures de tipus basal. El nucli augmenta de volum, hi ha contracció de la membrana i la cromatina es fa molt més evident.

HSIL (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

Inclou les alteracions CIN2 i CIN3. S'observen cèl·lules amb citoplasma immadur, nuclis de característiques anormals i augment de la relació nucli-citoplasma. La mida nuclear és almenys dues vegades major que el del nucli d'una cèl·lula intermèdia i ocupen >50% de la cèl·lula. Els nuclis de HSIL són hipercromàtics, les membranes nuclears són irregulars i existeix anisonucleosis. Es cèl·lules presenten un estret ribet citoplàsmic al voltant del nucli hipercromàtic.

ASCUS

Són alteracions citològiques que no es poden classificar com LSIL o HSIL perquè qualitativament o quantitativament les alteracions són insuficients per poder-les incloure en un dels dos grups. El seu diagnòstic, si s'acompanya de la infecció per VPH és de vital importància perquè pot ocultar una lesió d'alt grau. Un 10-20% de les pacients amb ASCUS i un 33-66% de les pacients amb ASC-H presenten lesió subjacent CIN2 o més (49).

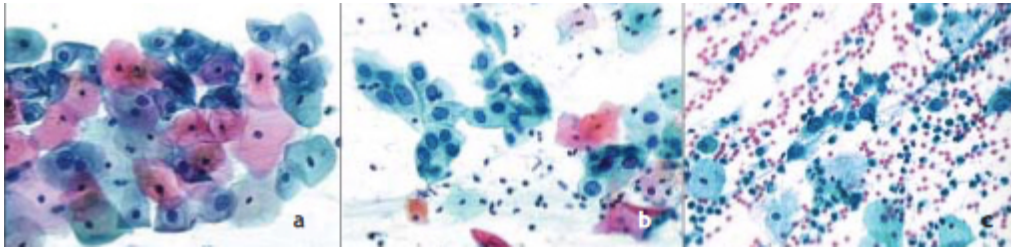


Figura 17: Aspecte citològic de les lesions cervicals lleus (a), moderades (b) i greus (c) (52)

Diagnòstic histològic

Tot i que el diagnòstic de sospita és per citologia, el diagnòstic final de CIN s'estableix per examen histopatològic a partir d'una biòpsia cervical realitzada mitjançant control colposcòpic (Gold Standard).

La colposcòpia és la visualització de l'aparell genital mitjançant el colposcopi. Aquest consisteix en un estudi topogràfic de les lesions del VPH a cèrvix, vagina i vulva. És un microscopi altament il·luminat que augmenta la visió de 6 a 40 vegades.

L'estudi colposcòpic permet la identificació de característiques subtils dels epitelis, inapreciables a simple vista, que són l'expressió dels canvis patològics. La colposcòpia s'ha consolidat com part fonamental en el protocol pel diagnòstic de les lesions intraepitelials i càncer invasiu de TGI. L'objectiu de la colposcòpia és augmentar la sensibilitat de la citologia i descartar els falsos negatius.

La metodologia consisteix en col·locar la pacient en posició ginecològica, visualitzant vulva i introduint l'espècul per visualitzar vagina i cèrvix. Enfoc amb filtre verd per visualitzar millor l'arquitectura vascular del mateix. Posteriorment, s'aplica solució d'àcid acètic, que farà aparèixer els canvis epitelials entre 30 segons i 1-2 minuts.

La última classificació de les troballes colposcòpiques es va aprovar per la IFCPC al Congrés Mundial de Rio de Janeiro l'any 2011 (50).

Avaluació general	Adequada/Inadequada a causa de... Visibilitat de la unió escamocolumnar: completament visible, parcialment visible, no visible Tipus de zona de transformació: 1,2,3
Troballes colposcòpiques normals	Epiteli escamós original: <ul style="list-style-type: none"> • Madur • Atròfic Epiteli columnar: <ul style="list-style-type: none"> • Ectòpia Epiteli escamós metaplàsic <ul style="list-style-type: none"> • Quist de Naboth • Apertures glandulars i/o criptes glandulars Deciduosos a l'embaràs
Troballes colposcòpiques anormals	Ubicació de la lesió: dins o fora de la zona de transformació. Ubicació de la lesió segons del agulles del rellotge Tamany de la lesió: Numero de quadrants del cèrvix uterí que cobreix la lesió, tamany de la lesió en percentatges
<ul style="list-style-type: none"> • Grau 1 (menor) 	Epiteli acetoblanc prim Vores irregulars Mosaic fi Puntejat fi
<ul style="list-style-type: none"> • Grau 2 (major) 	Epiteli acetoblanc dens. Aparició ràpida d'epiteli acetoblanc. Orificis glandulars oberts amb vores engruixides. Mosaic gruixut Puntejat gruixut Vores delimitades Signe del límit de la vora interna Signe de la cresta o sobreelevat
No específics	Leucoplàsia (queratosis, hiperqueratosis) Erosió Solució de Lugol (test de Schiller): positiu/negatiu
Sospita d'invasió	Vasos atípics Signes addicionals: vasos prims, superfície irregular, lesió exofítica, necrosis, ulceració
Troballes vàries	Zona de transformació congènita Condiloma Pòlip Estenosis Anomalia congènita Endometriosis

Figura 18: Classificació colposcòpica IFCCP 2011(34)

La colposcòpia permet diferenciar els canvis epitelials que sorgeixen amb l'evolució de la malaltia. En la *primera fase*, les cèl·lules neoplàstiques mostren un augment de la densitat nuclear, que es tradueix en lesions de color blanc en la colposcòpia i imatges

de puntejat i/o mosaic, també anomenades canvis menors. La *segona fase* o angiogènica s'origina per un augment de factors de creixement de l'endoteli vascular i en colposcòpia es visualitza una vascularització irregular o atípica amb un agreujament de les lesions epitelials referides com canvis majors.

La colposcòpia és una tècnica diagnòstica, delimita la lesió i ens permet dirigir la biòpsia per al diagnòstic definitiu però no pot ser mai una tècnica de cribratge degut al temps i especialització que precisa (51).

Es valora si la mostra tissular cervical presenta CIN i en quin grau, en funció de les característiques histològiques de diferenciació, maduració i estratificació de les cèl·lules i anomalies dels nuclis. Per tal de classificar la CIN s'observa la proporció d'espessor epitelial que presenta les cèl·lules indiferenciades i només una prima capa de cèl·lules madures, diferenciades.

La correspondència histològica de la graduació sol ser la següent:

- *Canvis menors, grau I:* Es correspon amb epitelis metaplàsics i infecció subclínica per VPH o CIN1.
- *Canvis majors, grau II :* S'observen signes d'agreujament de la lesió, pitjor pronòstic, CIN 2-3. Quan s'acompanyen de vasos atípics ha de sospitar-se invasió precoç de l'estroma.

En el **CIN1** existeix bona maduració, amb mínimes anomalies nuclears i poques figures mitòtiques. Les cèl·lules indiferenciades es troben a les capes epitelials més profundes (terç inferior). S'observen figures mitòtiques, però no moltes. Poden veure's canvis citopàtics deguts a la infecció per VPH en tot el gruix de l'epiteli

El **CIN2** es caracteritza per canvis cel·lulars displàsics restringits sobretot a la meitat o dos terços inferiors de l'epiteli, amb anomalies nuclears més marcades que la trobada al CIN1. Poden veure's figures mitòtiques en tota la meitat inferior de l'epiteli.

En el **CIN3**, la diferenciació i l'estratificació poden faltar per complet o existir només en el quart superficial de l'epiteli, amb abundants figures mitòtiques. Les anomalies

nuclears apareixen en tot el gruix de l'epiteli. Moltes figures mitòtiques tenen figures anormals (49).

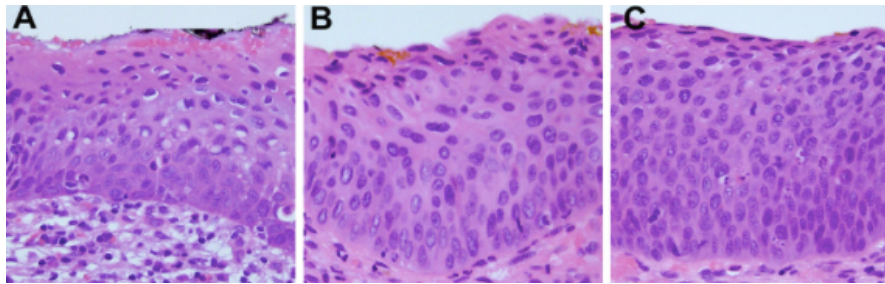


Figura 19: Histologia de CIN1 (a), CIN2 (b), CIN3 (c)

HISTORIA NATURAL DE LA LESIO CERVICAL

El càncer de cèrvix és precedit generalment per una llarga fase de malaltia precursora preinvasiva que requereix d'un procés per etapes.

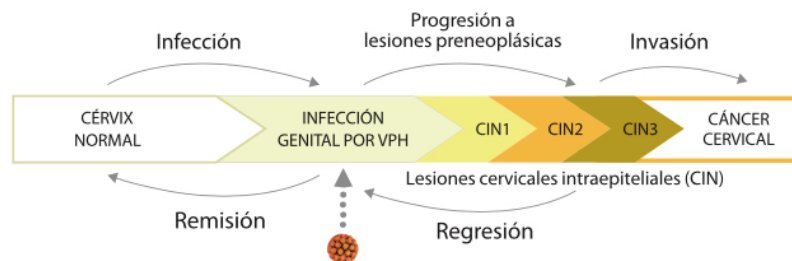


Figura 20: Historia natural de les lesions cervicals(42)

És necessari conèixer la història natural de la malaltia per tal de poder realitzar un cribratge adequat que ens ajudarà a disminuir la morbimortalitat. En el cas de càncer de cèrvix, en introduir-se la citologia com a mètode de cribratge es va observar que les lesions precanceroses eren molt més freqüents que no pas els càncers invasors.

Tot i que sabem que fins un 80% de les dones han estat en contacte amb el VPH en algun moment de la seva vida, la majoria eliminen el virus de manera espontània abans que aquest pugui desenvolupar lesió (52).

La gran majoria d'aquestes infeccions són doncs, transitòries i asimptomàtiques amb una duració variable, relacionada amb el genotip infectant; de manera que les produïdes per un VPH-AR duren aproximadament el doble que les produïdes per un VPH-BR.

El procés d'oncogènesis relacionat amb el VPH és lent, de manera que el període comprès entre la infecció i el CIN3 s'ha calculat entre 7 i 15 anys, el carcinoma succeeix uns 10 anys més tard que el CIN3 i és un fet infreqüent dins de les lesions per VPH.

Durant els anys 90 es van dur a terme diversos estudis que abordaven l'evolució natural de la CIN des del punt de vista de la regressió, persistència i evolució. Ostor analitza la relació entre CIN i càncer cervical i defineix l'estat precursor de càncer de cèrvix. La seva conclusió respecte l'evolució de les lesions cervicals queda reflexada en la següent taula (53):

Taula 6: Evolució de les lesions cervicals

Grau CIN	Regressió	Persistència	Progressió CIN3	Progressió càncer invasor
CIN I	57%	32%	11%	1%
CIN II	43%	35%	22%	5%
CIN III	32%	56%	-	12%

Holowaty realitza un estudi amb més de 17.000 dones on observa que el 29% de les lesions de baix grau evolucionen a lesió d'alt grau en els 10 anys següents. Les lesions cervicals moderades presenten una progressió a CIN III del 16% en 2 anys i en 5 anys del 25%. La progressió a carcinoma invasor és del 4,2% en dos anys (54).

Taula 7: Evolució natural de les LIE

Anomalia citològica de referència	Regressió a normalitat als mesos	a la 24 mesos	Progressió a H-LIE als 24 mesos	Progressió a càncer invasor als 24 mesos
ASCUS	68,2%		7,1%	0,3%
L-LIE	47,2%		20,4%	0,2%
H-LIE	35%		23,4% (persistència)	1,4%

El metaanàlisi de Melkinow, incloent 27.000 dones, va donar tasses ponderades de progressió a H-LIE i a càncer invasor als 24 mesos, segons l'anomalia de referència que es presenten a la taula 25 (55).

Determinar quines lesions graus de baix grau progressaran o persistiran i quines no, és difícil de predir actualment. En els casos de lesions de major grau, el temps necessari per la progressió és difícil d'establir. Per saber de forma precisa el temps de transició, seria necessari deixar sense tractament les pacients amb carcinoma in situ i controlar-les, fet que no és acceptat èticament.

Maneig clínic de les displàsies cervicals.

ASCUS

La atípia de cèl·lules escamoses de significat incert es diagnostica en el 2-5% de les citologies i representa l'alteració citològica més comú.

La prevalença global d'infecció per VPH en dones amb ASCUS oscil·la entre el 33 i el 51% (en dones menors de 25 anys pot arribar fins al 70%) i disminueix progressivament amb l'edat. La presència de lesions > HSIL/CIN2 en dones amb citologia d'ASCUS oscil·la entre el 5-12% i la de CCU entre 0,1-0,2%

Les possible estratègies davant d'un diagnòstic citològic d'ASCUS són:

- Prova de VPH. És la opció preferent
- Citologia anual durant dos anys

- Colposcòpia immediata

La determinació del VPH és equivalent a la colposcòpia immediata en termes de sensibilitat per la detecció de lesions d'alt grau, amb l'avantatge que permet reduir a la meitat el numero de colposcòpies.

Estudis recents en dones >30a estimen un risc del 3% de presentar lesions >HSIL/CIN3 als 5 anys, cosa que justifica realitzar el control citològic a l'any. Les dones amb citologia ASCUS i prova VPH negativa presenten un baix risc de lesions >HSIL/CIN3, comparable amb l'existent als 3 anys de citologia negativa, però lleugerament superior a l'existent als 5 anys del cotest negatiu.(42)

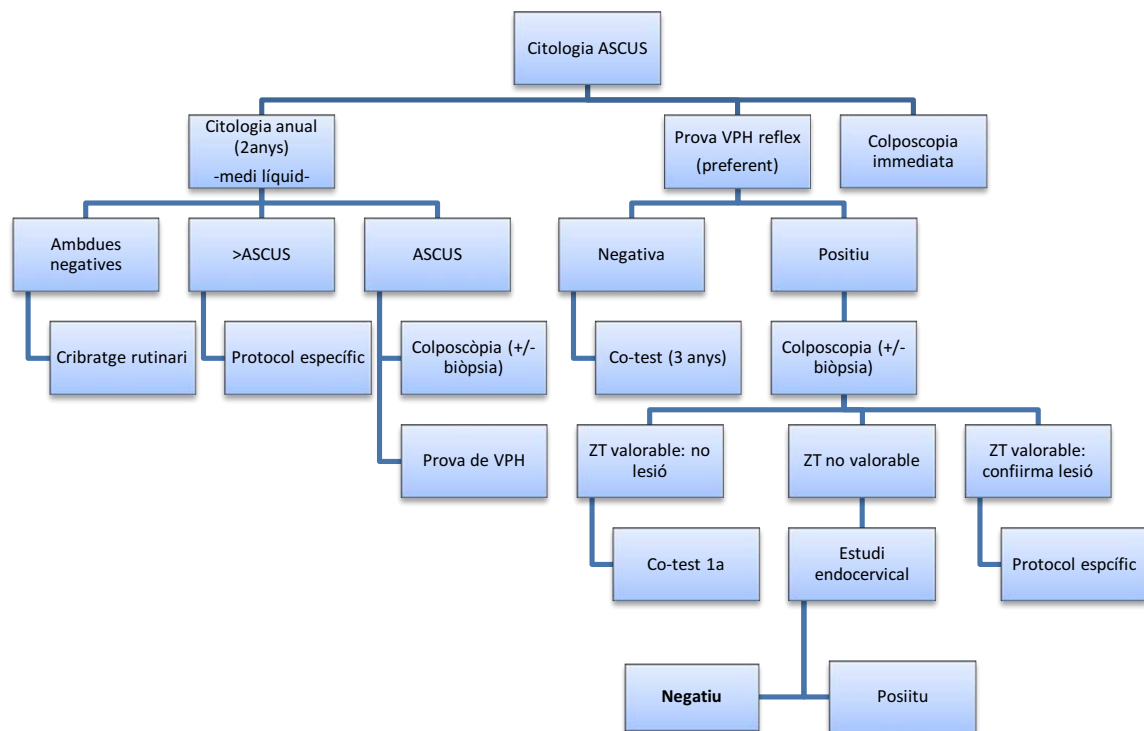


Figura 21: Algoritme citologia ASCUS

ASCUS H

El diagnòstic d'atípia escamosa incerta sense descartar lesió intraepitelial d'alt grau és poc freqüent i representa entre el 0,27-0,6% de les citologies de cribratge. La citologia ASC-H representa un major risc de lesions > HSIL/CIN3 que la citologia ASCUS o LSIL i menor que la citologia HSIL.

La prevalença de HSIL/CIN2-3 en dones amb ASC-H oscil·la entre el 26 i el 68%, amb una alta prevalença de VPH positiu. Per aquesta raó, la recomanació és la realització de la colposcòpia immediata. (42)

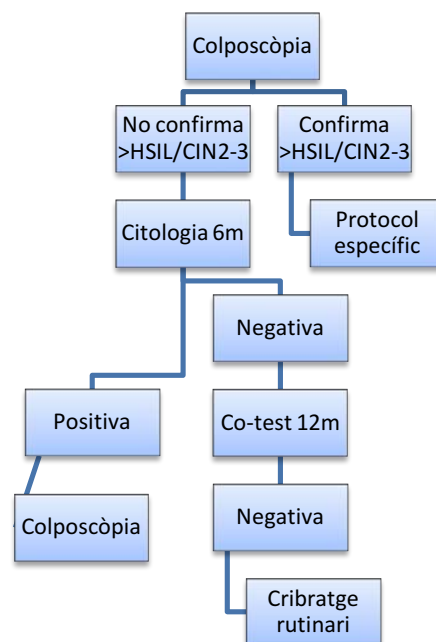


Figura 22: Algoritme ASC-H

Lesió escamosa intraepitelial de baix grau (LSIL)

La lesió escamosa intraepitelial de baix grau representa en 2-3% de totes les citologies. Més el 70% de les dones amb citologia de LSIL presenten un prova VPH positiva i entre el 12-16% d'elles una lesió >HSIL/CIN2 en l'estudi histològic. La historia natural de les dones amb citologia LSIL és molt similar a les dones amb citologia ASCUS i VPH positiu.

Més de dos terços de les citologies de LSIL s'associen a infecció per VPH. Per aquesta raó no és útil la selecció d'aquestes pacients mitjançant una prova VPH. La recomanació serà la realització d'una colposcòpia immediata.

El risc de progressió a carcinoma invasiu de les lesions identificades com LSIL a la citologia és baix (42).

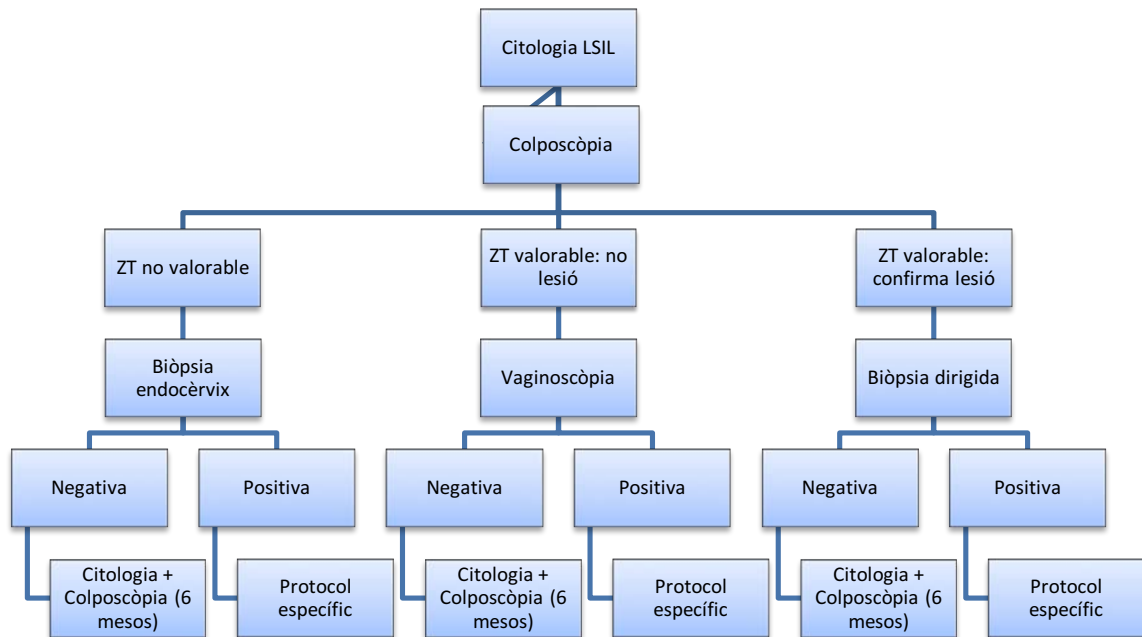


Figura 23: Algoritme LSIL

Lesió escamosa intraepitelial d'alt grau (HSIL)

La HSIL representa el 0,5-1% de totes les citologies de cribratge. La seva prevalença és major entre els 20 i 29 anys (0,6%), que entre els 40-49 anys (0,2%) i entre els 50-59 anys (0,1%).

Davant una citologia de HSIL, el diagnòstic histològic definitiu demostra una lesió >HSIL/CIN2 aproximadament en el 60% dels casos i carcinoma invasiu en el 2%. En dones majors de 30 anys, el risc de càncer invasiu als 5 anys de seguiment és del 8%. Aquestes dades justifiquen la colposcòpia immediata i biòpsia cervical.

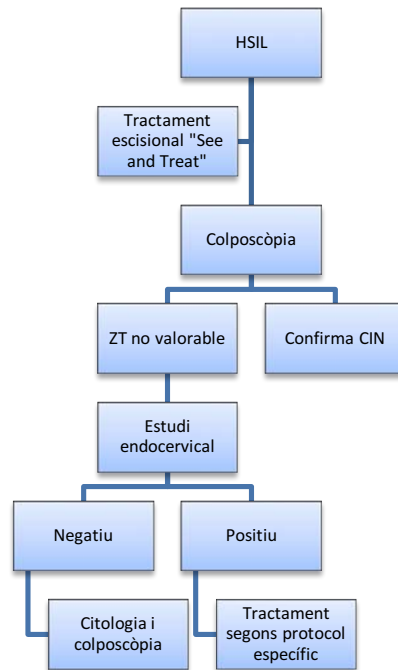


Figura 24: Algoritme HSIL

En dones menors de 25 anys el risc de carcinoma invasor és baix, amb taxes de regressió espontània del HSIL fins al 65%. En aquest subgrup de pacients es remet la pacient a colposcòpia i no es realitza tractament (42).

OPCIONS TERAPÈUTIQUES EN LES DISPLÀSIES PREMALIGNES

El tractament de la neoplàsia cervical intraepitelial ocupa un paper important en la prevenció del càncer de cèrvix. Una vegada detectada, la lesió preinvasora ha de ser tractada per evitar la seva evolució a càncer invasor. En els darrers anys s'ha produït un notable canvi en el tractament de les lesions preinvasores, relacionat amb les millores dutes a terme en la pràctica clínica.

Conducta terapèutica de les lesions de baix grau: CIN-1

A les lesions de baix grau (CIN 1), no hi ha acord en quina és la millor actitud, el tractament de la lesió o el seguiment.

El tractament es basa en els següents arguments:

- Evitar-ne la progressió
- La taxa de curació és superior al 90% amb qualsevol tipus de tractament, tant escissionat com destructiu.
- Produeix menor impacte psicològic que la conducta expectant, que obliga a controls estrictes.
- Preveu la pèrdua de pacients en el seguiment
- Evita problemes mèdic-legals
- Redueix la sobrecàrrega de feina (visites, citologies, biòpsies)

El seguiment de la lesió té més en compte la història natural de la malaltia. Si tenim en compte el baix risc de progressió a carcinoma invasor (<1%) i l'alt percentatge de regressió espontània (60%) sobretot en dones joves, el tractament sistemàtic representa en molts casos un tractament innecessari.

Per tant, la conducta terapèutica ha de ser individualitzada en cada cas i la observació sense tractament és la opció recomanada en la majoria de casos, especialment en dones joves que no han complert el desig genèsic.

Taula 8: Criteris per orientar la conducta terapèutica en les LSIL

	Observació	Tractament
Edat	<35	>35
Citologia-biòpsia	Acord	No concordant
Colposcòpia	Satisfactòria	Insatisfactòria
Canvis colposcòpics	Menors	Majors
Extensió de la lesió	Limitada	Extensa
Localització de la lesió	Perifèrica	Central
Endocèrvix	Lliure	Afectat
Seguiment	Possible	Impossible
Persistència > anys	No	Si

Si optem per una conducta observadora es recomana seguiment mitjançant citologia i colposcòpia cada 6 mesos i/o un test VPH cada 12 mesos. Després de dos citologies negatives i test viral negatiu, la pacient pot tornar a cribratge poblacional.

Si en el període de seguiment la lesió persisteix o progressa es tractarà segons els protocols.

Conducta terapèutica de les lesions d'alt grau: CIN-2/3

Aquestes lesions tenen major risc de persistir o progressar que les lesions cervicals lleus. S'han publicat taxes de progressió entre el 12-50% (53).

Actualment, s'ha demostrat que el tractament de les lesions CIN-2/3 redueixen la incidència i mortalitat per càncer de cèrvix. Per tant, existeix consens per tractar aquestes lesions excepte en dos situacions especials: adolescència i gestació.

Adolescència

En l'adolescència (13-20a) el risc de càncer invasor és molt baix i el percentatge de regressió espontània molt elevat.

En lesions CIN-2/3 és acceptable tant el tractament com la observació durant 2 anys amb colposcòpia i citologia cada 6 mesos, sempre i quan la citologia sigui satisfactòria.(56)

Gestació

Durant la gestació, el risc que una lesió CIN2-3 progressi a càncer invasor és mínim, i el percentatge de regressió espontània postpart és relativament alt. El tractament del CIN durant l'embaràs s'associa a un elevat número de complicacions.

Es recomana conducta d'observació amb citologia i colposcòpia en intervals no menors a 3 mesos (Grau de recomanació BII). Es recomana repetir biòpsia si l'aspecte de la lesió empitjora o la citologia suggereix carcinoma invasor.

En absència de invasió, es pot revalorar la pacient a les 6 setmanes postpart (57).

Tipus de tractament

El tractament de les displàsies cervicals ha de reunir els següents requisits:

- Baixa morbiditat
- Màxima conservació de la funció reproductiva
- Baixa incidència de persistència o recidiva
- Garantia de seguiment citològic o colposcòpic successiu
- Relació cost-benefici favorable

Existeixen diversos tractaments, que bàsicament es classifiquen en destructius (que produeixen una destrucció física de la lesió) i escissionals (obtenim l'extirpació completa)

Tractaments destructius

El principal inconvenient pels tractaments destructius es que no obtenen teixit per l'estudi histològic. Per això, és imprescindible realitzar una biòpsia que exclouï la presència de carcinoma invasor (58).

Els mètodes destructius disponibles són:

- Termocoagulació
- Electrocoagulació
- Criocoagulació
- Vaporització amb làser de CO2

Tractaments escissionals

Consisteixen en l'extirpació completa de la lesió. La principal avantatge és la possibilitat de realitzar l'estudi histològic, que permetrà, per una part, descartar la presència de càncer ocult i per altra, estudiar els marges de resecció de la peça, per tal de confirmar que la exèresis ha estat completa

Entre els tractaments escissionals ens trobem: conització amb bisturí fred, làser o nansa de diatèrmia i excepcionalment la histerectomia.

Conització

La conització extirpa la lesió, el que ens permet estudi histològic amb l'avantatge de de conservar l'úter.

Tot i això, l'exèresi ha d'adaptar-se a la topografia de la lesió. L'anatomia de la zona varia en funció de l'edat i el la gravetat de la lesió.

Indicacions de la conització:

1. Lesió no visible en la seva totalitat (colposcòpia no satisfactòria)
2. Lesió endocervical
3. Discordança de resultats
4. Sospita de microinvasió
5. Lesions glandulars. AIS
6. Recurrència post tractament
7. Lesions CIN2/3

Conització amb bisturí fred

Avantatges: Absència d'artefactes tèrmics

Inconvenients: Requereix anestèsia i hospitalització. Elevat cost sanitari, major risc de complicacions (hemorràgia, estenosis, infertilitat) distorsió anatòmica i dificultat en el seguiment.

Conització amb làser de CO₂

La conització amb làser de CO₂ es realitza de forma ambulatoria amb anestèsia local, un agent vasoconstrictor i control colposcòpic. Permet un disseny de la mida de la conització, en funció del cèrvix i de la topografia de la lesió.

Avantatges: Tractament ambulatori. Disseny personalitzat de la peça quirúrgica. Preserva la integritat reproductora de la pacient. Mínimes complicacions intra i postoperatòries. Curació excel·lent i adequat seguiment.

Inconvenients: Elevat cost, dificultat tècnica, major temps quirúrgic i dany tèrmic dels marges quirúrgics.

Conització amb nansa de diatèrmia (LLETZ/LEEP)

La tècnica consisteix en l'exèresi de tota la zona de transformació, incloent la totalitat de la lesió, mitjançant una nansa de mida adequada, connectada a una corrent d'alta freqüència. Quan es fa servir la nansa s'hauria d'intentar eliminar la lesió en un únic fragment.

Avantatges: Permet la obtenció de material per estudi anatómo-patològic. És un mètode ambulatori, ràpid, de fàcil aprenentatge i econòmic, amb adequada recuperació anatòmica del coll i alta taxa de curació

Inconvenient

-Alt percentatge de lesions incompletes, que pot arribar fins a un 44%. En ocasions, quan la ZT és molt gran, l'extirpació es realitza en dos temps, cosa que dificulta la interpretació histològica dels marges.

-Alt percentatge de conus negatius, que oscil·la entre 14 i 30%, cosa que significa un elevat numero de tractaments innecessaris (59–61).

Tractament sense biòpsia prèvia. SEE AND TREAT

Exèresis amb nansa de diatèrmia en dones amb citologia HSIL i colposcòpia amb canvis majors sense biòpsia prèvia. És espacialment útil en dones mal complidores i evita el possible infradiagnòstic de la biòpsia dirigida. Tot i això en algunes sèries s'ha descrit un elevat percentatge d'histologies negatives (42).

Histerectomia

La histerectomia no està indicada com a tractament primari de la neoplàsia cervical intraepitelial, per la seva elevada morbiditat i pel risc d'infractament en el cas de carcinoma ocult.

Les possibles indicacions son:

- Impossibilitat de realitzar conització, ja sigui per estenosis vaginal o obesitat mòrbida que impedeixen la visualització del cèrvix.
- Conitzacions amb marges afectes en pacients amb desig genèsic complet o impossibilitat de seguiment posterior.
- Presència d'una altra patologia que per si mateixa requereixi intervenció

Observació sense tractament

L'objectiu és evitar en molts casos de LSIL/CIN1 i alguns casos de HSIL/CIN2 amb capacitat de regressió espontània. En aquests casos s'ha de ser molt rigorós en la selecció de pacients, sobretot aquelles amb lesió d'alt grau. Ha de ser una pacient complidora, una colposcòpia satisfactòria amb una lesió completament visible, una lesió no extensa (menys del 50% de la superfície) i no ha d'haver afectació endocervical. D'aquesta manera evitem el tractament innecessari, sobretot en dones joves i indirectament també evita la morbiditat d'aquests tractaments sobre la capacitat reproductiva i gestació de la pacient (3,62).

METODES DE DETECCIO de VPH

La variabilitat observada en quan a sensibilitat i reproductibilitat de la citologia ha donat un paper cada cop més important al paper de la prova VPH en la prevenció secundària del càncer de cèrvix, ja sigui associat a citologia (co-test) o com tècnica inicial de cribratge.

Una revisió sistemàtica portada a terme per Arbyn analitza els resultats utilitzant la citologia i la prova de VPH (co-test) com a prova de cribratge i observa que s'incrementa la sensibilitat amb una pèrdua d'especificitat, comparant amb la realització única de la prova de VPH. La diferència en el risc acumulat de CIN2+ o càncer utilitzant co-test vs prova de VPH sola és baixa (63).

Per tant, l'evidència disponible posa de manifest que, en cas de ser una tècnica validada, la prova VPH-AR és més eficaç que la citologia en dones >30 anys, i que en els casos de determinació negativa, l'interval de cribratge es pot augmentar fins a 5 anys.

El nou cribratge de càncer de cèrvix inclou el VPH-AR com a mètode primari. Tot i això, només un percentatge de les dones desenvoluparan una lesió d'alt grau. Una sèrie de factors han estat identificats com moduladors d'aquesta persistència/progressió de la infecció per VPH, com el tipus de VPH.

Actualment, existeixen quatre proves aprovades per la FDA per la seva utilització en el cribratge poblacional.

- Hybrid Capture 2 (HC2) HPV DNA Test (Qiagen)
- Cervista (Hologic)
- Cobas 4800 HPV Test (Roche)
- Aptima HPV Test (Hologic)

Les tècniques de biologia molecular es fan servir per detectar la presència de VPH, diagnosticar les lesions intraepitelials, i en alguns casos determinar el genotip i la càrrega viral.

La detecció d'ADN de VPH mitjançant tècniques de Biologia Molecular, independentment del mètode utilitzat, es basa en l'especificitat de la complementarietat entre els àcids nucleics. Una seqüència d'ADN té la capacitat d'hibridar específicament amb altres ADN o ARNs d'una manera tan específica que a una determinada temperatura només es formen híbrids entre dues cadenes si el 100% de les seves bases són complementàries. La manera de detectar aquests híbrids, la composició de les sondes i l'existència o no d'amplificació de la senyal marcaran les diferències entre les diferents tècniques de detecció.

Les raons que justifiquen la utilització clínica dels tests basats en Biologia Molecular per a determinar si hi ha infecció per HPV són diverses:

- la infecció per VPH-AR (alt risc) és la principal causa de càncer de cèrvix
- és necessària la persistència de VPH-AR i manteniment de la lesió per progressar fins a càncer invasor

Mètodes per amplificació de senyal

HYBRID CAPTURE 2 (HC2, Digene Corp., USA)

És un mètode d'amplificació de senyal basat en la hibridació d'una sonda d'ARN degudament marcada, la seqüència de la qual és complementària a l'ADN del VPH. Aquest mètode utilitza sondes d'ARN que tenen la capacitat d'hibridar amb ADN viral i ser detectats mitjançant mètodes luminescents semi-quantitatius. Existeixen dues sondes, una per VPH-AR que inclou 13 tipus de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68) i una altra pel grup de baix risc (VPH-BR) que inclou 5 tipus (6, 11, 42, 43 i 44). El llindar de tall amb significació clínica s'ha establert en 1pg/ml d'ADN que correspon a 10.000 còpies de virus.

S'han realitzat nombrosos estudis que han demostrat la seva precisió i reproductibilitat com a mètode cribratge, per la qual cosa s'utilitza i s'ha generalitzat a molts països, i la captura d'híbrids de segona generació (Hybrid Capture 2, HC2), ha estat aprovada per la FDA com a test diagnòstic, sent un dels tests més emprats.

HC2 és el mètode més efectiu (major sensibilitat i igual especificitat), que la citologia convencional en el cribratge de pacients amb ASCUS, però no en el cas de LSIL citològics, degut a l'alta taxa de positivitat per VPH (64).

En aquest mètode, no és possible emprar teixit per la detecció de VPH. Es tracta d'un mètode molt sensible, però té un percentatge de falsos positius en quant a la detecció de virus d'alt risc degut a les reaccions creuades amb VPH de baix risc que la literatura situa entre un 6 i un 15%. El resultat que s'obté és una negativitat o positivitat per virus d'alt risc, i a més presenta l'avantatge que semiquantifica la càrrega viral. Tot i això, no permet distingir entre els diferents tipus virals ni presència d'infeccions múltiples.

El principal inconvenient d'aquest mètode és que no permet distingir entre els diferents tipus virals.

Es detecten els tipus de virus d'alt risc 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, que s'ha demostrat que són el principal factor casual per l'aparició del càncer de coll uterí.

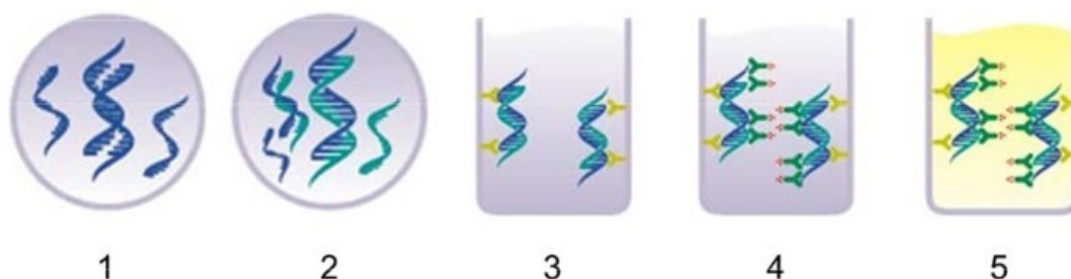


Figura 25: Esquema del mètode de la CH2

CERVISTA (Hologic, Bedford, MA, USA)

És una tècnica automatitzada de detecció del VPH basada en la hibridació, que permet analitzar mostres en citologia líquida. És una prova de diagnòstic *in vitro* per la detecció qualitativa de 14 tipus de VPH-AR en mostres cervico-uterines que ha estat validada analítica i clínicament i es detecta en tres grups diferents (Mix 1: 51,56,66;

Mix2: 18,39,45,59,68 and Mix 3:16,31,33,35,52,58). Cervista HPV HR no identifica per tipus específic de VPH. Cervista 16/18 permet la detecció de VPH 16 i 18 i va ser aprovat per la FDA l'any 2009 per usar-la amb la citologia cervical en dones majors de 30 anys.

Cervista utilitza la química "Invader" com a mètode d'amplificació de senyal de detecció específiques d'àcids nucleics. Aquest mètode fa servir dos tipus de reaccions isotèrmiques que succeeixen simultàniament: una reacció primària en la seqüència de l'ADN objectiu i una reacció secundària, que produeix una senyal fluorescent.

El resultat informa de positivitat o negativitat per VPH-AR però no informa de la càrrega viral (65).

Mètodes d'amplificació molecular basats en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Existeixen múltiples kits comercials basats en la reacció en cadena polimerassa (PCR), però els únics aprovats per la FDA són el COBAS 4800 i APTIMA HPV.

La tècnica de PCR es basa en l'amplificació d'un fragment de DNA usant l'enzim PCR polimerassa. Aquest fragment es selecciona a través de les regions de DNA immediatament abans i després del mateix. S'utilitza un fragment de DNA (anomenat primer) d'aquestes regions que flanquegen la regió desitjada. Es crea així una reacció en cadena que amplifica el fragment que ens interessa. Això permet, teòricament que es produeixin un milió de còpies a partir d'una única molècula de DNA de doble cadena després de només 30 cicles. Presenta com inconvenient que una mínima contaminació de la mostra pot produir falsos positius, donat la facilitat en amplificar la mostra.

La sensibilitat i especificitat de les tècniques de PCR poden variar molt depenent de les regions que s'amplifiquen, es a dir, el primer que es faci servir per l'amplificació. Aquest és un dels principals aspectes que es diferencien vàries de les proves que es basen en la PCR.

Existeix una variant de la PCR anomenada Real-Time PCR. Combina els primers amb

sondes fluorescents i permetent obtenir un resultat quantitatiu. És un mètode molt reproducible, ràpid i aplicable a mostres clíniques.

La PCR és un mètode d'amplificació molecular que permet identificar molt petites quantitats d'ADN amb una sensibilitat capaç de detectar 10 còpies d'ADN viral entre un milió de cèl·lules. L'amplificació de la regió d'interès després pot ser visualitzada mitjançant diverses tècniques. Es basa en la detecció de la presència de genoma de papil·lomavirus mitjançant la cadena de polimerasa i hibridació específica mitjançant hibridació inversa en tira de nitrocel·lulosa. El seu principal avantatge és que permet identificar el tipus específic de VPH. Per realitzar la PCR en el laboratori és necessari disposar de personal especialitzat.

Existeixen dues alternatives fonamentals per la detecció de VPH basada en la PCR convencional. El mètode més emprat és el de la PCR consens, en el qual s'amplifica una regió amb seqüència molt similar entre tots els VPH i posteriorment, mitjançant mètodes d'hibridació específica, enzimàtics o de seqüenciació d'ADN, es realitza la tipificació específica del virus.

L'altre mètode és la PCR específica està basada en el disseny de *primers* específics per a cada tipus viral. D'altra banda, permet realitzar l'anàlisi d'integració viral, detecció de variants i la quantificació normalitzada (càrrega viral relativa al número de cèl·lules).

El mètode més utilitzat és la "PCR consens", en la qual s'amplifica una regió amb seqüència molt similar entre tots els VPHs per, posteriorment, per mètodes d'hibridació específica, enzimàtics o seqüenciació d'ADN, realitzar el genotip específic del virus. El primer encebador que es va fer servir va usar com a diana d'amplificació la regió comú de L1, utilitzant els "primers" MY09 i MY11. L'amplificat que genera és d'aproximadament 450 parells de bases. Després s'han dissenyat variants com PGMY09/11, GP5/GP6 o la seva variant GP5+/GP6+ o SPF10 entre d'altres. A menor regió per amplificar, major és la sensibilitat per detectar la presència del VPH.

COBAS 4800

El Cobas 4800 és una prova qualitativa in vitro que detecta 14 tipus de VPH-AR i que ha sigut validada clínicament. Pot detectar 12 genotips d'alt risc

(31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68) i reporta específicament els genotips d'alt risc 16 i 18. La tècnica utilitza el gen de la β globina com control intern per la integritat, extracció i amplificació de la mostra. Aquesta prova va ser aprovada per la FDA per cribratge primari.

L'equip està totalment automatitzat, facilitant la feina a laboratori; consta d'un termociclador Cobas Z i el software necessari per la realització de la PCR en temps real, usant primers o encebadors, per la regió L1 del VPH. El procediment inclou el processament de mostres d'extracció d'ADN i l'anàlisi per la tecnologia de PCR en temps real. La tècnica no presenta reactivitat creuada amb genotips no carcinogènics.

Comparant-la amb CHII ha demostrat una sensibilitat del 100% per la detecció de CIN3 i un 98% per la detecció de CIN2 (66).

CLART2HPV

Fora de mètodes reconeguts per FDA per cribratge, tenim el sistema CLARTHPV que consisteix en un mètode semiautomatitzat de genotipatge viral basat en l'amplificació d'oligonucleòtids (*primers*) per la seva acció polimerassa, detectant 35 genotips (20 d'alt risc i 15 de baix risc). És el mètode que hem utilitzat en aquest estudi pel genotipatge del VPH-AR.

Detecta la presència dels 35 VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 i 89) amb major importància clínica.

La detecció és duu a terme mitjançant l'amplificació d'un fragment d'uns 450pb dins la regió L1 del virus per tractar-se d'una seqüència que està altament conservada en els diferents tipus de VPH. Sens dubte, aquesta regió presenta suficients variacions com per poder diferenciar cada tipus amb sondes específiques. D'aquesta manera, s'assegura l'especificitat de la detecció.

És una tècnica basada en microarrays de baixa densitat que simplifica el procés d'hibridació i visualització en front els sistemes arrays clàssics.

Mètodes de detecció ARN-VPH

El procés carcinogènic és regulat per les oncoproteïnes E6 i E7 del VPH, per tant, l'expressió excessiva d'aquests gens és un marcador de risc pel càncer de cèrvix. S'ha postulat que la detecció de l'expressió d'oncogens E6/E7 podria ser més específica i predir millor el risc de càncer que la prova ADN-VPH.

APTIMA

És una prova qualitativa que es basa en la detecció directa de l'expressió de ARNm de les oncoproteïnes E6 i E7, procedent dels 14 tipus de VPH-AR (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 i 68) mitjançant una amplificació en temps real. La prova APTIMA HPV no discrimina entre els 14 tipus.

Aquesta tècnica va ser aprovada per la FDA en 2011 pel cribratge en dones a partir dels 30 anys, en combinació amb la citologia (67).

Taula 9: Rendiment de les proves de VPH utilitzades en cribratge primària (68)

Prova	Sensibilitat CIN2+	Especificitat
Captura d'híbrids	97,5%	84,3%
Cervista HPV 16/18	100%	85,4%
Cobas 4800 HPV	97,3%	84,5%
Aptima HPV	97,6%	90,2%

Proteïnes del VPH

Aquests tests es basen en la detecció dels nivells de determinades proteïnes en cèl·lules obtingudes d'una mostra cervical.

El més estudiat d'aquests assaigs és el que determina la presència de la proteïna E6, que en estudis recents sembla presentar major especificitat que els tests d'ADN, tot i que disminuint la seva sensibilitat. És per aquesta raó que es planteja el seu ús com a complement diagnòstic en els casos de pacients portadores VPH-AR.

Proteïna p16

La detecció de la proteïna p16 junta o separada de la Ki-67, s'ha estudiat com un mètode de triatge de les lesions cervicals de baix grau.

La quantitat d'oncoproteïnes pot ser estimada mitjançant la detecció d'un marcador d'expressió proteïna com és l'ARN missatger d'E6 i E7, donat que pel moment no és possible detectar les immunoproteïnes E6 i E7 immunohistoquímicament.

La immensa majoria de lesions preneoplàsiques i càncers cervicals han demostrat presentar una sobreexpressió de la proteïna p16, mentre que en teixits normals la trobem molt poques vegades, degut a que l'acció de la proteïna E7 en els virus d'alt risc és fins a 10 vegades més efectiva que en els de baix risc.

Tot i això, el fet que un petit percentatge de casos sense alteracions displàsiques puguem trobar aquesta proteïna sobreexpressada, fa que es requereixi una avaluació histològica addicional per dur a terme una correcta avaluació.

L'expressió de p16 sembla ser independent del virus d'alt risc que provoca la infecció oncogènica, per la qual cosa seguirà sent necessària la tipificació del virus per tècniques de detecció d'ADN.

A més a més, a diferència d'altres marcadors tumorals clàssics, p16 no s'associa a proliferació, no expressant-se en altres cèl·lules normals amb alta capacitat proliferativa. La sensibilitat de p16 per detectar casos de CIN2+ es situa en un 83% i una especificitat del 70% (69,70).

CINtec PLUS Cytology Kit

És un assaig immunohistoquímic per la detecció qualitativa simultània de les proteïnes p16 i Ki-67 en preparacions citològiques cervicals. Està indicat el seu ús en pacients amb diagnòstic d'ASCUS, LSIL i VPH positiu amb citologies negatives.

En les cèl·lules eucariòtiques, el control de la progressió del cicle de divisió cel·lular és regulat per un complex patró d'expressió controlada i modificacions translacionals de les proteïnes que regulen el cicle cel·lular. La proteïna p16INK4a té un paper important en el mecanisme de regulació del cicle cel·lular eucariòtic. Així doncs p16 desencadena la detenció del cicle cel·lular en el transcurs dels processos de diferenciació cel·lular. D'aquesta manera, proporciona un efecte antiproliferatiu durant la progressió del cicle cel·lular regular. En les cèl·lules epitelials diferenciades terminalment, p16 disminueix fins a nivells normalment no detectables mitjançant immunohistoquímica.

Ki-67 és una proteïna associada a la proliferació que pot trobar-se exclusivament en el nucli de les cèl·lules proliferants. Els anàlisis del cicle cel·lular han revelat que l'antigen Ki-67 està present a nivells detectables en totes les fases de la proliferació cel·lular així com en la mitosis, mentre que les cèl·lules inactives o en repòs en la fase G0 no expressen l'antigen.

Com que les cèl·lules que sobreexpressen p16 poden proliferar activament només quan s'altera el mecanisme de control del cicle cel·lular, l'expressió de p16 i el marcador de proliferació Ki-67 dintre d'una mateixa cèl·lula haurien d'excloure's mútuament en condicions fisiològiques normals. Per tant, l'expressió concomitant de p16 i Ki-67 en determinades cèl·lules es pot utilitzar com un marcador de desregulació del control del cicle cel·lular en les cèl·lules respectives (71).

Nombrosos estudis han demostrat la utilitat clínica d'aquest marcador molecular, amb una sensibilitat que es situa prop del 90% i sobretot augmentant l'especificitat fins al 80% respecte la detecció de VPH-AR (72–74).

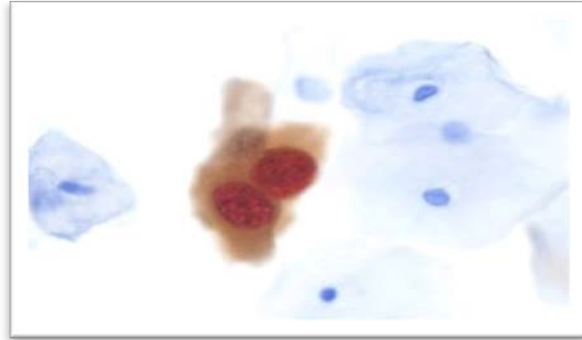


Figura 26: Cèl·lula p16/Ki-67 positiva

2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

La infecció persistent per VPH-AR és la principal causa de càncer de cèrvix. Un 80% de les dones han estat infectades per VPH en algun moment de la seva vida, però només un 15% desenvolupen malaltia. Nombrosos estudis epidemiològics han demostrat el paper del VPH en el cribratge primari del càncer cervical, així com en la vigilància posttractament d'una conització cervical.

El diagnòstic d'una lesió de LSIL en una pacient obliga a la realització d'una colposcòpia amb biòpsia dirigida per descartar la presència de CIN2+. Si es descarta la lesió d'alt grau es sotmet a la pacient a controls semestrals per valorar la regressió, la persistència o l'evolució de la lesió.

L'evidència obtinguda en els darrers anys ens demostra que aquestes lesions regressen espontàniament en un 80%, fet que ens fa plantejar-nos un mètode de cribratge de les LSIL amb objecte d'identificar les lesions amb alt risc de progressió.

L'elevat número de dones diagnosticades de LSIL després del cribratge citològic constitueixen una problemàtica no resolta. L'heterogeneïtat d'aquest grup respecte el verdader risc de desenvolupar un càncer invasiu, sovint motiva que un subgrup d'aquestes pacients es vegin perjudicades dels efectes desfavorables d'un tractament innecessari o d'una conducta expectant en pacients que progressaran a càncer invasiu.

Per tant, per aconseguir un test que tingui una elevada especificitat i sensibilitat a nivell clínic, aquest hauria de detectar únicament aquells casos de LSIL que en un futur evolucionaran a CIN2+.

Per aquesta raó, l'aplicació de diferents tests moleculars disponibles, entre ells l'ús de la detecció de la infecció per VPH, el genotipat de determinats VPH o la positivitats per p16/Ki67 ofereixen futures perspectives per seleccionar aquelles pacients amb risc d'evolució.

3. HIPÒTESIS DE L'ESTUDI

HIPÒTESIS

Hipòtesi 1: La detecció de la infecció per VPH en les pacients LSIL/ASCUS permet identificar els casos amb major risc de progressió a CIN2+, i suggestives d'un major control.

Hipòtesi 2: La detecció de determinats genotips VPH en les pacients ASCUS-LSIL permet identificar els casos amb major risc de progressió a CIN2+, i suggestives d'un major control.

Hipòtesi 3: La positivitat per la tinció dual p16/Ki67 en pacients VPH 16/18 permet identificar els casos amb major risc de progressió a CIN2+, i suggestives d'un major control.

4. OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIU PRIMARI:

- Calcular el risc de persistència i d'evolució a CIN2+ en les pacients amb resultat citològic ASCUS/LSIL en funció dels marcadors moleculars:
 - La detecció de la infecció per VPH
 - La determinació del genotip de VPH específic
 - La sobreexpressió de p16/ki-67

OBJECTIUS SECUNDARIS:

1. Conèixer les característiques de les pacients amb displàsia cervical lleu de la nostra àrea d'influència en el període de temps estudiat.
2. Estudiar la detecció i distribució dels genotips de VPH en les lesions de baix grau.
3. Descriure la història natural de la LSIL en les nostres pacients: taxes de regressió, persistència o evolució.
4. Avaluar la relació entre l'evolució de la lesió cervical i les característiques demogràfiques i epidemiològiques.
5. Avaluar la relació entre l'evolució de la lesió cervical i els resultats citològics en el moment basal.
6. Avaluar la relació entre l'evolució de la lesió cervical i els resultats colposcòpics en el moment basal.
7. Estudiar la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN per la detecció de VPH.
8. Estudiar la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN en el genotipatge del VPH.
9. Estudiar la sensibilitat, especificitat, VPP i VPH de la tinció dual p16/Ki-67.

5. MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL I MÈTODES

Disseny de l'estudi

Es tracta d'un estudi observacional, prospectiu, de tall longitudinal que inclou pacients de l'àrea de Metropolitana Nord de la província de Barcelona.

Els casos inclosos en l'estudi s'han recollit a partir de les pacients que s'han visitat a la Unitat de Patologia Cervical de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i a la Unitat de Patologia Cervical del ASSIR Badalona-Sant Adrià del Besós des de juliol 2012 fins al juliol 2013 i han estat diagnosticades de displàsia cervical lleu.

Àmbit d'estudi

La població de l'estudi ha inclòs pacients amb displàsia cervical lleu controlades a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, de Badalona, Barcelona (Universitat Autònoma de Barcelona), a l'ASSIR La Riera i a l'ASSIR Dr. Barraquer. Aquest hospital inclou com a àrea de referència un Sector de la regió Sanitària de Metropolitana Nord, amb una cobertura de 250.000 habitants. El temps de recollida ha estat de 12 mesos, des de juliol 2012 fins a juny 2013.

Subjectes

Les pacients incloses a l'estudi han estat visitades en el consultori de patologia cervical de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i de l'ASSIR Badalona-Sant Adrià del Besós, per troballa de lesió cervical lleu en el programa de cribratge.

Es van diagnosticar 398 dones de lesió cervical i aplicant els criteris d'inclusió i exclusió es van incloure 266 dones a l'estudi.

- *Criteris d'inclusió:*

- Totes aquelles pacients amb troballa de citologia amb displàsia cervical lleu visitades a la Unitat de Patologia Cervical (HUGTIP i ASSIR Badalona) que han realitzat el diagnòstic, el tractament i el posterior seguiment durant dos anys en aquest centre.

- Sense patologia cervical prèvia els últims dos anys
- Criteris d'exclusió:
 - Pacients diagnosticades en un altre centre
 - Pacients tractades en un altre centre
 - Patologia cervical prèvia
 - Canvi de domicili, pèrdua de seguiment
 - Barrera idiomàtica
 - Pacients portadores VIH

Recopilació de les mostres

Estudi citològic

Els estudis citològics es van realitzar a totes les pacients i es van classificar segons el sistema Bethesda que inclou les següents categories: atípia glandular de significat incert (AGUS), atípia escamosa de significat incert (ASCUS), lesió cervical intraepitelial de baix grau (LSIL) que inclou les displàsia lleu i lesió intraepitelial cervical d'alt grau (HSIL) que correspon a les displàsies moderades i severes.

Estudi histològic

Totes les dones han estat examinades mitjançant estudi colposcòpic amb una solució d'àcid acètic 3-5%. S'ha utilitzat la nova terminologia colposcòpica de la Federació Internacional de Patologia Cervical i Colposcòpia acceptada al Congrés de Rio l'any 2011: troballes normals, troballes anormals (epiteli acetoblanc, mosaic, puntejat, iode negatiu, vasos atípics), canvis suggestius de carcinoma invasor i colposcòpia no satisfactòria pel diagnòstic.

Les mostres han estat obtingudes mitjançant biòpsia dirigida amb l'examen colposcòpic en les àrees del cèrvix amb troballes atípiques. Les biòpsies van ser fixades amb parafina i són analitzades per dos patòlegs diferents, especialitzats en patologia cervical i classificades segons: negativa, neoplàsia intraepitelial cervical tipus 1, 2 i 3 (CIN 1, 2 o 3), carcinoma, adenocarcinoma i troballes atípiques.

Detecció ADN VPH (*High Risk HPV DNA Test Hybrid Capture 2*® (CH2))

Es va determinar l'ADN del VPH mitjançant la tècnica captura d'híbrids realitzada al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

Es detecten els tipus de virus d'alt risc 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68. És un assaig d'hibridació d'àcids nucleics mitjançant l'amplificació de la senyal i l'ús de quimioluminescència en microplaca per la detecció qualitativa de 13 tipus d'alt risc d'ADN virus del papil·loma humà (VPH) en mostres cervico-uterines.

Les mostres que contenen l'ADN diana s'hibriden amb una sonda ARN específica del VPH. Els híbrids ADN-ARN resultants es capturen a la superfície dels pouets de la microplaca, recoberts per anticossos específics per aquests híbrids. A continuació, els híbrids immobilitzats reaccionen amb anticossos conjugats amb fosfatasa alcalina, específics pels híbrids d'ADN-ARN i es detecten mitjançant un substrat quimioluminescent. Vàries molècules de fosfatasa alcalina es conjuguen amb cada anticòs. Un gran nombre d'anticossos conjugats s'uneixen a cada híbrid capturat, amplificant així significativament la senyal. A mesura de la fosfatasa alcalina unida degrada el substrat, s'emet llum, que es mesura en unitats lumíniques reactives (URL).

Una determinació de URL igual o superior al valor de tall indica la presència de seqüències d'ADN del VPH d'alt risc en la mostra. Una determinació de URL inferior al valor de tall indica l'absència de VPH d'alt risc o bé la presència de nivells d'ADN inferiors al nivell de detecció.

Determinació del genotip del VPH per PCR (*CLART*® *Papillomavirus humano 2*)

Per determinar el genotipatge del VPH es va realitzar el kit d'amplificació CLART® HPV2 (Genomica). Es van fer servir 5 µl d'ADN purificat per l'amplificació de la reacció en cadena de la polimerassa. La regió que s'amplifica és la del gen polimòrfic L1 del genoma viral. Es detecten i genotipen un total de 35 genotips de la mucosa identificats segons manual del kit com: 15 tipus d'alt risc (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82), tres genotips potencialment d'alt risc (26, 53 y 66), 11 genotips de baix risc (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 i 81) i sis genotips de risc desconegut (62,

71, 83, 84, 85 i 89). També s'amplifica un gen endògen per avaluar la cel·lularitat de la mostra, l'extracció d'ADN i l'absència d'inhibidors de PCR.

Abans de la visualització, els productes de la reacció en cadena de polimerassa es van desnaturalitzar a 95°C durant 10 minuts. La visualització es va realitzar fent servir 10 µl de la desnaturalització del producte de PCR al microarray CLART. El sistema de detecció amb CLART *Papillomavirus humà 2* es basa en la precipitació d'un producte insoluble en aquelles zones de microarray en les que es produeix la hibridació dels productes amplificats amb les sondes específiques. Durant la PCR, els productes amplificats es marquen amb biotina. Després de l'amplificació, aquests productes s'hibriden amb les seves respectives sondes específiques que estan immovilitzades en zones concretes i conegudes com microarray, incubant-se després amb un conjugat de estreptavidina-peroxidasa. El conjugat s'uneix a través de l'estreptavidina amb la biotina present en els productes amplificats (que a la vegada es troben units a les seves sondes específiques) i l'activitat peroxidasa provoca l'aparició d'un producte insoluble en presència del substracte o-dianisidina, que precipita sobre las zones del microarray en las que succeeix la hibridació.

El precipitat es va analitzar automàticament al Clinical Array Reader (Genomica).

Detecció de les proteïnes p16/ki-67 (CINtecPLUS® Roche Diagnostics)

CINtec PLUS és un assaig immunohistoquímic per la detecció qualitativa simultània de les proteïnes p16 i Ki-67 en preparacions citològiques cervicals.

El kit CINtec PLUS detecta i tenyeix dos biomarcadors: la proteïna p16, reguladora del cicle cel·lular àmpliament validat i Ki-67, un marcador de proliferació cel·lular activa.

La tinció dual actua mitjançant dos anticossos units a dos cromògens diferents, de manera que les cèl·lules amb positivitat per p16 mostraran tinció citoplasmàtica i/o nuclear de color marro i aquelles amb positivitat per Ki67 mostraran coloració nuclear vermella. La detecció simultània d'ambdós marcadors en les cèl·lules indiquen una situació aberrant i per tant desregulació cel·lular que està associat a un fenotip maligne.

Permet el reconeixement de cèl·lules neoplàsiques, amb cicle cel·lular alterat i proliferació descontrolada, en mostres citològiques de cèrvix uterí tant d'origen escamós com glandular, mitjançant la immunoexpressió simultània de p16 i Ki67, millorant l'especificitat en el diagnòstic citològic.

Definició de les variables

La variable objecte de l'estudi és Evolució de la lesió cervical. S'han classificat en curació, persistència o progressió.

Definim com:

- **CURACIÓ:**
 - A. Dos citologies normals en un any separades per 6 mesos i VPH negatiu
- **PERSISTÈNCIA:**
 - A. La lesió LSIL/ASCUS es manté durant els dos anys de seguiment
 - B. VPH positiu
- **PROGRESSIÓ**
 - A. Diagnòstic de CIN2, CIN3, carcinoma in situ de cèrvix o carcinoma invasor mitjançant biòpsia dirigida per biòpsia

Per tal de definir aquesta lesió cervical i associar-la als marcadors moleculars estudiats, s'ha definit també:

- Tipus de lesió cervical
 - a. Citològica (Canvis associats a VPH, LSIL, HSIL, ASCUS, ASCUS-H, ADK)
 - b. Histològica (CIN1, CIN2, CIN3, ADK)
- Detecció de l'ADN de VPH
 - a. Detecció dels tipus de virus d'alt risc 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, que s'ha demostrat que són el principal factor casual per l'aparició del càncer de coll uterí
- Determinació dels genotips VPH específic

- a. Detecta la presència dels 35 VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 i 89) amb major importància clínica.
- Detecció p16/Ki67
 - a. Positiu o negatiu per la tinció dual.

D'altra banda, per tal d'associar la variable objecte amb altres cofactors, s'han estudiat de cada pacient inclosa a l'estudi altres variables.

- *Variables de tipus sociodemogràfic:*
 - o Edat
- *Variables que fan referència a patologies prèvies*
 - o Immunosupressió i tipus (VIH, transplantament, tractament immunosupressor, malalties autoimmunes entre d'altres)
- *Variables que fan referència a la història gineco-obstètrica*
 - o Menarquia
 - o Planificació familiar
 - o Inici de RS
 - o Parelles sexuals durant tota la vida
 - o Parelles sexuals últim any
 - o Antecedent de condilomes
 - o Antecedent d'altres malalties de transmissió sexual
- *Variables que fan referència als factors de risc:*
 - o Tabac
 - o Alcohol

PROTOCOL DE CONTROL I SEGUIMENT

Es van incloure en l'estudi 266 pacients diagnosticades de LSIL des de juny de 2012 fins juny 2013.

Les dades es van recollir als següents moments:

- A la **primera visita** de patologia cervical (0m);
 - A través d'una entrevista directa:
 - Antecedents patològics, intervencions prèvies, antecedents gineco-obstètrics i hàbits tòxics
 - Informació de les característiques i objectius de l'estudi i signatura del consentiment informat (annexe)
 - A través de l'exploració de la pacient
 - Exploració ginecològica bàsica: exploració genitals externs, observant la presència de condilomes genitals o anals.
 - Exploració cervical i vaginal:
 - Espècul i visualització directa de vagina i cèrvix sense preparació
 - Recollida de mostra per citologia i determinació de VPH (ThinPrep amb 30mL de PreservCyt (Hologic, Marlboroug, MA, U.S.A))
 - *Detecció ADN VPH*
 - *Determinació genotip VPH específic*
 - *Tinció dual*
 - Colposcòpia:
 - Exploració directa: Filtre verd
 - Test de l'àcid acètic: Aplicació d'àcid acètic al 3-5% amb tampó de cotó per visualitzar les àrees displàsiqes.
 - Valoració colposcòpica emprant els paràmetres internacionals (Classificació colposcòpica de Rio de Janeiro 2011. IFCCP)
 - Biòpsia amb pinça Kevorkien en casos indicats
- A la **segona visita** de patologia cervical (6m);
 - A través d'una entrevista directa:

- Actualització de factors de risc (canvi de parella, mètode anticonceptiu, tabaquisme)
 - través de l'exploració de la pacient
 - Exploració ginecològica bàsica: exploració genitals externs, observant la presència de condilomes genitals o anals.
 - Exploració cervical i vaginal:
 - Espècul i visualització directa de vagina i cèrvix sense preparació
 - Citologia cervical
 - Colposcòpia segons tècnica habitual i eventual biòpsia
 - En funció dels resultats obtinguts en la citologia i la biòpsia, es van classificar en funció de si va haver curació, persistència o evolució.
- A la **tercera visita** de patologia cervical (moment 12m);
 - A través d'una entrevista directa:
 - Actualització de factors de risc (canvi de parella, mètode anticonceptiu, tabaquisme)
 - A través de l'exploració de la pacient
 - Exploració ginecològica bàsica: exploració genitals externs, observant la presència de condilomes genitals o anals.
 - Exploració cervical i vaginal:
 - Espècul i visualització directa de vagina i cèrvix sense preparació
 - Recollida de mostra per citologia i determinació de VPH
 - *Detecció ADN VPH*
 - *Determinació genotip VPH específic*
 - Colposcòpia segons tècnica habitual i eventual biòpsia
- A la **quarta visita** de patologia cervical (moment 18m);
 - A través d'una entrevista directa:
 - Actualització de factors de risc (canvi de parella, mètode

- anticonceptiu, tabaquisme)
 - través de l'exploració de la pacient
 - Exploració ginecològica bàsica: exploració genitals externs, observant la presència de condilomes genitals o anals.
 - Exploració cervical i vaginal:
 - Espècul i visualització directa de vagina i cèrvix sense preparació
 - Citologia cervical
 - Colposcòpia segons tècnica habitual i eventual biòpsia
 - En funció dels resultats obtinguts en la citologia i la biòpsia, es van classificar en funció de si va haver curació, persistència o evolució.
- A la **cinquena visita** de patologia cervical (moment 24m);
 - A través d'una entrevista directa:
 - Actualització de factors de risc (canvi de parella, mètode anticonceptiu, tabaquisme)
 - A través de l'exploració de la pacient
 - Exploració ginecològica bàsica: exploració genitals externs, observant la presència de condilomes genitals o anals.
 - Exploració cervical i vaginal:
 - Espècul i visualització directa de vagina i cèrvix sense preparació
 - Recollida de mostra per citologia i determinació de VPH
 - *Detecció ADN VPH*
 - *Determinació genotip VPH específic*
 - Colposcòpia segons tècnica habitual i eventual biòpsia
 - En funció dels resultats obtinguts en la citologia i la biòpsia, es van classificar en funció de si va haver curació, persistència o evolució.

ANÀLISIS ESTADÍSTIC

Les anàlisis descriptives i l'anàlisi inferencial s'han realitzat amb una confiança del 95% amb *SPSS Advanced Models*™ 15.0 (*SPSS Inc. 233 South Wacker Drive, 11th Floor Chicago, IL 60606-6412*).

En primer lloc s'ha realitzat una anàlisi descriptiva de les dades en el moment basal. Els resultats de les variables qualitatives s'han expressat en freqüències absolutes i percentatges, i les variables quantitatives amb la mitjana i la desviació estàndard (DE). A continuació s'ha fet la mateixa anàlisi descriptiva en cada moment de seguiment per veure quina és l'evolució de la lesió i l'evolució del marcador molecular (en funció del virus). Per tal d'assolir els nostres objectius principals, s'ha comparat les pacients en funció del tipus de lesió cervical, la detecció del VPH, el tipus de virus, la detecció de p16/Ki-67 i si hi hagut evolució.

La prova de Ji-quadrat de Pearson (χ^2) i la prova de Fisher exacta s'han utilitzat per comparar proporcions.

Una anàlisi multivariant mitjançant regressió logística s'ha emprat per valorar la relació entre les variables independents i la variable dependent binària. De forma resumida, prèviament s'ha realitzat un anàlisi bivariàble per determinar quines variables (o factors de risc) estaven associades amb les variables dependents. Totes les variables que van ser significatives en l'anàlisi bivariàble ($p < 0,10$) o clínicament rellevants varen ser valorades per la col·linealitat i posteriorment va ser aplicat l'anàlisi multivariant.

La Prevalença (P) i la Incidència Acumulada o Risc (R) s'han emprat com a mesures de freqüència. El Risc Relatiu (RR) s'ha fet servir com una mesura d'associació entre els factors de risc i les variables dependents.

La validesa de les proves de diagnòstic s'ha avaluat amb els índex de Sensibilitat, Especificitat, Valor Predictiu de la Prova Positiva i Valor Predictiu de la Prova Negativa. Finalment, s'ha realitzat una anàlisi de supervivència mitjançant el mètode no paramètric de Kaplan-Meier. Les corbes de supervivència s'han comparat mitjançant la prova de Mantel-Haenzel.

ASPECTES ÈTICS

L'estudi "Marcadors moleculars com a factors de persistència i evolució de les lesions cervicals lleus" va ser avaluat per comitè d'ètica de l'IGTP de l'Hospital Germans Trias i Pujol amb resultat satisfactori.

Ha estat inclòs en la línia d'investigació de patologia cervical.

El laboratori ROCHE va cedir els kits CINTec Plus®.

6. RESULTATS

RESULTATS

1. Anàlisi descriptiu de la població estudi

1.1. Diagrama de fluxos

De les 398 pacients diagnosticades de lesió de baix grau durant el període de l'estudi en aplicar els criteris d'inclusió i exclusió del mateix, es va obtenir una mostra de 266 pacients amb citologia LSIL o ASCUS que van ser les que finalment es van incloure a l'estudi.

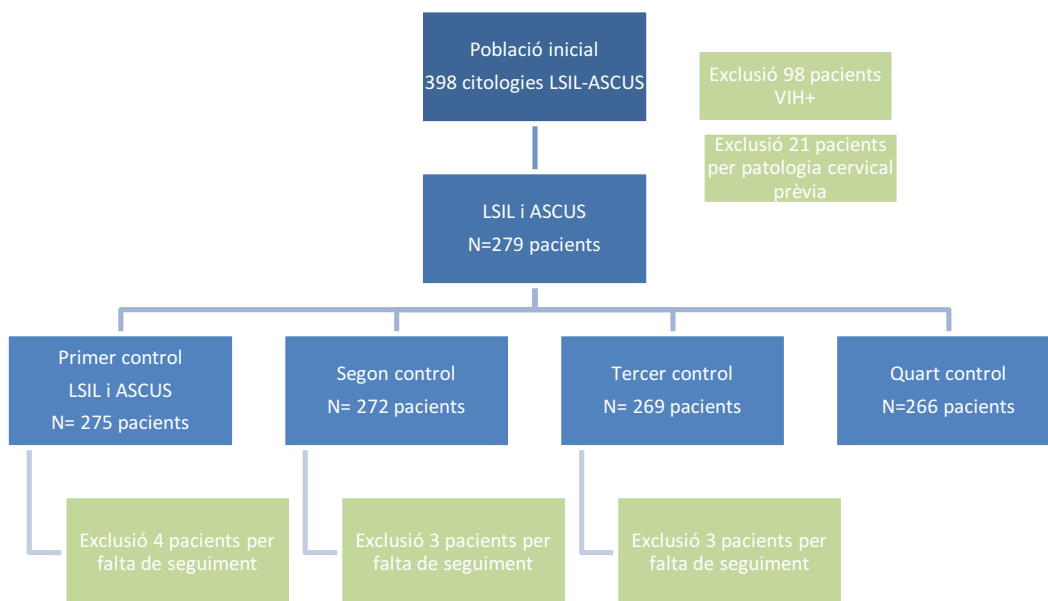


Figura 27: Diagrama de fluxos del nostre estudi

1.2. Característiques demogràfiques i clíniques de la nostra mostra

Les pacients incloses a l'estudi tenien una **edat** compresa entre els 18 i 82 anys, amb una edat mitja de 37,6 anys (+/-11,9) i una mitjana de 36.

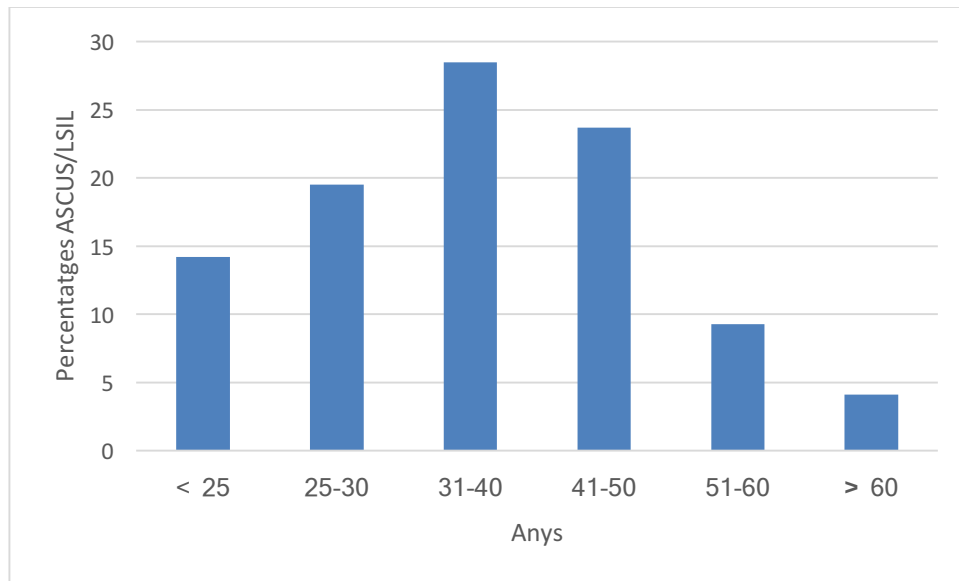


Figura 28: Distribució de las pacients LSIL/ASCUS per grups d'edat

Com es pot observar en el gràfic, la majoria de les dones estudiades es trobaven entre els 31 i 40 anys (28,5%), amb tendència al descens a partir d'aquesta edat.

Respecte a l'**edat d'inici de les relacions sexuals**, va variar entre els 13 i els 32 anys. La majoria de dones havien iniciat les relacions sexuals a una edat de 17 anys o superior (195 dones). Pel que fa al número de **parelles sexuals**, un 62,4% de les dones havien tingut entre 1 i 5 parelles sexuals, mentre que només un 35,3% n'havien tingut més de 5. Pel que respecte a les **relacions sexuals durant el darrer any**, 206 dones havien tingut només una parella, mentre que el 17,1% n'havien tingut més. La pacient amb més parelles sexuals durant l'últim any va tenir-ne 9.

Respecte a la **paritat**, el 50,7 pacients eren nul·líparas (135 pacients), mentre que un 49,2% havien tingut un o més fills (131 pacients). De la nostra mostra, el 17,6% de les

pacients tenien un fill previ al diagnòstic, el 24% tenien dos fills previs, el 6,7% tenien tres fills, una pacient tenia 5 fills i una tenia 6 fills.

Respecte el mètode de **planificació utilitzat**, el més freqüentment utilitzat va ser el preservatiu, per 84 dones (31,5%). Un total de 82 pacients (30,8%) de les pacients no feien servir cap mètode de planificació familiar, el 26,6 % (71 pacients) utilitzaven anticoncepció hormonal, el 3,3% (9 pacients) utilitzen el DIU i el 7.5% (20 pacients) tenen un mètode anticonceptiu definitiu.

Pel que fa a l'**estat menopàusic**, el 13,2% de les nostres pacients eren menopàusiques.

L'**hàbit tabàquic** estava present en el 50 % de les pacients (133 pacients), de les quals 85 fumaven una quantitat igual o superior a 15 cigarretes al dia (63,9%). Entre les pacients fumadores, la mitja de cigarretes al dia va ser de 10,9 (1-60).

Només 22 pacients de la mostra (8,3%) presentaven **immunosupressió**. D'entre les malalties immunosupressores de la nostra mostra, vam trobar 5 malalties inflamatòries intestinal, 4 artritis reumatoides, 4 esclerosis múltiples, 3 lupus eritematosos sistèmics, 4 tractaments amb quimioteràpics, 2 transplantaments en tractament amb immunosupressors i una immunodeficiència variable comuna.

Les característiques de la població estudiada es reflexa a la següent taula:

Taula 10: Característiques de la població estudi

Característiques	Número	%
Dones (n)	266	
Edat	37,5 (18-82)	
Paritat		
No	134	50,4
Si	131	49,2
Numero de fills		
Cap	131	49,2
1	47	17,7
2	64	24,1
3	18	6,8
>3	2	0,8
Primera relació sexual		
<17 anys	60	22,6
>17 anys	172	64,7
Numero de parelles sexuals		
1-5	166	62,4
>5	94	35,3
Planificació familiar		
Cap mètode	80	30
Preservatiu	85	30
ACH	71	26
DIU	9	3
Mètodes quirúrgics	21	7
Menopausa		
No	231	86,8
Si	35	13,2
Tabaquisme		
No	133	50
Si	133	50
Immunosupressió		
Cap	244	91,5
Transplantament d'òrgans	2	0,8
Malalties autoimmunes	11	4,3
Malaltia inflamatòria pèlvica	5	1,8
Quimioteràpia	4	1,6

1.3. Resultats a l'inici de l'estudi

1.3.1. Citologia

Els resultats de la citologia van mostrar 198 pacients (75,9%) amb LSIL i 62 pacients (23,3%) amb diagnòstic citològic d'ASCUS.

Taula 11: Resultats de la citologia en el moment d'inici de l'estudi

	N pacients	%
ASCUS	62	23,3
LSIL	198	75,9

1.3.2. Colposcòpia i biòpsia

Totes les pacients incloses a l'estudi van ser sotmeses a una colposcòpia i si aquesta era patològica o no satisfactòria es va realitzar una biòpsia cervical o un legrat endocervical.

En funció dels canvis colposcòpics trobats, i seguint la classificació colposcòpica de Rio de Janeiro 2011, es va classificar les colposcòpies en canvis menors, canvis majors, normal o colposcòpia no satisfactòria. La colposcòpia mostrà lesions compatibles amb canvis menors en un 65,4% dels casos, canvis majors en un 4,1%, no va ser satisfactòria en un 1,5% i el 28,6% no presentaven canvis a la colposcòpia.

Taula 12: Resultat de la colposcòpia a l'inici de l'estudi

Colposcòpia	N pacient	%
Normal	76 (28,6%)	28,6
Canvis menors	174 (65,4)	65,4
Canvis majors	11	4,1
No satisfactòria	5	1,9

Els canvis colposcòpics més freqüentment observats van ser l'epiteli acetoblanc prim (53,3%), el mosaic fi (16,1%) i el puntejat fi (9,7%). En menys freqüència, ens vam

trobar les característiques pròpies de lesió d'alt grau com ara l'epiteli acetoblanc dens (2,6%), el mosaic gruixut (1,1%) i el puntejat gruixut (0,3%).

Del total de pacients amb lesió cervical incloses a l'estudi, 177 pacients (66%) van ser sotmeses a biòpsia cervical. La resta de pacients on la colposcòpia va ser normal es va citar les pacients per un control als 6 mesos com indica el protocol de l'estudi.

El 59,4% de les pacients incloses a l'estudi, van presentar una displàsia cervical confirmada per biòpsia. El diagnòstic va ser de CIN1 en el 56,8%, de CIN2 en el 2,6% i 7,1% una biòpsia negativa. No es va trobar, en el moment inicial de l'estudi cap cas de carcinoma invasor de cèrvix.

Taula 13: Resultats histologia en el moment d'inici de l'estudi

Resultat histologia	N pacients	%
Negativa	19	7,1
CIN I	151	56,8
CIN II	7	2,6

1.3.3. Detecció de VPH i dels marcadors del cicle cel·lular

1.3.3.1. Descripció dels resultats en funció de la detecció del VPH

Es va determinar la infecció per VPH mitjançant la captura d'híbrids en totes les mostres. A l'inici de l'estudi, un 28,1% tenien resultat negatiu per VPH-AR. En la nostra sèrie, el 67,2% tenien resultat positiu per VPH-AR. En 5 pacients no es va poder determinar la captura d'híbrids per problemes tècnics.

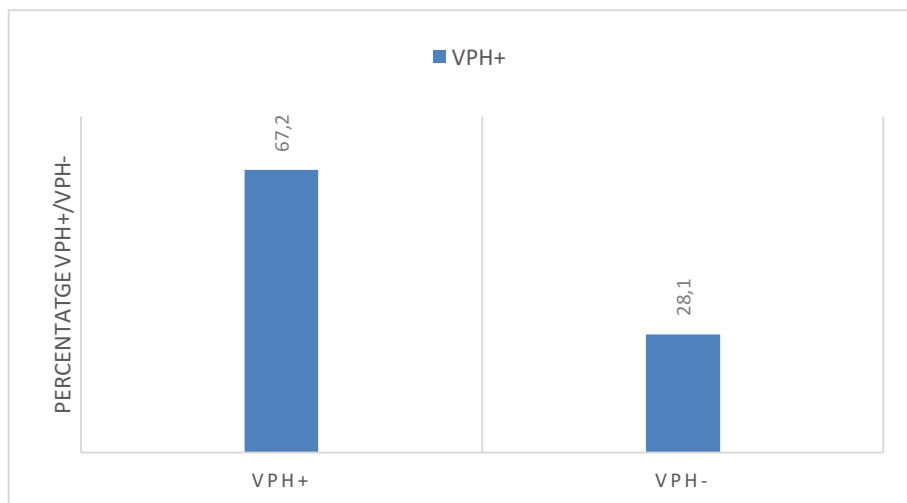


Figura 29: Detecció del VPH en la nostra mostra

Es va detectar una diferència estadísticament significativa ($p=0,000$) entre la detecció de VPH en les lesions LSIL (72,2%) que en les lesions ASCUS (48,2%).

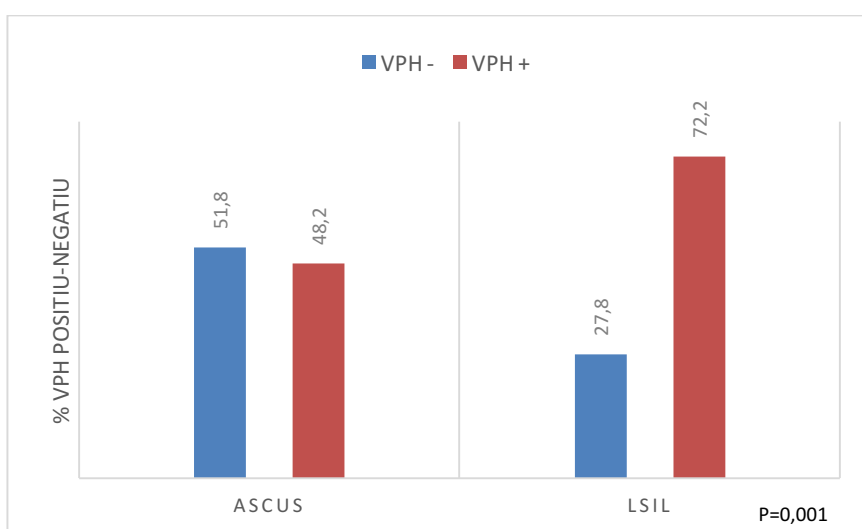


Figura 30: Prevalença de la infecció per VPH segons el resultat citològic

En el moment del diagnòstic en funció de l'edat de la pacient trobem major proporció de positivitat a VPH diferents. És a dir, en dones menors de 30 anys, la positivitat per VPH arribà fins al 85,7%, mentre que en dones majors de 30 anys, la positivitat s'obtingué en el 68% de les pacients ($p=0,001$).

1.3.3.2. Descripció dels resultats del genotipat de VPH

De les pacients estudiades, un 72,9% (194 pacients) van presentar algun dels genotips de VPH diagnosticats per la tècnica utilitzada PCR-microarray (CLART-HPV2, Genomica) En totes les pacients amb lesió citològica tot i tenir captura d'híbrids negativa es realitzà l'estudi del genotipat.

En quant a la prevalença de les infeccions per VPH segons la **classificació del risc oncogènic**, es va observar que la presència de genotips de baix risc en monoïnfecció eren poc freqüents en la majoria de lesions citològiques (7,1%) i generalment, quan aquests genotips es detectaven estaven associats a infeccions mixtes amb altres genotips d'alt grau (24,7%).

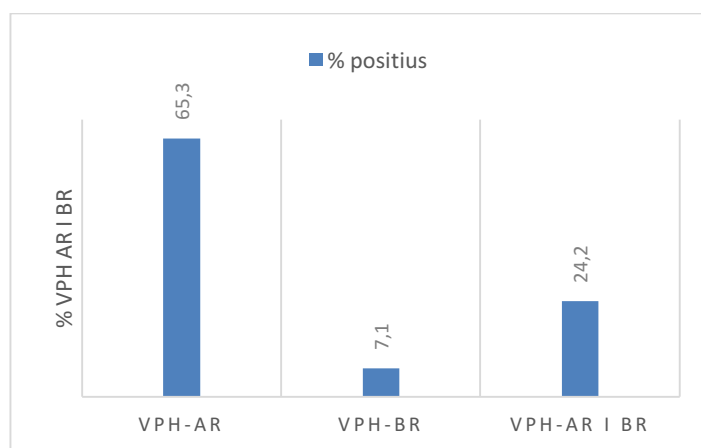


Figura 31: Distribució dels virus d'alt i baix risc

Es va estudiar les infeccions per VPH en funció de si ens trobàvem una **infecció simple per VPH o una infecció múltiple**. En el nostre estudi, la prevalença de la infecció múltiple va representar el 51,6% del total de les infeccions.

La distribució de resultats citològics va ser diferent si el VPH està en infecció simple o infecció múltiple. Dins els grup infecció múltiple, es va observar més presència de LSIL (Ji quadrat; $p=0,05$).

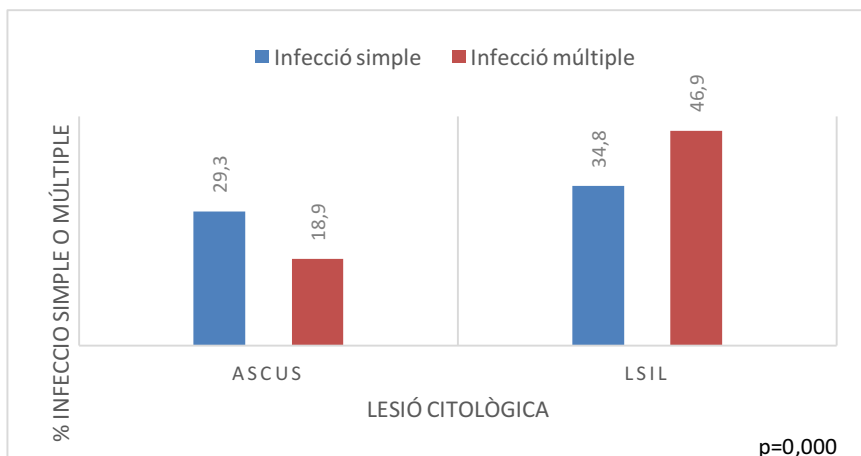


Figura 32: Freqüència d'infecció simple o múltiple en funció de la lesió citològica

En la nostra població, els **genotips de VPH** més freqüents van ser, per ordre de prevalença, el VPH 16 (20,7%), el VPH 31 (11,3%), el VPH 52 (9,8%), el VPH 51 (9%), el VPH 53 (8,6%), el VPH 66 (8,3%), el VPH 42 (6,8%), VPH 56 (5,6%) i el VPH 18 (4,9%). En la següent gràfica s'observen els 10 genotips més freqüents en el moment basal i en la taula 14 s'estudien tots els genotips trobats a la nostra mostra.

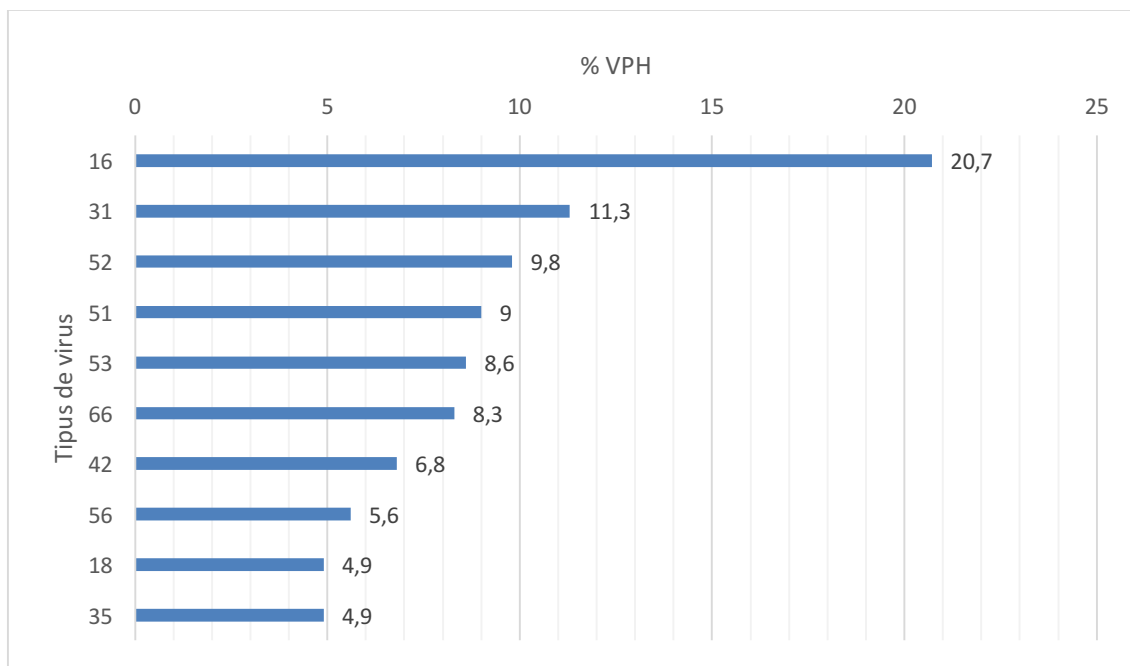


Figura 33: Distribució dels 10 genotips més freqüents en dones amb lesions de baix grau (LSIL, ASCUS) a la nostra mostra.

Taula 14: Distribució dels genotips de VPH humà segons la lesió citològica en la nostra mostra

Tipus de VPH	N total	ASCUS (N, %)	LSIL (N, %)	MOSTRES POSITIVES N (%)
Qualsevol VPH	194	7 (12,7)	48 (87,3%)	194 (100)
VPH-16		7 (12,7)	48 (87,3)	55 (20,7)
VPH-18		2 (15,4)	11 (84,6)	13 (4,9)
VPH-31		5 (16,6)	35 (83,3)	30 (11,3)
VPH-33		1 (9,1)	10 (90)	11 (4,1)
VPH-35		2 (15,4)	11 (84,6)	13 (4,9)
VPH-39		2 (22,2)	7 (77,8)	9 (3,4)
VPH-40		0	2 (100)	2 (0,8)
VPH-42		1 (5,6)	17 (94,4)	18 (6,8)
VPH-44		0	4 (100)	4 (1,5)
VPH-45		0	6 (100)	6 (2,3)
VPH-51		2 (8,3)	22 (91,7)	24 (9)
VPH-52		3 (11,5)	23 (88,5)	26 (9,8)
VPH-53		1 (4,3)	22 (95,7)	23 (8,6)
VPH-54		2 (33,3)	4 (66,7)	6 (2,3)
VPH-56		0	15 (100)	15 (5,6)
VPH-58		1 (5,6)	17 (94,4)	18 (6,8)
VPH-59		1 (11,1)	8 (88,9)	9 (3,4)
VPH-61		1 (71,1)	13 (92,9)	14 (5,3)
VPH-62		0	6 (100)	6 (2,3)
VPH-66		4 (18,2)	18 (81,8)	22 (8,3)
VPH-68		2 (20)	8 (80)	10 (3,8)
VPH-70		0	7 (100)	7 (2,6)
VPH-72		0	1 (100)	1 (0,4)
VPH-73		0	3 (100)	3 (1,1)
VPH-81		3 (25)	9 (75)	12 (4,5)
VPH-82		1 (11,1)	8 (88,9)	9 (3,4)
VPH-83		0	1 (100)	1 (0,4)
VPH-84		0	4 (100)	8 (3,0)
VPH-85		0	1 (100)	1 (0,4)
VPH-6		2 (18,2)	9 (81,8)	11 (4,1)

Quan es va analitzar la presència de determinats tipus de VPH en el moment basal i la presència de lesió cervical, es va trobar relació significativa en el cas del VPH tipus 16 i el VPH 56. En la nostra mostra, en el moment basal és més freqüent trobar infecció en el cas del VPH 16 i 56 (Ji quadrat; $p=0,000$).

En funció del genotip de virus específic, la distribució de la lesió citològica en el moment basal és diferent. Tant les pacients portadores de VPH 16 com de VPH 56 s'associaven majoritàriament amb LSIL de forma estadísticament significativa amb una $p=0,009$ i $p=0,000$ respectivament. Es va analitzar l'associació VPH 16 i VPH 18 en el

moment basal, i es va observar que si que existeix associació entre detecció i lesió cervical ($p=0,002$). Per tant, una pacient portadora del VPH 16/18 tindrà més freqüentment una lesió que no pas la no portadora.

1.3.3.3. Descripció dels resultats de la detecció p16/Ki-67

La detecció de p16/Ki-67 es va realitzar en 48 dones portadores del VPH 16/18. D'aquestes pacients, 18 van tenir resultat positiu i 30 pacients van tenir resultat negatiu.

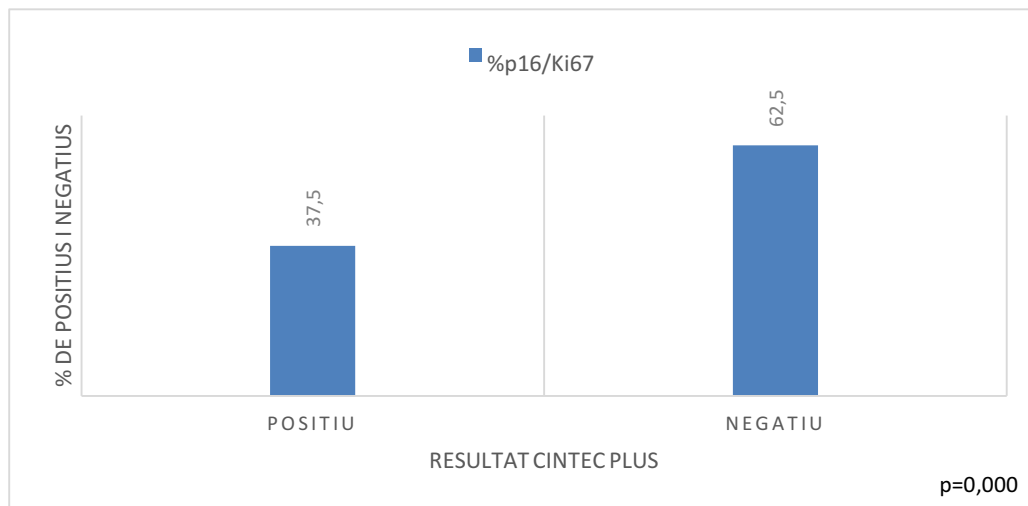


Figura 34: Resultats de la prova CINtec Plus

De les pacients amb mostres positives per tinció dual, el 22,2% tenien una lesió citològica ASCUS i el 76,6% tenien lesió de LSIL, amb diferències estadísticament significatives ($p=0,000$)

2. Evolució de les lesions cervicals

En el nostre estudi, el 58,9% de les lesions van regressar espontàniament en el transcurs dels següents 24 mesos posteriors al diagnòstic, 19,6% van persistir en el

seguiment i 22,2% evolucionaren a CIN2+. En el següent gràfic es pot observar quina és la història natural de les lesions cervicals de les nostres pacients per temps.

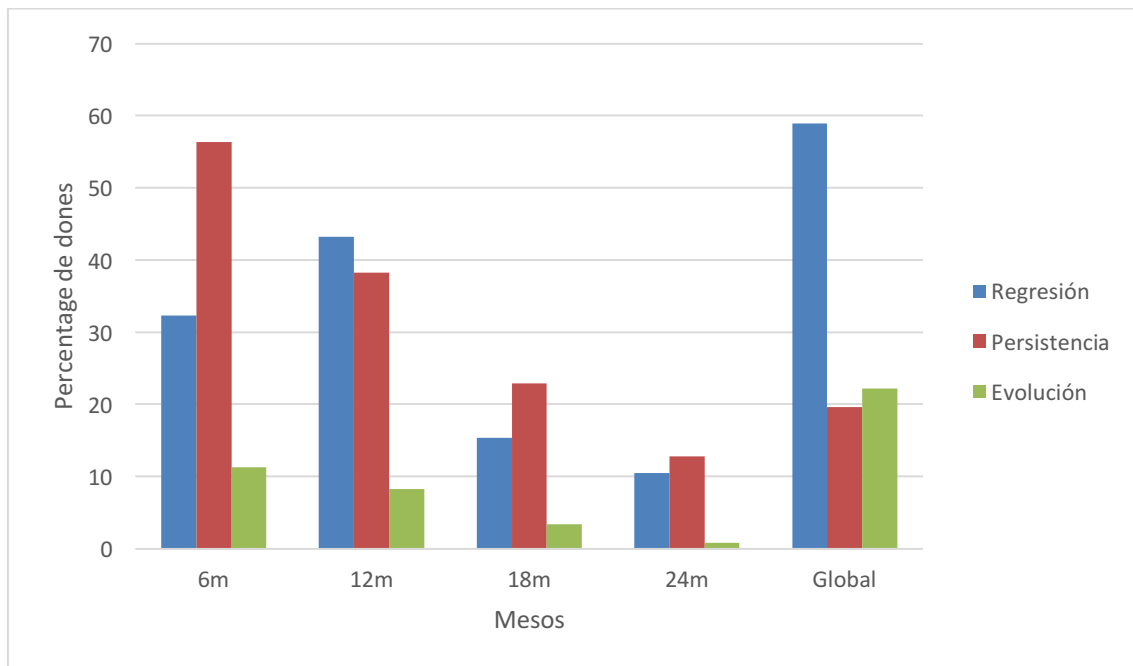


Figura 35: Evolució de les lesions cervicals en els diferents controls de l'estudi

Com es veu a la gràfica, a l'any del diagnòstic és quan s'observen més regressions de la displàsia cervical lleu (54% de les pacients).

3. Relació entre l'evolució de la lesió i els factors epidemiològics

3.1. Edat

Es van analitzar els resultats per grups d'edat, i amb el punt de tall de 30 anys. No es van obtenir diferències estadísticament significatives comparant els diferents grups d'edat ($p=0,400$). En dividir la cohort en el punt de tall dels 30 anys, l'associació tampoc van ser significativa.

Taula 15: Resultat del seguiment de LSIL per grups d'edat

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
<20a	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	4 (100%)
21-30	54 (62,1%)	17 (19,5%)	16 (18,4%)	87 (100%)
31-40	43 (56,6%)	10 (13,2%)	23 (30,3%)	76 (100%)
41-50	37 (58,7%)	13 (20,6%)	13 (20,6%)	63 (100%)
>50	21 (58,3%)	9 (25%)	6 (16,7%)	36 (100%)
Total	156 (58,6%)	51 (19,2%)	59 (22,2%)	266 (100%)

p= NS

Taula 16: Resultat del seguiment de les LSIL segons l'edat, amb el punt de tall als 30 anys

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
< de 30 anys	101 (57,7%)	32 (18,3%)	42 (24,0%)	175 (100%)
> de 30 anys	55 (60,4%)	19 (20,9%)	17 (18,7%)	91 (100%)
Total	156 (58,6%)	51 (19,2%)	59 (22,2%)	266 (100%)

p= NS

Es va agrupar *persistència i evolució* de tal manera que el que es va valorar és si hi havia curació o no. En aquest cas, tampoc es van obtenir resultats estadísticament significatius en cap dels dos supòsits. Tot i això, es va observar una tendència a la regressió major en dones menors de 30 anys.

Taula 17: Resultat del seguiment de les LSIL per edat agrupant per curació o no curació

	Curació	No curació	Total
<20 anys	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
21-30 anys	33 (37,9%)	54 (62,1%)	87 (100%)
31-40 anys	33 (42,4%)	43 (56,6%)	76 (100%)
41-50 anys	26 (41,3%)	37 (58,7%)	63 (100%)
>50 anys	15 (41,7%)	21 (58,3%)	36 (100%)
Total	110 (41,4%)	156 (58,6%)	266 (100%)

p= NS

Taula 18: Resultat del seguiment de les LSIL agrupant per curació o no curació, amb el punt de tall als 30 anys

	Curació	No curació	Total
< 30 anys	101 (57,7%)	74 (42,3%)	175 (100%)
>30 anys	36 (39,6%)	55 (60,4%)	91 (100%)
Total	110 (41,4%)	156 (58,6%)	266 (100%)

p=NS

3.2. Paritat

No es van observar diferències estadísticament significatives en les dones que no havien parit respecte les que si ho havien fet.

Taula 19: Resultat del seguiment de les LSIL agrupant per paritat

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
Nuliparitat	71 (53%)	31 (23,1%)	32 (23,9%)	134 (100%)
Multiparitat	84 (64,1%)	20 (15,3%)	27 (20,6%)	131 (100%)
Total	155 (58,5)	51 (19,25)	59 (22,3%)	265 (100%)

p=NS

Es va estudiar el grup de dones amb 3 o més fills o menys de 3 fills, i tampoc es van obtenir resultats estadísticament significatius.

Taula 20: Resultat del seguiment de les LSIL agrupant en funció del número de fills

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
0, 1, 2 fills	143 (58,3%)	47 (19,1%)	55 (22,4%)	245 (100%)
>3 fills	12 (60%)	4 (20%)	4 (20%)	20 (100%)
Total	155 (58,4%)	51 (19,2%)	59 (22,2%)	265 (100%)

p= NS

Agrupant les variables persistència i evolució per tal de valorar si augmentava la nostra potència estadística, tampoc es van observar resultats estadísticament significatius.

3.3. Menopausa

En dones menopàusiques no es van trobar diferències en comparar-les amb les no menopàusiques.

Taula 21: Resultat del seguiment de les LSIL en funció de l'estat menopàusic

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
Menopausa	20 (57,1%)	10 (28,6%)	5 (14,3%)	35 (100%)
No menopausa	136 (58,9%)	41 (17,7%)	54 (23,4%)	231 (100%)
Total	156 (58,6%)	51 (19,2%)	59 (22,2%)	266 (100%)

p=NS

Agrupant les variables persistència i evolució i creant de nou les variables curació i no curació, tampoc es van observar diferències estadísticament significatives.

3.4. Inici de relacions sexuals

Comparant el grup de dones que havien tingut relacions sexuals abans dels 17 anys, respecte les que van tenir-les més tard, no es van trobar diferències estadísticament significatives en quan a l'evolució de les lesions.

Taula 22: Resultat del seguiment de les LSIL en funció de l'inici de les relacions sexuals

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
Inici RS<16 anys	39 (65%)	16 (26,7%)	5 (8,3%)	60 (100%)
Inici RS>16 anys	112 (65,1%)	35 (20,3%)	25 (14,5%)	172 (100%)
Total	151 (65,1%)	51 (22%)	30 (12,9%)	232 (100%)

p = NS

Agrupant persistència i evolució tampoc obtenim resultats estadísticament significatius.

3.5. Número de parelles sexuals

Es van trobar diferències estadísticament significatives en quan al nombre de parelles sexuals durant tota la vida. Així, les dones amb **més de 5 parelles sexuals** tenien un risc major d'evolució a CIN2+ (p=0,04).

Taula 23: Resultat del seguiment de les LSIL en funció del número de parelles sexuals

		Regressió	Persistència	Evolució	Total
1-5	parelles	42 (44,7%)	26 (27,7%)	26 (27,7%)	94 (100%)
sexuals					
>5	parelles	110 (66,3%)	25 (15,1%)	31 (18,7%)	166 (100%)
sexual					
Total		152 (58,5%)	51 (19,6%)	57 (21,9%)	260 (100%)

p= 0,04

Es va analitzar l'OR del resultat ">5 parelles" i s'observà que una persona amb més de 5 parelles sexuals, tenia 2,72 (IC 95% 1,16-4,12) vegades més de risc d'evolució de la lesió cervical que les dones que havien tingut menys de 5 parelles.

Taula 24: Odds ratio del número de parelles sexuals

P. Sexuals	N total	Evolució N (%)	OR
1-5	166	31 (18,7%)	
>5	94	26 (27,7%)	2,72 (IC 95: 1,16-4,12)

Analitzant les **parelles sexuals durant el darrer any**, es va observar que a més parelles sexuals, més augmentava el risc (OR: 1,1 IC 95: 1,02-1,14).

3.6. Planificació familiar

No es van trobar diferències estadísticament significatives en quant a l'evolució de les lesions amb mètodes anticonceptius hormonal. Respecte l'ús de preservatiu, tampoc s'observà un major percentatge de regressions.

Taula 25: Evolució de les lesions i ús de preservatiu

Preservatiu	N total	N evolució	%	OR
Si	85	42	49,4	
No	181	68	37,6	1,6 (IC 95 0,96-2,73)

p= NS

Taula 26: Evolució de les lesions i ús d'anticoncepció hormonal

ACH	N total	N evolució	%	OR
Si	9	3	33,3	
No	177	79	42,9	0,664 (IC 0,16-2,74)

p= NS

3.7. Tabac

Es va analitzar l'evolució de les lesions en grup de pacients fumadores *versus* les no fumadores i es va observar una tendència a l'evolució en les pacients fumadores, però sense obtenir resultats estadísticament significatius ($p=0,06$).

Taula 27: Evolució de les lesions i consum de tabac

Fumadores	N total	N evolució	%	OR
No	133	24	18,0%	
Si	133	35	26,3%	1,64 (IC 0,91-2,98)

p=0,06

Estudiant l'evolució de les lesions en funció del número de cigarretes per dia, i amb el tall en 15, es van trobar diferències estadísticament significatives ($p=0,003$). El risc d'evolució va augmentar per cada cigarreta de més, respecte la curació.

Taula 28: Evolució de la lesió i consum de > 15 cigarretes al dia

>15 cig/dia	N total	No Evolució	%	OR
No	224	42	18,8%	
Si	42	17	40,5%	2,94 (IC 1,46-5,94)

p=0,003

4. Relació entre l'evolució de la lesió i els resultats al moment basal

4.1. Risc d'evolució a CIN2+ en funció del resultat citològic basal

S'ha determinat quin és el risc d'evolució a CIN2+ amb el diagnòstic de lesió de baix grau (ASCUS/LSIL) a l'inici de l'estudi, sense tenir en compte els resultats de detecció del VPH. En la nostra sèrie, de les 266 pacients diagnosticades de lesió cervical, un total de 204 van ser diagnosticades de LSIL i 62 d'ASCUS. L'evolució global de la nostra sèrie és del 22,2%; si ens fixem en el diagnòstic en el moment inicial, les LSIL evolucionen un 23,5% i les pacients ASCUS un 17,7% ($p=0,004$).

Taula 29: Resultat del seguiment de les LSIL, per l'estudi citològic basal

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
ASCUS	45 (69,2%)	6 (9,6%)	11 (17,7%)	62 (100%)
LSIL	111 (54,4%)	45 (22%)	48 (23,5%)	204 (100%)
Total	156 (57,5%)	51 (19,1%)	59 (22,1%)	266 (100%)

P=0,004

S'han observat diferències estadísticament significatives en l'evolució de les lesions depenent del resultat citològic inicial. Les pacients amb diagnòstic inicial de LSIL van presentar una persistència i evolució major que les pacients ASCUS.

Agrupant les categories *persistència* i *evolució* els resultats van ser els següents:

Taula 30: Resultat del seguiment de les LSIL agrupant per curació i no curació

	Curació	No curació	Total
ASCUS	45 (72,5%)	17 (27,4%)	62 (100%)
LSIL	111 (54,4%)	93 (45,5%)	204 (100%)
Total	156 (58,6%)	110 (41,3%)	266 (100%)

$p=0,008$

Per tant, lesió ASCUS va tenir més probabilitats de curació que no pas una pacient LSIL, on les lesions van persistir i evolucionar més ($p=0,008$).

Risc absolut i risc relatiu en funció del diagnòstic citològic inicial

Analitzats individualment, el risc a CIN2+ en funció dels resultats citològics inicials, s'observà que els risc de lesió CIN2+ va ser diferent:

Taula 31: Evolució de les lesions en funció del diagnòstic citològic inicial

	n	Evolució	Risc absolut (%)	Risc Relatiu
ASCUS	62	11	17,7	0,75 (IC 95 1,19-4,13)
LSIL	204	48	23,5	1,66 (IC 95 1,08-2,56)

p=0,00

La gràfica que veiem a continuació ens mostra el risc acumulat a 2 anys en funció del resultat citològic. Es va observar, amb resultat estadísticament significatiu, que les lesions inicials LSIL tenien un risc major de progressió a CIN2+ que les pacients ASCUS (p=0,000).

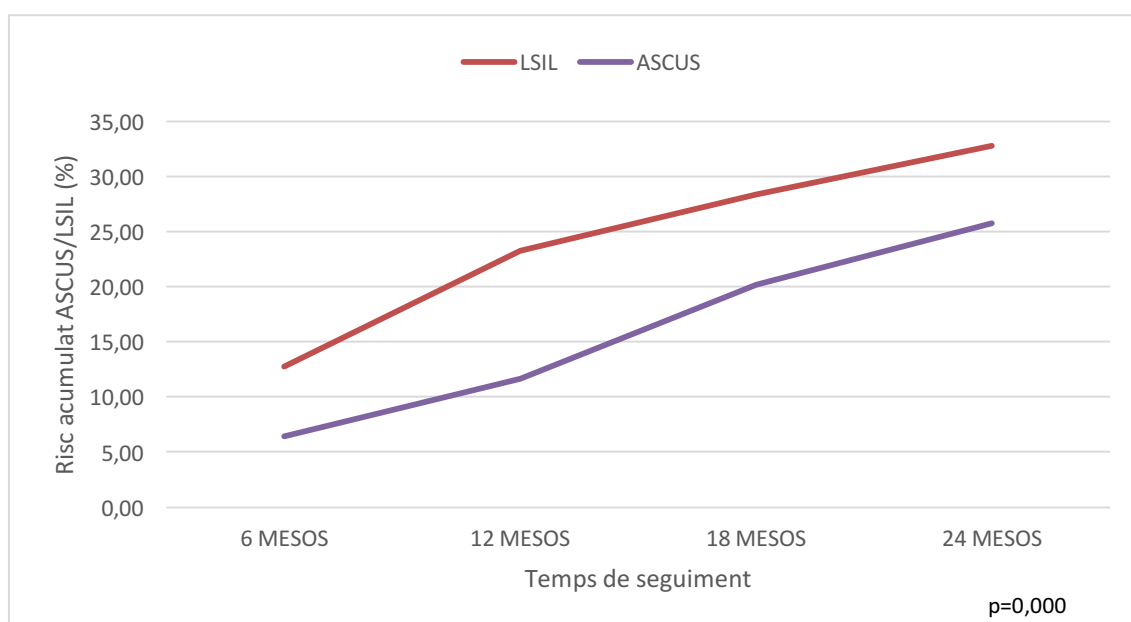


Figura 36: Risc acumulat de les lesions cervicals ASCUS i LSIL

4.2. Risc d'evolució a CIN2+ en funció dels resultats colposcòpics inicials

Es va classificar els canvis colposcòpics en el moment basal com a negatius, canvis menors i canvis majors. Es va analitzar si els resultats obtinguts en la colposcòpia inicial s'associaven amb l'evolució de la lesió. Es va observar una major evolució a CIN2+, en els casos on s'havien vist canvis majors a la colposcòpia a l'inici. I una major regressió quan la colposcòpia s'informava com a normal ($p=0,000$).

Taula 32: Resultat del seguiment de les LSIL en funció de l'estudi colposcòpic inicial

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
Negativa	64 (84,2%)	9 (11,8%)	3 (3,9%)	76 (100%)
Canvis menors	88 (51,2%)	36 (20,9%)	48 (27,9%)	172 (100%)
Canvis majors	2 (15,4%)	4 (30,8%)	7 (53,8%)	13 (100%)
No satisfactòria	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	5 (100 %)
Total	156 (58,6%)	51 (19,2%)	59 (22,2%)	266 (100%)

$p=0.000$

Agrupant els resultats en curació i no curació, els resultats obtinguts els trobem a la següent taula:

Taula 33: Evolució de la lesió, agrupant en curació o no curació en funció de la colposcòpia inicial

	Curació	No curació	Total
Negativa	64 (84,2%)	12 (15,8%)	76 (100%)
Canvis menors	88 (51,2%)	84 (48,8%)	172 (100%)
Canvis majors	2 (15,4%)	11 (84,6%)	13 (100%)
No satisfactòria	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)
	110 (41,4%)	156 (58,6%)	266 (100%)

$P=0.000$

Per tant, analitzant els canvis colposcòpics a l'inici de l'estudi observavem que les pacients amb colposcòpia negativa, evolucionaven menys i regressaven més ($p=0,000$). Les pacients amb canvis colposcòpics majors evolucionaven més a CIN2+ en el transcurs dels següents dos anys al diagnòstic ($p=0,000$).

Risc absolut i risc relatiu en funció dels resultats colposcòpics inicials

Analitzats individualment, es va observar que els riscos de lesió CIN2+, tant absoluts com relatius eren diferents segons el resultat en el moment basal ($p=0,000$).

Taula 34: Risc absolut i risc relatiu en funció dels resultats de la colposcòpia en el moment basal

	n	Evolució	Risc absolut (%)	Risc Relatiu
Negativa	76	3	3,9	0,04 (IC 0,03-1,3)
Canvis menors	172	48	27,9	9,41 (IC 2,83-31,33)
Canvis majors	13	6	46,2	28,39 (IC 5,8-139)

$p=0,000$

Així doncs, en la nostra mostra, les pacients a qui en el moment inicial es van observar canvis colposcòpics majors van tenir un risc 28 vegades major d'evolució a CIN2+ ($p=0,000$), i les pacients que tenien una colposcòpia negativa van regressar més les lesions, amb un RR de 0,04 sense tenir significació estadística.

5. Relació entre evolució de la lesió i detecció del VPH-AR

5.1. Risc d'evolució a CIN2+ en funció de la detecció del VPH

A totes les pacients incloses en l'estudi es va realitzar una detecció de VPH per HC2 i el resultat que es va obtenir va ser positiu o negatiu. Es va determinar la captura d'híbrids en el moment basal i anualment fins la finalització de l'estudi o bé fins la sortida de l'estudi de la pacient.

Es va estudiar la distribució de VPH positiu/negatiu en funció de regressió, persistència i evolució. Els resultats obtinguts els trobem a la següent taula:

Taula 35: Resultat del seguiment de les LSIL en funció de l'estat VPH positiu o negatiu

	Curació	Persistència	Evolució	Total
VPH+	90 (45,7%)	50 (25,4%)	57 (28,9%)	197 (100%)
VPH-	66 (95,7%)	1 (1,4%)	2 (2,9%)	69 (100%)
Total	156 (58,6%)	51 (19,2%)	59 (22,2%)	266 (100%)

P=0,000

Agrupant els resultats *persistència i evolució* i creant la variable “no curació”, els resultats obtinguts van ser els següents:

Taula 36: Evolució de la lesió, agrupant persistència i evolució, en funció de l'estat del VPH positiu o negatiu

	Curació	No curació	Total
VPH positiu	90 (45,6%)	107 (54,3%)	197 (100%)
VPH negatiu	66 (95,7%)	3 (4,3%)	69 (100%)
Total	210 (78,9%)	56 (21,1%)	266 (100%)

P=0,000

En la nostra sèrie es va trobar associació entre el VPH i l'evolució de la lesió ($p=0,000$). Quan el VPH va ser negatiu, el 95,7% de les lesions van regressar espontàniament ($p=0,000$). Dels 3 casos VPH-negatiu que no van curar espontàniament, hi va haver un cas de persistència amb VPH negatiu i dos casos amb evolució a CIN2; una evolució a CIN III i l'altra evolució a ADK infiltrant.

Risc absolut

Descrivim el risc absolut (RA) de CIN2+ per VPH positiu i VPH negatiu. Destaquem que en la nostra mostra, les pacients VPH positiu van demostrar un risc absolut de CIN2+ de 28,9%.

Taula 37: Risc absolut d'evolució a CIN2+ en VPH positiu i negatiu

	N	Normal/CIN1	CIN2+	Risc absolut
Positiu	197	130	57	28,9% (IC 95% 22,7-35,80)
Negatiu	69	67	2	2% (IC 95% 0,35-10,85%)

P=0,000

La no presència de VPH en una pacient amb LSIL o ASCUS va tenir una probabilitat del 2% de lesió de CIN2+ a 2 anys. Això vol dir que 1 de cada 50 dones en el nostre estudi, amb VPH negatiu i LSIL o ASCUS tenien probabilitat del desenvolupament d'una lesió d'alt grau.

Risc relatiu

Es va calcular el risc relatiu d'evolució per la presència o no de VPH. Les pacients VPH + van presentar un RR 9,98 vegades major d'evolució a CIN2+ que no pas les pacients VPH negatius. D'altra banda, el fet de tenir un VPH negatiu, en els nostres resultats té un efecte protector en l'evolució a CIN2+ (RR=0,73)

Taula 38: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en pacients VPH+

		Valor	Interval de confiança al 95%	
			Inferior	Superior
Odds Ratio per VPH		13,63	3,23	57,55
BASAL				
(Positiu/Negatiu)				
Per la cohort	EVOLUCIÓ FINAL=	9,98	2,50	39,80
Evolució				
Per la cohort	EVOLUCIÓ FINAL=	0,73	0,64	0,81
Regressió				
N de casos vàlids		266		

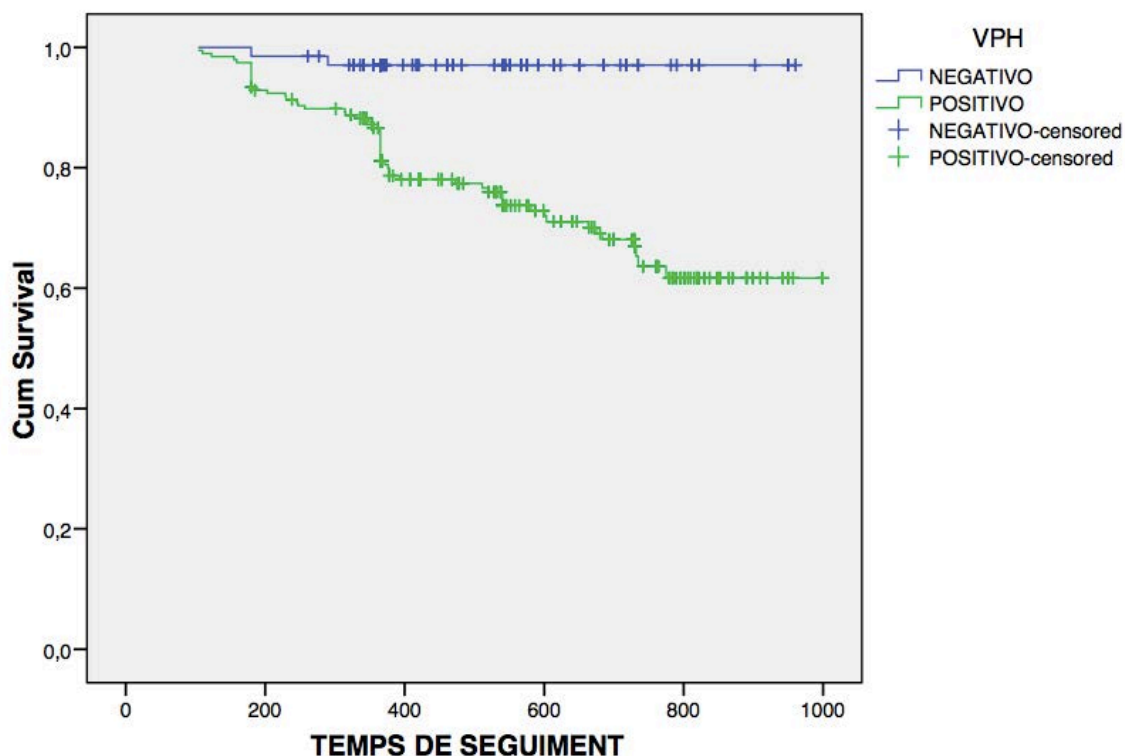


Figura 37: Corba de supervivència en funció de la detecció del VPH

En la corba de supervivència anterior el que es va analitzar el temps recorregut des del moment basal (VPH positiu o negatiu) fins al moment que va tenir lloc la detecció de CIN2+. Es va observar que el temps lliure de malaltia era menor en el cas del VPH positiu (Test Mankel-Cox: 13,73; $p=0,000$).

Estratificant entre dones menors i majors de 30 anys, es van observar resultats diferents. Les dones menors de 30 anys tenien un risc molt menor d'evolució a CIN2+, amb un RR de 2,66, mentre que les dones majors de 30 anys, el fet de tenir VPH + tenen 19 vegades més de risc d'evolució a CIN2+.

Taula 39: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en funció de la detecció del VPH

Edat	N	Evolució CIN2+	Risc relatiu	IC 95%
<30a	91	17	2,66	0,386-18,42
>30a	175	41	19,29	2,72-136,71

En la següent gràfica es presenten els riscos acumulats d'ASCUS i LSIL en funció de la presència o no del VPH:

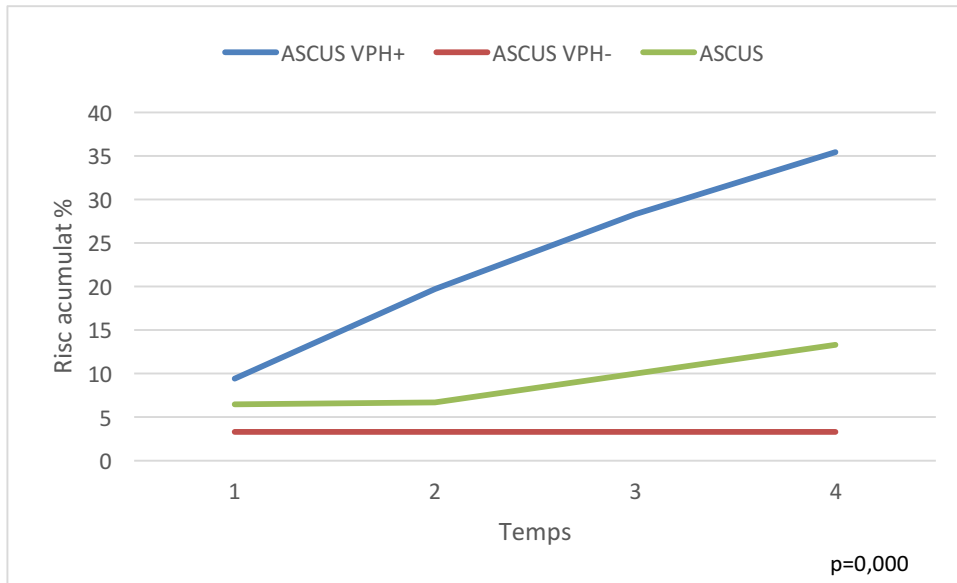


Figura 38: Risc acumulat de CIN2+ en pacients ASCUS VPH positiu/negatiu

En la gràfica anterior s’observa el risc acumulat en el seguiment a 2 anys de les pacients ASCUS, ASCUS VPH positives i ASCUS VPH negatives. Les pacients ASCUS VPH+ tenien un risc major de progressió a CIN2+, amb resultats estadísticament significatius, mentre que les pacients amb ASCUS VPH- tenein una probabilitat de progressió pràcticament 0 (p=0,000).

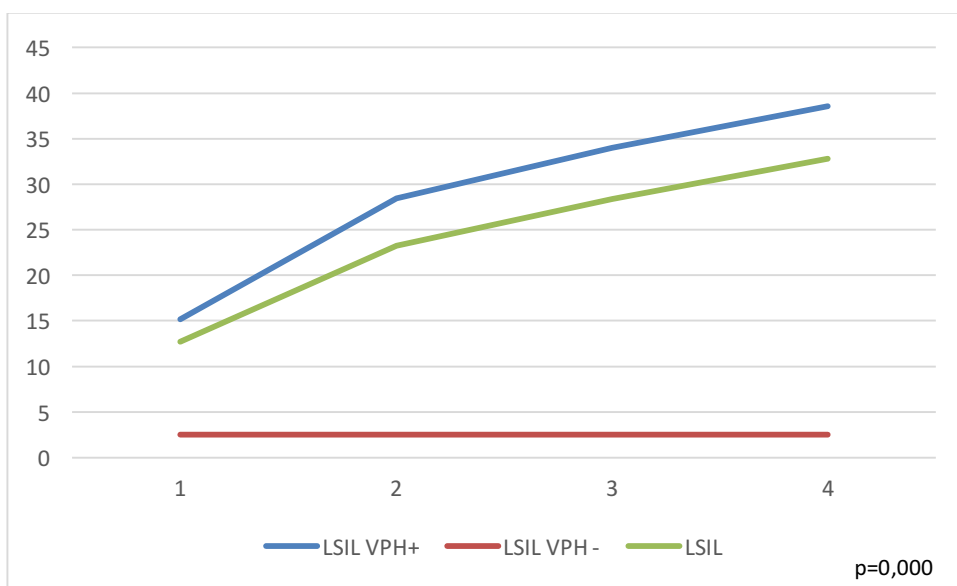


Figura 39: Risc acumulat de CIN2+ en pacients LSIL VPH positiu/negatiu

En la gràfica anterior s'observa el risc acumulat de progressió a CIN2+ en les pacients LSIL, en funció al estat portador VPH positiu o negatiu. Es va observar que les pacients amb VPH negatiu tenien un risc molt baix d'evolució, mentre que les pacients VPH positives el risc de progressió augmentava ($p=0,000$).

5.2.Sensibilitat, especificitat, VPP, VPN

A partir dels nostres resultats es va calcular el valor de la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN pel que fa a la determinació del VPH en detectar lesió:

	Sensibilitat	Especificitat	VPP	VPN
Global	93,5%	34,3%	30,2%	94,5%
LSIL	97,9%	29,1%	28,9%	97,6%
ASCUS	90%	63%	97,6%	96,6%

La sensibilitat de la prova VPH va ser alta amb una baixa especificitat. El VPP de la prova va ser baix, mentre que el VPN és alt. Una dona amb VPH negatiu té una probabilitat molt baixa d'evolució a CIN2+ (VPN 94,5%)

Analitzant la sensibilitat i l'especificitat estratificant pel resultat citològic inicial els resultats es van modificar. Així, en el cas de les LSIL, l'especificitat va ser del 29,1%, probablement degut al caràcter transitori de les lesions. En canvi, en els ASCUS, l'especificitat de la prova va ser de 63%, degut a que l'absència de VPH li conferia un risc similar al de citologia negativa.

6. Relació entre l'evolució de la lesió i el genotipat específic

6.1.Risc d'evolució a CIN2+ en funció del genotipatge del VPH

Es va realitzar la determinació del tipus VPH específic en el moment basal i anualment fins la finalització de l'estudi o quan la pacient va sortir del mateix per curació o per evolució. Es va

estudiar la distribució dels diferents genotips i del VPH negatiu en relació amb el resultat final de la lesió. La següent taula ens mostra la distribució dels diferents VPH:

Taula 40: Distribució dels diferents genotips de VPH en funció del resultat final

Tipus VPH	Curació	Persistència	Evolució	Total	p-value
VPH-16	18 (32,7%)	13 (23,6%)	24 (43,6%)	55 (100%)	0.000*
VPH-18	2 (15,4%)	5 (38,5%)	6 (46,3%)	13 (100%)	0.005*
VPH-31	9 (30%)	42 (17,8%)	12 (40%)	30 (100%)	0.003*
VPH-33	5 (54,5%)	48 (18,8%)	2 (18,2%)	11 (100%)	0.776
VPH-35	5 (38,5%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)	13 (100%)	0.165
VPH-39	5 (55,6%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	9 (100%)	0.471
VPH-40	0 (0)	1 (50%)	1 (50%)	1 (100%)	0.236
VPH-42	6 (33,3%)	9 (50%)	3 (16,7%)	18 (100%)	0.003*
VPH-44	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	4 (100%)	0.245
VPH-45	2 (33,3%)	1 (16,7%)	3 (50%)	6 (100%)	0.243
VPH-51	11 (45,8%)	8 (33,3%)	5 (20,8%)	24 (100%)	0.172
VPH-52	12 (46,2%)	9 (34,6%)	5 (19,2%)	16 (100%)	0.107
VPH-53	8 (34,8%)	10 (43,5%)	5 (21,7%)	23 (100%)	0.006*
VPH 54	2 (33,3%)	1 (16,7%)	3 (50%)	6 (100%)	0,243
VPH-56	6 (40%)	6 (40%)	3 (20%)	15 (100%)	0.102
VPH-58	6 (33,3%)	9 (50%)	3 (16,7%)	18 (100%)	0.003*
VPH-59	5 (55,6%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	9 (100%)	0.471
VPH-61	7(50%)	4 (28,6%)	3 (21,4%)	14 (100%)	0.646
VPH 62	3 (50%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)	0,801
VPH-66	13 (59,1%)	5 (22,7%)	4 (18,2%)	22 (100%)	0.847
VPH-68	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)	10 (100%)	0.674
VPH-70	4 (57,1%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	7 (100%)	0.765
VPH-72	0 (0)	1 (100%)	0	1 (100%)	0.121
VPH-73	1 (33,3%)	0 (0)	2 (66,7%)	3 (100%)	0.164
VPH-81	4 (33,3%)	6 (50%)	2 (16,7%)	12 (100%)	0.021*
VPH-82	5 (55,6%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	9 (100%)	0.471
VPH 83	0 (0)	1 (100%)	0 (0)	1 (100%)	0,121
VPH-84	2 (25%)	3 (37,5%)	3 (37,5%)	8 (100%)	0.142
VPH-85	1 (100%)	0 (0)	0 (0)	1 (100%)	0.702
VPH-6	10 (90,9%)	1 (9,1%)	0 (0)	11 (100%)	0,075
VPH neg	66 (95,7%)	1 (1,4%)	2 (2,9%)	69 (100%)	0,000*

S'observa que el VPH 16, 18, 31 i 58 van obtenir associació amb la lesió cervical, és a dir, les pacients portadores d'aquests virus tenien més probabilitats desenvolupar una lesió CIN2+ en el transcurs dels següents dos anys.

D'altra banda, en els VPH de baix risc VPH 42, 53 i 81 també vam trobar diferències estadísticament significatives. En aquests casos, els resultats no són valorables ja que els VPH els trobaven en coinfecció associats amb VPH-AR, on l'evolució podria ser

atribuïble als tipus d'alt risc oncogènic. Analitzant els VPH-BR en infecció simple, no hi havia cap cas en la nostra sèrie que hagi evolucionat a CIN2+ ($p=0,00$).

En el grup VPH negatiu les pacients regressaven més i no evolucionaven a CIN2+, obtenint diferències estadísticament significatives. Només es van trobar 2 casos (2,8%) que van evolucionar a CIN2+ amb determinació viral negativa, un evolucionà a CIN III i un altre evolucionà a ADK infiltrant.

Analitzant els 59 casos que van evolucionar a CIN2+, els VPH més freqüentment implicats van ser el tipus 16, el 31, 18, 33, 51, 66, i el 52. En les següents gràfiques observem el risc de progressió a CIN2+ acumulada en funció del tipus de Virus i agrupat per diferents tipus de VPH.

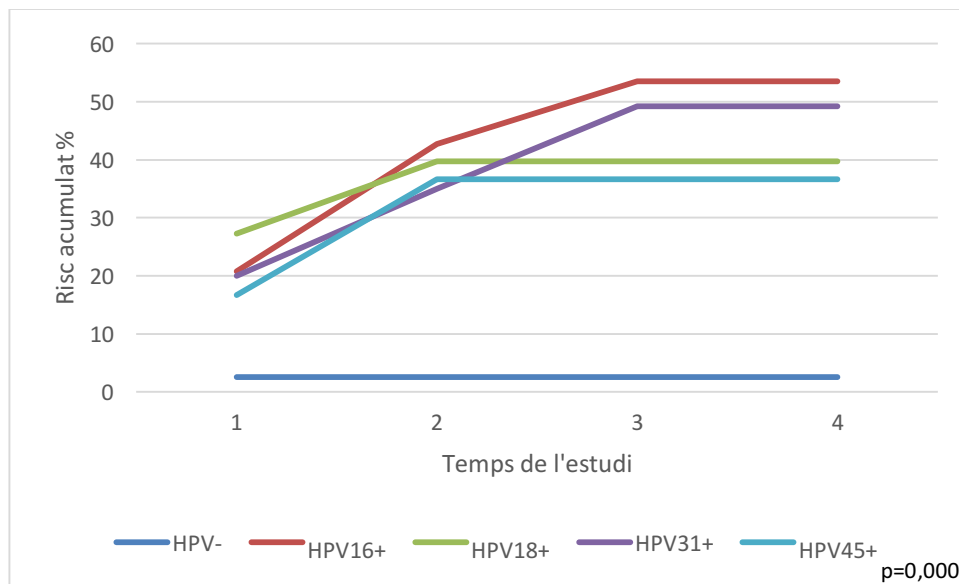


Figura 40: Risc acumulat de CIN2+ en funció del tipus de VPH més prevalents en evolució

En la gràfica anterior s'observa el risc acumulat a CIN2+ en funció del tipus de VPH. Es destaca el risc d'evolució a CIN2+ del VPH 16, 31, 18 i 45. La majoria de lesions progressaven en el transcurs del primer any del diagnòstic, a excepció del VPH 16 que va mantenir una evolució constant en tots els temps.

Risc absolut

Es va estudiar els riscos pels diferents genotips obtinguts mitjançant la tècnica CLART-HPV. El primer anàlisi calculat va ser el risc de progressió de la lesió, pel diagnòstic CIN2, CIN3 o carcinoma invasor, englobats com CIN2+ en funció de la presència d'un determinat genotip viral.

El risc absolut per cada tipus de VPH segons els resultats obtinguts en la nostra sèrie es descriu a la taula. Només es van trobar resultats estadísticament significatius en els VPH 16, 18 i 31. Dit d'una altra manera, la progressió a CIN2+ en aquests tres virus va ser superior que en altres virus en la nostra sèrie.

Sense tenir en comptes altres factors, la probabilitat de CIN2+ en funció dels virus determinats.

Taula 41: Risc absolut de progressió en funció del tipus de VPH

Tipus VPH	N	CIN2+	No progressió	Risc absolut	IC 95%
VPH-16	55	24	31	43,6%	30,30-57,67
VPH-18	13	6	7	46,1%	19,22-74,86
VPH-31	30	12	18	40%	22,65-59,39
VPH-33	11	2	9	18,1%	2,81-51,77
VPH-35	13	3	10	23%	5,4-53,81
VPH-39	9	1	8	11,1%	0,28-48,23
VPH-45	6	3	3	50%	11,8-88,18
VPH-51	24	5	19	20,8%	7,13-42,15
VPH-52	26	5	21	19,2%	6,55-39,35
VPH-56	15	3	12	20%	8,12-67,1
VPH-58	18	3	15	16,7%	3,57-41,41
VPH-59	9	1	8	11,1%	0,29-48,24
VPH-66	22	4	18	18,18%	3,41-45,64
VPH-68	10	2	8	20%	2,52-55,60
VPH neg	69	2	67	2,8%	0,28-48,25

Risc relatiu

Es va calcular també els riscos relatius per la presència de cada genotip en referència a no tenir-lo. A continuació s'analitzen els VPH on s'han trobat diferències estadísticament significatives.

Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en dones amb LSIL/ASCUS VPH 16+

El risc relatiu de tenir una evolució a CIN2+ en el cas de tenir un VPH 16 positiu va ser 2,63 (IC 95% 1,78-4,02). Aquest resultat implica que la presència de VPH tipus 16 en comptes d'un altre genotip suposava més del doble de risc d'evolució a CIN2+, diferència estadísticament significativa.

Taula 42: Evolució de les pacients VPH 16+ i VPH 16 -

	Evolució		Total
	No evolució	CIN2+	
VPH 16+	31	24	55
VPH 16-	176	35	211
	194	59	266

Taula 43: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en VPH 16+

	Valor	Interval de confiança al 95%	
		Inferior	Superior
Odds Ratio per VPH 16	3,89	2,04	7,4
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Evolució	2,63	1,78	4,02
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Regressió	0,67	0,53	0,85
N de casos vàlids	266		

De la taula també conclou, que no tenir el VPH 16 va ser un factor protector de evolució a CIN2+, amb una diferència estadísticament significativa (RR=0,67 IC 95% 0,53-0,85).

Analitzant el risc relatiu d'evolució a CIN2 amb VPH 16, però estratifiquem per edat obtenim següents resultats:

Taula 44: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ pel VPH 16 en funció de l'edat

Edat	N	Evolució CIN2+	Risc relatiu	IC 95%
<30a	25	8	2,34	1,01-5,41
>30a	30	16	2,98	1,83-4,82

Les dones portadores del VPH menors de 30 anys tenen menys risc d'evolució a CIN2+ que les dones majors de 30 anys (P=0,000).

Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en dones amb LSIL/ASCUS VPH 18+

El risc relatiu de tenir una evolució a CIN2+ en el cas de tenir un VPH 18 positiu va ser de 2,21 (IC 95% 1,16-4,15). És a dir, ser portadora de VPH 18 va tenir un risc dues vegades major d'evolucionar.

Taula 45: Evolució de les lesions VPH 18 positives i negatives

	Evolució		Total
	No evolució	CIN2+	
VPH 18+	7	6	13
VPH 18-	200	53	211
	207	59	266

Taula 46: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en pacients portadores VPH 18

	Valor	Interval de confiança al 95%	
		Inferior	Superior
Odds Ratio per VPH 18	3,23	1,04	10,03
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Evolució	2,21	1,49	4,15
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Regressió	0,68	0,41	1,31
N de casos vàlids	266		

Analitzant el risc relatiu d'evolució a CIN2 amb VPH 18, però estratificant per edat es van obtenir els següents resultats:

Taula 47: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ pel VPH 18 en funció de l'edat

Edat	N	Evolució CIN2+	Risc relatiu	IC 95%
<30a	3	0	-	NS
>30a	10	6	2,75	1,53-4,92

D'entre les dones menors de 30 anys no es va trobar cap cas que evolucionés a CIN2+, i això no va permetre calcular el risc. En dones majors de 30 anys, el risc de tenir una lesió CIN2+ en VPH 18+ va ser tres vegades superior a no tenir la infecció.

Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en dones amb LSIL/ASCUS VPH 31+

El risc de tenir una evolució a CIN2+ amb VPH 31 positiu va ser de 2. És a dir, el fet que la lesió fos provocada pel VPH 31 tenia un risc dues vegades major que un altre virus, obtenint una diferència estadísticament significativa.

Taula 48: Evolució CIN2+ en pacients VPH 31 positives i negatives

	Evolució		Total
	No evolució	CIN2+	
VPH 31+	18	12	30
VPH 31-	189	47	236
	207	59	266

Taula 49: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en pacients VPH 31 positives

	Valor	Interval de confiança al 95%	
		Inferior	Superior
Odds Ratio per VPH 31	2,68	1,20	5,95
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Evolució	2,01	1,21	3,33
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Regressió	0,74	0,55	1,01
N de casos vàlids	266		

Analitzant el risc relatiu d'evolució a CIN2 amb VPH 31, però estratifiquem per edat s'obtenen següents resultats:

Taula 50: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ pel VPH 31 en funció de l'edat

Edat	N	Evolució CIN2+	Risc relatiu	IC 95%
<30a	13	4	1,84	0,71-4,80
>30a	17	8	2,18	1,21-3,92

En el subgrup menor de 30 anys no observem diferències estadísticament significatives, però en les dones majors de 30 anys, el risc relatiu és de 2,18 (p=0,029).

Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en dones amb LSIL/ASCUS VPH 45+

El risc de tenir una evolució a CIN2+ en el cas de tenir un VPH 45 positiu va ser de 2,32. És a dir, el fet que la lesió fos provocada pel VPH 45 va tenir un risc dues vegades major per la presència de VPH 45 que si estigués originada per altres genotips, obtenint una diferència estadísticament significativa.

Taula 51: Evolució a CIN2+ en pacients VPH 45 positives i negatives

	Evolució		Total
	No evolució	CIN2+	
VPH 45+	3	3	6
VPH 45-	204	56	260
	207	59	266

Taula 52: Risc relatiu de les pacients VPH 45 positives

	Valor	Interval de confiança al 95%	
		Inferior	Superior
Odds Ratio per VPH 45	3,64	0,71	18,54
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Evolució	2,32	1,01	5,34
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Regressió	0,63	0,28	1,42
N de casos vàlids	266		

Quan es va analitzar el risc relatiu d'evolució a CIN2 amb VPH 45 amb el punt de tall als 30 anys no es van observar diferències estadísticament significatives, degut probablement a l'escàs número de casos en aquest subgrup.

Taula 53: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ pel VPH 45 en funció de l'edat

Edat	N	Evolució CIN2+	Risc relatiu	IC 95%
<30a	2	1	2,78	0,64-11,90
>30a	4	2	2,13	0,77-5,90

A continuació, s'analitzen el RR dels altres VPH implicats en la nostra sèrie, on no s'han obtingut diferències estadísticament significatives:

Taula 54: Risc relatiu de tots els VPH aïllats en la nostra sèrie

RISC RELATIU		Interval de confiança 95%	
		Inferior	Superior
VPH 33	0,81	0,23	2,91
VPH 35	1,04	0,37	2,88
VPH 39	0,49	0,07	3,16
VPH 40	2,27	0,55	9,27
VPH 42	0,73	0,25	2,12
VPH 44	1,12	0,20	6,26
VPH 51	0,93	0,41	2,11
VPH 52	0,85	0,37	1,94
VPH 53	0,97	0,43	2,21
VPH 54	2,32	0,99	5,34
VPH 56	0,89	0,31	2,53
VPH 58	0,73	0,25	2,12
VPH 59	0,49	0,07	3,16
VPH 61	0,96	0,33	2,69
VPH 62	1,52	0,47	4,82
VPH 66	0,81	0,32	2,01
VPH 68	0,89	0,25	3,16
VPH 70	0,63	0,11	3,97
VPH 72	1,28	0,94	1,37
VPH 73	3,07	0,95	7,07
VPH 81	0,74	0,21	2,68
VPH 82	0,49	0,07	3,16
VPH 83	1,28	0,91	1,37
VPH 84	1,74	0,68	4,35
VPH 85	1,28	0,98	1,37

Estratificant els VPH de taula anterior per edat tampoc es van observar diferències estadísticament significatives entre les dones majors o menors de 30 anys.

Focalitzant el nostre interès en els VPH que van demostrar augment de risc a lesió a CIN2+, es va estudiar si la combinació de diferents genotips presentava un risc augmentat de lesió cervical.

Taula 55: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en les diferents combinacions de VPH

			Interval de confiança 95%	
			Inferior	Superior
VPH 16/18	+	2,99	2,43	8,44
	-	0,66	0,53	0,82
VPH 16/31	+	3,21	2,06	5,02
	-	0,65	0,53	0,80
VPH 18/31	+	2,35	1,50	3,69
	-	0,69	0,52	0,91
VPH 16/18/31	+	4,18	2,58	6,78
	-	0,62	0,51	0,75
VPH 16/18/31/33	+	3,78	2,33	6,15
	-	0,65	0,54	0,78
VPH 16/18/31/45	+	4,84	2,88	8,10
	-	0,60	0,50	0,73
VPH No 16-18	+	0,34	0,22	0,52
	-	1,51	1,21	1,81
VPH No16-18-31	+	0,24	0,24	0,38
	-	1,62	1,33	1,97

El VPH aïllat amb un major RR de progressió a CIN2+ va ser el VPH 16. Quan es va combinar amb el VPH 18, 31, 33 i 45, s'observà major risc d'evolució a CIN2+ ($p=0,000$). Amb totes les combinacions estudiades es van obtenir resultats estadísticament significatius, amb un increment del risc d'evolució.

S'observa a la taula, que el RR de VPH 16/18 és 2,99, és a dir, aquestes pacients tenien tres cops més de probabilitat de lesió CIN2+, amb resultat estadísticament significatiu. El resultat que va tenir un risc relatiu major d'evolució va ser la combinació VPH 16/18/31/45, amb un risc d'evolució 4,83 vegades major que no presentar-ne cap. La combinació VPH 16/18/31 va tenir un RR de 4,20 superior.

El fet de no ser portadora de VPH 16/18 va tenir un RR de 0,34, dit d'una altra manera, les pacients sense aquests virus tenien una progressió a CIN2+ 6 cops menor que les pacients portadores.

Analitzant els resultats posant el punt de tall als 30 anys es van obtenir els següents resultats:

Taula 56: Risc relatiu d'evolució a CIN2+ en funció de diferents combinacions de VPH, agafant el punt de tall als 30 anys

			Interval de confiança 95%	
			Inferior	Superior
VPH 16/18	<30	2,21	0,92	5,29
	>30	3,51	2,14	5,75
VPH 16/31	<30	3,07	1,25	7,55
	>30	3,49	2,11	5,79
VPH 18/31	<30	1,55	0,58	4,13
	>30	2,82	1,72	4,61
VPH 16/18/31	<30	3,50	1,34	9,10
	>30	4,73	2,72	8,22
VPH 16/18/31/33	<30	3,06	1,17	7,97
	>30	4,36	2,50	7,61
VPH 16/18/31/45	<30	4,33	1,53	12,27
	>30	5,31	2,94	9,57
VPH 16/18/31/33/58	<30	2,67	1,02	6,99
	>30	4,27	2,40	7,59
VPH No 16 No 18	<30	0,47	0,20	1,10
	>30	0,28	0,17	0,47
VPH No 16 No 18 No 31	<30	0,28	0,11	0,74
	>30	0,21	0,12	0,36

Analitzant la taula prèvia, l'anàlisi de combinacions de diferents tipus de VPH en funció de l'edat de les pacients, s'observà que el risc de desenvolupament de lesió CIN2+ va ser major en les dones majors de 30 anys, amb resultat estadísticament significatiu.

Destaquem que la combinació de VPH 16/18/31/45 va tenir un risc relatiu d'evolució a CIN2+ de 4,33 en dones menors de 30 anys, però en el grup de majors de 30 anys el risc relatiu augmentà fins a 5,31.

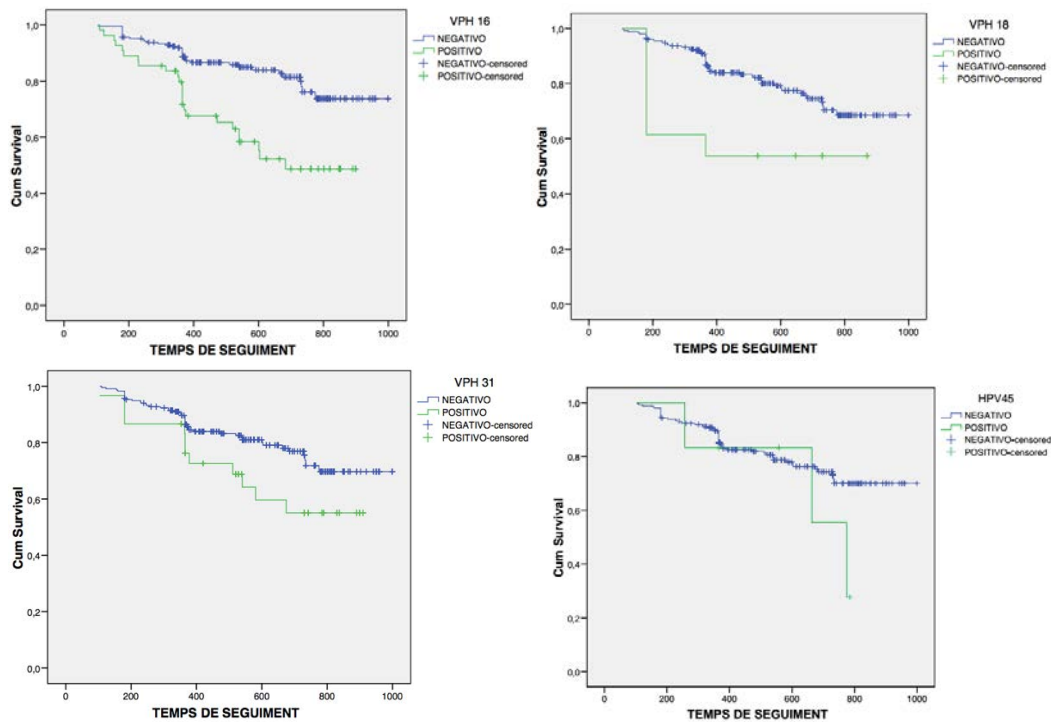


Figura 41: Corbes de supervivència analitzant el VPH 16, el VPH 18, el VPH 31 i VPH 45

En la corba de supervivència anterior el que es va analitzar el temps recorregut des del moment basal fins al moment que va tenir lloc la detecció de CIN2+. Es va observar que el temps lliure de malaltia era menor en el cas del VPH 16, seguit pel VPH 18 i el VPH 31. No es van trobar diferències estadísticament significatives en el cas del VPH 45, degut a la baixa prevalença en la nostra mostra (Test Mankel-Cox: 13,73; $p=0,000$).

Es va estudiar les corbes de supervivència agrupant els VPH més freqüentment implicats en l'evolució i és va observar que el temps lliure de malaltia era menor que amb VPH individuals. La combinació que va tenir un temps menor lliure de malaltia va ser el VPH 16/18/31.

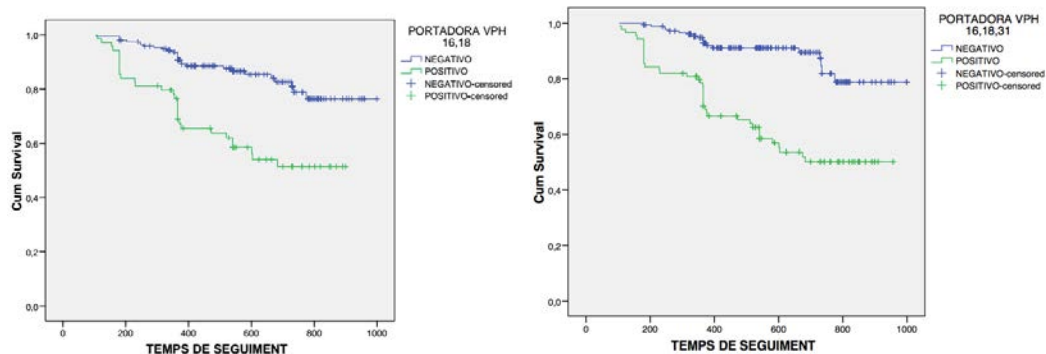


Figura 42: Corbes de supervivència analitzant l'associació VPH 16/18 i 16/18/31

Taula 57: Resultats del test de Mantel-Cox de comparació de las corbes de supervivència segons el genotip VPH

VPH	Chi-Square	p
VPH 16	17,04	0,000
VPH 18	5,02	0,02
VPH 31	3,82	0,05
VPH 45	1,49	0,221
VPH 16/18	22,2	0,000
VPH 16/18/31	33,45	0,000

6.2.Sensibilitat, especificitat, VPP, VPN

Es va analitzar els 14 genotips més freqüentment implicats en evolució a CIN2+ i es va calcular la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN en els següents casos:

Taula 58: Sensibilitat, especificitat, VPP i VPN per diferents tipus de VPH i combinacions

	Sensibilitat	Especificitat	VPP	VPN
VPH 16	40,6%	85%	43,6%	83,4%
VPH 18	10,1%	92,1%	46,1%	60,8%
VPH 31	19,1%	80,1%	70%	62,3%
VPH 16-18	43,1%	85,6%	68,1%	67,8%
VPH 16-31	57,6%	78,2%	43,1%	86,6%
VPH 18-31	28,9%	89,3%	43,5%	81,4%
VPH 16-18-31	67,7%	76,3%	45%	89,2%
VPH 16-18-31-33	71,1	73,4%	42,1%	88,9%
VPH AR (14 genotips)	96,6%	49,2%	35,2%	98,1%

De la taula anterior es destaquen les baixes sensibilitats de la detecció de VPH individuals, que van oscil·lar entre el 40% pel VPH 16 fins al 10% pel VPH 18. Contràriament, l'especificitat d'aquests VPH van ser elevades, amb un valor del 92,1% en el cas del VPH 18.

Com a dades a destacar, l'alt VPN de la detecció combinada del VPH 16/18/31, que implica que no detectant cap dels tres VPH, un 89,2% de les pacients no van desenvolupar malaltia.

La sensibilitat més alta, va ser la amb la detecció dels 14 genotips d'alt risc aïllats, del 96,6, una especificitat de 49,2% , un VPP 35,2% i un VPN de 98,1%.

No es va poder calcular la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN de la detecció de VPH-BR, ja que en la nostra sèrie cap dels virus de baix risc que vam trobar en monoinfecció va evolucionar a CIN2+ (p=0,000).

7. Relació entre l'evolució de la lesió i la detecció de p16/Ki-67

7.1. Risc d'evolució a CIN2+ en funció del resultat de la tinció dual

D'entre totes les pacients incloses a l'estudi, 48 portadores del VPH 16 i VPH 18 se'ls hi va realitzar la prova p16/Ki-67 mitjançant el kit CINTec Plus. La variable tinció dual es va definir com a positiva o negativa. Es va estudiar la distribució dels resultats de la tinció dual en relació amb el resultat final de la LSIL: regressió, persistència, evolució.

La següent taula mostra les diferents evolucions entre un resultat positiu i un resultat negatiu:

Taula 59: Evolució de la lesió cervical en funció del resultat de la tinció dual

	Regressió	Persistència	Evolució	Total
P16/Ki67 +	3 (16,7%)	0 (0%)	15 (83,3%)	18 (100%)
P16/Ki67 -	14 (46,7%)	10 (33,3%)	6 (20%)	30 (100%)
Total	17 (35,4%)	10 (20,8%)	21 (43,8%)	48 (100%)

P=0,000

De les pacients amb tinció dual positiva, el 83,3% van presentar evolució a lesió d'alt grau i per tant van requerir tractament quirúrgic. L'estudi histològic de la peça de conització confirmà displàsia cervical greu CIN3, en 10 d'aquestes pacients i 5 casos de CIN2. Tres de les pacients amb tinció dual positiva van eliminar el VPH i curen la lesió cervical (16,7%).

El un percentatge d'evolució a lesió d'alt grau va ser major en els casos de tinció dual positiva respecte la tinció dual negativa (p=0,000).

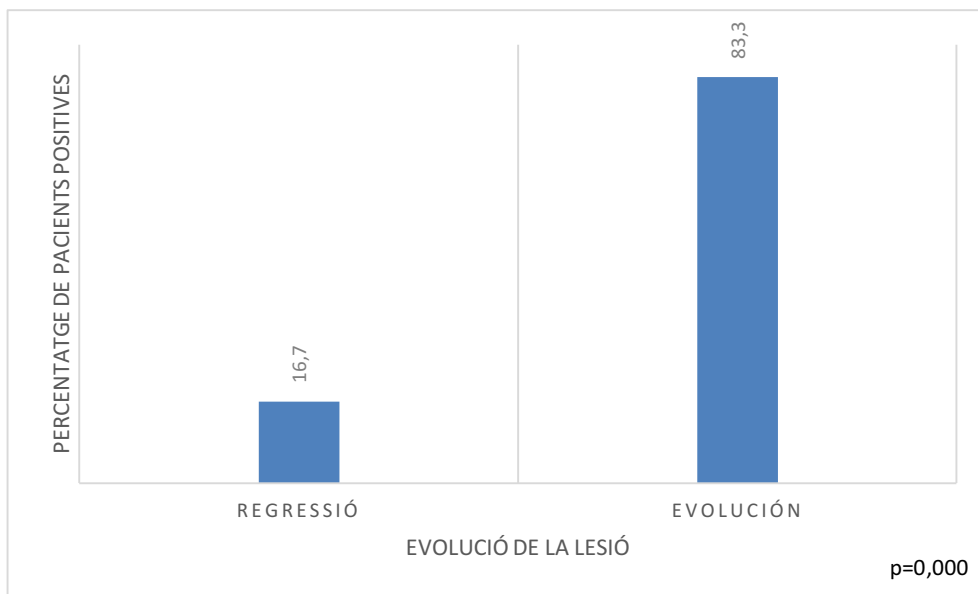


Figura 43: Taxes de regressió i evolució de les lesions en pacients amb tinció dual p16/Ki67 positives

Risc absolut:

El primer anàlisi calculat va ser el risc de progressió de la lesió, pel diagnòstic CIN2, CIN3 englobats com CIN2+ en funció de la positivitat de la prova. D'entre les pacients amb detecció p16/Ki-67 un 83,3% a lesió CIN2+.

Taula 60: Risc absolut d'evolució a CIN2+ amb la tècnica tinció dual

	N	CIN2+	No progressió	Risc absolut
P16/Ki67+	18	15	3	83,3% (IC 95% 58,58-96,42)
P16/Ki67-	30	6	24	20%

Risc relatiu:

El risc relatiu d'evolució a CIN2+ en el cas de tenir una tinció dual positiva va ser de 1,56. És a dir, el fet de trobar aquest resultat, la pacient tenia 1,5 vegades més de risc

d'evolució a CIN2+ que si la prova era negativa, obtenint diferències estadísticament significatives.

Taula 61: Evolució de la lesió en funció del resultat de la tinció dual

	Evolució		Total
	No evolució	CIN2+	
Tinció dual +	3	15	18
Tinció dual -	24	6	30
	27	21	48

Taula 62: Risc relatiu de progressió a CIN2+ en pacients amb tinció dual positiva

	Valor	Interval de confiança al 95%	
		Inferior	Superior
Odds Ratio per tinció dual positiva	4,37	1,04	18,31
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Evolució	1,56	1,05	2,31
Per la cohort EVOLUCIÓ FINAL= Regressió	0,35	0,12	1,07
N de casos vàlids	48		

Estratificant el risc en funció de l'edat de les pacients, es va observar que les pacients menors de 30 anys tenien un risc tres cops major de lesió CIN2+ que les majors de 30 (p=0,000).

Taula 63: Risc relatiu de progressió a CIN2+ en dones amb tinció dual positiva en funció de l'edat

	N	Evolució CIN2+	Risc relatiu	IC 95%
<30a	20	7	9,00	1,31-61,31
>30a	28	14	3,24	1,49-7,01

7.2. Sensibilitat, especificitat, VPP, VPN

Es va calcular la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN de la tinció dual en funció dels resultats obtinguts en la nostra sèrie i es van obtenir els següents resultats:

Sensibilitat	71,4%
Especificitat	88,8%
VPP	83,3%
VPN	80%

7. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

L'objectiu de la tesis va ser identificar les lesions LSIL/ASCUS amb major risc de progressió a CIN2+. En el nostre estudi el 22,2% de les lesions van evolucionar a CIN2+. Es va realitzar la detecció de la infecció i el genotipatge del VPH i en un subgrup de pacients es va determinar la positivitat per p16/Ki67. A continuació, revisem els nostres resultats i els comparem amb els estudis trobats a la literatura.

ANALISIS DESCRIPTIU DE LA POBLACIO ESTUDI

En el nostre estudi, la **positivitat de VPH-AR en les pacients amb lesió cervical de baix grau** mitjançant tècnica de captura d'híbrids va ser del 67,2%, seguint la línia del estudis presentats per Clifford *et al*, on parlen d'una prevalença de VPH-AR a Europa del 67,1% (75). Tena *et al* descriuen prevalences d'infecció per VPH-AR del 61,7 % (76) i la sèrie de Donà *et al* obtenen prevalences de VPH positiu del 70,1% (77). A l'estudi ALTS, la positivitat del VPH-AR va arribar fins al 85% (78), i aquesta dada es pot explicar perquè a l'estudi ALTS l'edat de les pacients era menor que la nostra. En dones menors de 30 anys, la nostra prevalença arriba fins al 85,7% , resultats comparables al metaanàlisi d'Arbyn on resultat global va ser de 76% de positivitat, i de més del 80% en el cas de dones joves (63). Confirmem en el nostres resultats l'alta prevalença del VPH en dones menors de 30 anys.

En la nostra sèrie, la prevalença de la infecció per VPH segons el **grau de lesió citològica** va ser del 48,2% en el cas dels ASCUS i del 72,2% en el cas de les lesions de baix grau. Castle *et al* obtenen resultats similars als al nostres, amb taxes de positivitat del 53, 1% en ASCUS i fins al 84,1% en citologies LSIL (79). Mazarico *et al* descriuen taxes de positivitat VPH en citologies ASCUS del 40% i en LSIL del 64% (80), resultats similars als obtinguts en la nostra sèrie.

Els **genotips VPH** més freqüentment aïllats en la nostra sèrie són per ordre de freqüència, el VPH 16, 31, 52, 53, 66, 42, 56, 18 i 35. Si comparem els resultats obtinguts per la revisió actualitzada per l'Institut Català d'Oncologia (ICO) de l'any 2017 observem que els nostres resultats no difereixen dels seus (16).

En pacients ASCUS, la prevalença del VPH 16 va ser del 11,3% i en les pacients LSIL del 23,5%. Aquests resultats estan en la línia de l'estudi de Castle *et al* on detecten el VPH 16 en el 14,9% dels ASCUS i en el 21,1% de les LSIL (81). D'altra banda, la sèrie de Clifford amb 5910 mostres citològiques amb lesió LSIL reporta prevalences de VPH 16 del 26%, seguit del 31 amb una prevalença del 12%. Els nostres resultats, en línia amb els de Clifford detecten una prevalença del VPH 31 en 15,19% de les mostres LSIL (20,74).

Observem que el VPH més prevalent, tant en monoinfecció com en infecció múltiple és el VPH 16, que és tres cops més prevalent que el VPH 18, resultats en la línia de Wheeler *et al* (82). Otero-Motta *et al* ens parla de prevalences de VPH 16 del 26,3%, seguit del VPH 33 i del VPH 58 (83). En la nostra sèrie, s'observa una baixa prevalença pel VPH 18 i 45, que va ser del 4,9% i 2,3% respectivament, dades molt similars a les aportades per Sanjose *et al* (8).

S'han realitzat diversos estudis per valorar la freqüència de la **infecció múltiple** per VPH, així com la seva possible implicació en la progressió de lesions precursors cervicals. Així, en el nostre treball la infecció múltiple (més d'un genotip) representa el 52% del total de les infeccions. De les dades revisades a la literatura, Pista *et al* obtenen taxes d'infecció múltiple del 32%, més freqüents en dones menors de 30 anys (84). Aquest estudi va detectar un augment significatiu de les infeccions múltiples amb el grau de severitat de la lesió citològica, suggerint que aquestes infeccions múltiples poden persistir més temps i per tant, presentar més risc de lesió d'alt grau. Aquests resultats estan en la línia dels nostres resultats, on observem una taxa d'infecció múltiple major a mesura que augmenta el grau de lesió en el moment basal ($p=0,000$). Bello *et al* obtenen resultats similars, amb una prevalença d'infecció múltiple del 44,2% i una correlació entre les infeccions múltiples i el risc de desenvolupar lesions precursors de càncer cervical (85). Els resultats de Delgado *et al* són més similars als

nostres, amb taxes de prevalença d'infecció múltiple del 58,1% (38). La infecció múltiple és més freqüent en dones menors de 30 anys, ja que aquestes pacients tenen una prevalença major de VPH i una major risc d'infecció.

Obtenim un 28,1% de resultat **negatiu per VPH-AR**, xifres molt superiors a les trobades a l'estudi de Donà on obtenen el 17,6%. Una possible explicació és que la nostra mostra l'edat mitja és major. De les pacients VPH negatiu, el 29,3% presenten positivitat per algun tipus de VPH que no pertany al kit CHII i és detectat per PCR. D'aquests casos, 6 de les pacients que presenten VPH negatiu si que s'haurien d'haver detectat per HCII, per tant serien els falsos negatius de la prova. La nostra taxa de FN és de 8%, dada similar als resultats de la literatura, on les xifres de FN oscil·len entre el 5 i 10% (86).

EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CERVICALS

Una classificació adequada de les lesions intraepitelials permet realitzar un maneig, seguiment i tractament correcte. Malgrat la freqüent exposició de les dones al VPH, la progressió a càncer cervical és infreqüent. Un percentatge significatiu de les lesions regressen espontàniament en el transcurs dels dos primers anys després del diagnòstic.

En el nostre estudi, el 58,9% de les lesions de baix grau regressen espontàniament en el transcurs dels següents 24 mesos, especialment durant el primer any on curen un 50% de les lesions. Un 19,6% de les lesions persisteixen en el transcurs del seguiment i un 22,2 % de les lesions de baix grau evolucionen a CIN2+. Els nostres resultats estan en la línia dels trobats per Loghavi *et al* amb 188 pacients, on un 16% desenvolupen lesió histològica CIN2+ (87). En la sèrie de Fujii el 18,5% de les pacients LSIL-ASCUS evolucionen a CIN2+ (88).

Si ens fixem en el resultat ASCUS en el moment basal el risc absolut de progressió a CIN2+ és el 17,7% de les nostres pacients, obtenint un resultat molt similar a l'obtingut

per Loghavi, del 15%. En la sèrie d'Evans un 11% va evolucionar a CIN2+ i en la sèrie de Fujii va ser del 17,6%.

En el cas del LSIL, el 23,5% de les nostres pacients van evolucionar a CIN2+, obtenint resultats molt similars a la sèrie de Loghavi d'un 22%. En la sèrie de Fujii va ser del 19,2%.

Taula 64: Comparació de l'evolució de les lesions cervicals en funció del resultat citològic inicial en diferents estudis

	ASCUS	LSIL	Global
Longhavi	11%	22%	16%
Fujii	17,6%	19,2%	18,5%
Cox	26,7%	27,6%	-
El nostre estudi	17,7%	23,5%	22,2%

Diversos estudis han analitzat l'evolució natural de les displàsies de cèrvix uterí, definint les taxes de regressió, persistència i evolució de la malaltia. Tot i que els estudis difereixen metodològicament entre ells, suggereixen una tendència de les lesions cervicals de baix grau a la regressió.

Taula 65: Comparació de l'evolució de les lesions cervicals de baix grau en diferents estudis

Estudi	N	Regressa	Persisteix	Progressa	Mètode
Ostor *	3529	57%	32%	11%	Citologia i biòpsia
Holowaty *	17000	75%	24%	1%	Citologia
Bansal	1001	64,5%	27,2%	8%	Citologia
Melnikow *	27929	47,39%	33%	20,81%	Citologia i biòpsia
El nostre estudi	266	66,7%	13,4%	23,4%	Citologia i biòpsia

* Metaanàlisis

Aquests estudis, revelen que la majoria de les lesions de baix grau són transitòries; que la majoria de casos aquestes lesions tornen a la normalitat en un període de temps normalment curt que està en línia amb els resultats obtinguts en la nostra sèrie.

Obtenim resultats similars en regressió als trobats a la revisió d'Ostör, que inclou 17 estudis realitzats entre l'any 1955 i 1990, reunint un total de 3529 dones diagnosticades de displàsia cervical lleu. Ostör descriu una regressió del 57%, una persistència del 32%, una progressió a CIN3 del 11% i una progressió a càncer invasor de l'1%. Aquestes dades presenten algunes limitacions metodològiques, el diagnòstic no sempre és per biòpsia, fet que augmenta tant els falsos positius com els negatius, el temps de seguiment varia en funció dels estudis i els grups d'edat tampoc coincideixen entre estudis (53). La nostra taxa de regressió del 67%, tampoc difereix del treball de Bansal on s'estudien 1001 dones diagnosticades per biòpsia (89).

La taxa de progressió del nostre estudi és similar a la sèrie de Mitchell, realitzat l'any 1994, defineix la probabilitat acumulada per tots els graus de CIN estudiats tant per citologia com per histologia i els resultats obtinguts són: 45% de regressió, 31% de persistència i 23% de progressió (90). Melinkow, que presenta els resultat d' un metaanàlisi de 27929 dones una regressió del 47,39%, una persistència del 33% i una evolució a CIN3 del 20,81%, amb dades similars a les nostres. Amb aquests resultats, suggereixen un risc d'evolució a càncer cervical baix i un seguiment de 24 mesos acceptable (55).

L'estudi de Holowaty, amb 12058 pacients amb displàsia cervical lleu, troba regressions de 44% en els dos primers anys i fins al 75% als 5 anys. Aquest valor comparat amb el nostre estudi, pot ser degut a la presència de falsos positius en la mostra inicial i el seguiment a 5 anys. En la pràctica clínica habitual, actualment es tendeix a tractar les lesions que persisteixin a dos anys del diagnòstic, per tant és difícil obtenir resultats de seguiment a 5 anys (54).

En tots aquests resultats, junt amb els nostres, trobem unes altes taxes de regressió, evidenciant la necessitat de disposar de mètodes de triatge per tal de discernir quines d'aquestes lesions no evolucionaran i per tant disminuir les intervencions innecessàries, ja que el resultat citològic per si sol no ens dona aquesta informació.

RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I ELS FACTORS EPIDEMIOLÒGICS

S'han descrit possibles cofactors de persistència com poden ser l'edat, l'inici precoç de les relacions sexuals, les múltiples parelles sexuals, una nova parella sexual, la infecció per altres malalties de transmissió sexual com la *Chlamydia Trachomatis*, la multiparitat, la immunosupressió o el tabaquisme (24,91–97).

En el nostre estudi no hem observat diferències estadísticament significatives si estratifiquem els resultats per grups d'edat. Tot i això observem una tendència a la regressió en les dones menors a 20 anys. Nombrosos estudis, descriuen taxes de regressió en dones joves que oscil·len entre el 70-90% inclús en displàsies d'alt grau(3,98). Aquestes diferències poden ser perquè en la nostra sèrie el percentatge de dones joves és menor.

Existeixen nombrosos estudis que demostren que la *conducta sexual* és un factor afavoridor tant de la infecció com de la persistència i evolució de les lesions. Així, l'inici de les relacions sexuals, el numero de parelles sexuals, el canvi de parelles sexual recent i tenir relacions sexuals amb homes amb conductes de risc són els factors més freqüentment estudiats pel que fa a la conducta sexual.

En el nostre estudi hem analitzat l'edat de la primera relació sexual, el número de parelles sexuals tota la vida i el numero de parelles sexuals de l'últim any. No hem trobat dades estadísticament significatives en l'edat precoç de les relacions sexuals però si en el numero de parelles sexuals durant l'últim any i en el numero de parelles sexuals durant tota la vida. Les dones amb > 5 parelles sexuals tenien més risc de persistir la lesió, amb un OR 2,74 (IC 95% 1,41-5,23 p=0,004) i de desenvolupar una lesió cervical d'alt grau, amb un OR 2,19 (IC 95%: 1,16-4,12; p=0,004). Obtenim resultats similars a la sèrie presentada per Krüger-Kjaer *et al* (98) on estudien els cofactors associats amb la conducta sexual i arriben a la conclusió que les dones amb més de 5 parelles sexuals tenen un risc augmentat de lesió cervical i progressió (RR 2,5) en les pacients amb ASCUS, LSIL i HSIL.

L'estudi VIVIANE (99) també mostra un augment de risc de lesió d'alt grau, sobretot quan el nombre de parelles sexuals durant l'últim any és major. En la nostra sèrie també veiem que a més parelles sexuals, més augmenta el risc d'evolució de la lesió (OR:1,1 IC 95%: 1,026-1,15; p=0,04).

L'ús sistemàtic del preservatiu disminueix la quantitat de virus transmesa i així la càrrega viral. Tot i que el preservatiu pot no protegir al 100% la infecció pel VPH, degut al caràcter ubic del mateix, si que preveu la majoria d'infeccions de transmissió sexual, sobretot aquelles que podrien afavorir la persistència i evolució del VPH (*Chlamydia Trachomatis*, *VHS-II*) (100). En la nostra sèrie no hem trobat diferències estadísticament significatives pel que fa l'ús sistemàtic del preservatiu, ni en l'ús del DIU ni en la presa d'anticoncepció hormonal. Jensen *et al* descriu un risc menor de CIN3+ en dones amb VPH i amb tractament amb anticoncepció hormonal i no troba associació entre l'ús de dispositiu intrauterí i lesió cervical (92).

La multiparitat també s'ha estudiat com un factor afavoridor de persistència de lesió cervical. La nostra sèrie no ha trobat diferències estadísticament significatives entre les dones que havien tingut fills o no. Pel que fa referència al número d'embarassos es van classificar les pacients en funció del número d'embarassos (0, 1, 2, 3 o més) i tampoc es van trobar diferències estadísticament significatives. Jensen *et al* descriuen un risc incrementat de progressió a CIN2+ d'entre les dones que havien parit (25). Múltiples estudis troben associació entre paritat i lesió d'alt grau. Les gestacions mantenen la zona de transformació a l'exocèrvix durant llargs períodes de temps, facilitant l'exposició directa al VPH i altres cofactors. A més a més, els canvis hormonals induïts per la gestació, com l'augment d'estrògens i progesterona, podrien modular la resposta immune a la infecció pel VPH i influir en el risc de persistència i progressió de la infecció (1,101). Castellsagué *et al* (102) revisen els principals cofactors associats a càncer de cèrvix, i descriuen que a l'estudi IARC les dones amb 7 o més fills via vaginal tenen un risc incrementat de càncer de cèrvix (OR=3,82; IC 95% 2,66-5,48). Un estudi a Costa Rica també troba associació entre l'increment de parts i la lesió d'alt grau (p 0,04). L'estudi cas-control de Copenhagen no detecta cap efecte entre la paritat i el HSIL (98). Els nostres resultats no han trobat diferències estadísticament significatives

pel que fa a l'evolució de CIN2+ en les dones que havien parit i això ho podem explicar per la baixa multiparitat en la nostra mostra.

Existeixen dues teories pel que fa a l'associació entre menopausa i persistència de VPH; d'una banda la disminució de la immunitat específica provocaria una reactivació de VPH latents i d'altra banda l'adquisició de noves infeccions de VPH degut a nous contactes sexuals, descrites per Castellsagué et al (95). El nostre estudi no ha observat associació entre menopausa i evolució de CIN2+ en línia amb Ciavattini *et al* on estudien 385 dones i obtenen resultats similars als nostres, amb dades semblants de persistència i evolució en ambdós grups (103).

Ja ha estat documentada la immunosupressió com a possible cofactor de persistència i evolució de les lesions cervicals. En la nostra mostra es van extreure les dones VIH+ ja que la historia natural de la infecció és diferent a la pacient sense VIH+. En aquestes pacients, la prevalença de VPH en dones VIH+ s'incrementa amb el grau d'immunosupressió (18). En la nostra sèrie, no s'obtenen diferències significatives en l'evolució a CIN2+ entre les pacients amb alguna immunosupressió, resultats en línia a l'estudi de Simoes *et al* (104). Aquest fet es pot explicar amb el petit nombre de pacients immunodeprimides.

Nombrosos estudis associen el tabac, conegut carcinogen, amb en la historia natural del càncer cervical. La nicotina i alguns carcinògens dependents del tabac s'han trobat aïllades en el moc cervical de les fumadores, fet que dóna força a la teoria de la sinèrgia entre el tabac i el VPH (95).

En la nostra mostra no hem trobat diferències estadísticament significatives pel que fa al tabaquisme, però sí que hem trobat diferències significatives si el consum de tabac era major a 15 cigarretes per dia. El risc a CIN2+ augmenta per cada cigarreta de més respecte la regressió en línia amb l'estudi de Egeberg (105) que demostra una associació entre el tabac i un augment del risc de lesions cervicals d'alt grau en dones amb VPH-AR persistents, en les dones que fumaven més de 20 cigarretes al dia (OR 1,55 IC 95%: 1,06-2,16). McIntyre-Seltman *et al* (106) descriuen un augment de risc d'infecció VPH, però no troba associació entre els fumadors i la progressió de la lesió. Només observa un augment de risc en les dones fumadores de més de 40 cigarretes al

dia (OR=3,3 IC 95%: 1,5-7,5), i amb una historia de tabaquisme de més d'11 anys (OR=2,1 IC 95%: 1,5-2,9).

RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I LA DETECCIÓ DE VPH

El nou protocol de càncer de cèrvix recomanat per l'AEPC inclou el VPH-AR com a mètode de cribratge de les dones majors de 30 anys. La instauració d'aquest programa de cribratge encara està en procés ja que la despesa inicial de la determinació del VPH-AR està retardant la seva implantació. L'opció de control mitjançant citologia està acceptada com a mètode de cribratge i de control d'algunes displàsies cervicals lleus. Les dones amb diagnòstic alterat a la citologia són derivades a colposcòpia per estudi histològic. Quan la citologia que informa com a HSIL o ASC-H tenen més tendència a confirmar el diagnòstic histològic CIN2+ que una lesió LSIL. Tot i això, el risc de CIN2+ en una pacient amb LSIL és del 4-10% (107).

De les 266 pacients inicials de la nostra mostra amb diagnòstic de LSIL i ASCUS, el 22,2% d'elles presenten lesió histològica confirmada CIN2+ en el període de seguiment (24 mesos) que suposa el risc absolut de progressió.

En la nostra mostra, el risc relatiu de progressió a CIN2+ en pacients VPH positives és de 9,98. Es a dir, una pacient VPH positiva té casi 10 vegades més de probabilitat de progressió a CIN2+. En la línia dels nostres resultats Soderlund-Strand *et al* defineixen el valor de la OR de progressió de les lesions de baix grau a CIN2+ mitjançant la HCII del 13,16 (21).

Si estratifiquem per edat, veiem que el risc relatiu d'evolució a CIN2+ és major en dones majors de 30 anys, amb un RR de 19,29 i de 2,66 en menors de 30 anys, evidenciant la transitorietat de les infeccions per VPH en pacients joves (108).

Un de les limitacions més importants que ens trobem en la detecció del VPH i l'associació amb CIN2+ és la seva baixa especificitat. El caràcter transitori de les infeccions per VPH-AR implica que moltes d'aquestes pacients eliminaran el virus

espontàniament. En el nostre estudi hem obtingut una sensibilitat de detecció de CIN2+ del 93,5% i l'especificitat es de 34,3%. Budal *et al* detecten un augment de detecció de CIN2+ del 22% en el triatge de les lesions de baix grau comparant amb la citologia com a única prova. Dues pacients presenten evolució a lesió cervical d'alt grau tot i tenir el test VPH negatiu. El VPP i el VPN es 30,2% i 94,5% respectivament. L'alt valor del VPN implica que una lesió de baix grau amb VPH negatiu confereix un risc d'evolució a CIN2 equiparable a la citologia normal.

Si separem els resultats citològics ASCUS i LSIL, observem que en els casos d'ASCUS, la positivitat a VPH-AR és del 48,5% , mentre que en el cas dels LSIL la positivitat ascendeix fins al 72,2%. Per tant, observem que els graus de positivitat per VPH-AR augmenten a mesura que augmenta el grau de lesió citològica ($p= 0,000$) (109). Si analitzem els riscos acumulats en funció del resultat citologia inicial, observem que la determinació de VPH confereix un risc diferent en funció de la citologia i l'estat basal del VPH. L'ASCUS-VPH negatiu confereix un risc d'evolució similar a la citologia negativa-VPH negatiu. En canvi, el resultat ASCUS-VPH positiu li confereix un risc similar a una LSIL. Múltiples estudis demostren que la detecció viral en LSIL no és una eina útil en el triatge d'aquestes anomalies citològiques, ja que el 80% de les pacients són portadores pel VPH (78).

D'entre aquestes pacients amb citologia **ASCUS**, el risc absolut de progressió a CIN2+ és del 17,7 %. Segons les dades reportades a la literatura, l'evolució a CIN2+ en les pacients ASCUS VPH+ es troba entre el 5 i el 17%. Aquests resultats estan en la línia de la sèrie de Fujii, on els resultats arriben fins al 17,6% (88).

El risc relatiu de progressió a CIN2+ en les pacients ASCUS-VPH positives era similar que les pacients LSIL. L'alt valor predictiu positiu de l'evolució en dones VPH+ ens suggereix que les infeccions rellevants són detectades amb la prova. Aquests resultats són similars als trobats en la sèrie de Budal (110). L'estudi ALTS demostra la utilitat de la detecció de VPH en el triatge de les dones ASCUS, però és limitada en els casos de LSIL degut a l'elevat percentatge de positivitat. D'aquí, que el càlcul de risc acumulat no difereixi excessivament entre les pacients LSIL i les LSIL VPH+ (78). L'estudi ATHENA

estudia la determinació de VPH positiu en les pacients ASCUS i si que observa que en funció de l'estat del VPH, la progressió augmenta de manera significativa (111).

En les lesions citològiques ASCUS, la sensibilitat per VPH-AR és de 90%, amb una especificitat que augmenta fins al 63%. Aquest és un dels motius pels quals es realitza la determinació de VPH als ASCUS de forma rutinària, disminuint així el número que derivem a colposcòpia quan el VPH és negatiu.

Els nostres resultats no difereixen dels descrits al metaanàlisi d'Arbyn (112). El grup ASCUS revisa 16 estudis i obté resultats de 94% de sensibilitat i un 62% d'especificitat. La sensibilitat de la detecció de VPH-AR era 14% superior a la citologia convencional sola, en 6 estudis on es va valorar els dos mètodes de cribratge. La variació entre estudis de la sensibilitat relativa no té diferències significatives, però l'especificitat relativa és similar entre HC2 i la citologia repetida (Especificitat relativa de 0,99).

D'entre les pacients amb citologia **LSIL** el risc absolut d'evolució és del 20,7% resultats similars als observats per Quint (113).

Si ens fixem en les pacients LSIL, constatem que el VPH no modifica excessivament el risc respecte la citologia sola, probablement degut a que la majoria dels LSIL tenen una infecció per VPH i per tant la determinació global de VPH no en modifica el pronòstic. Castle *et al* estudien el risc a 5 anys de lesions cervicals de baix grau i conclouen que el LSIL té un risc major de de progressió amb un OR de 2,9 respecte els ASCUS.

Els nostres resultats no difereixen als trobats per Katki *et al*, que estudien la influència de la detecció de VPH en LSIL i ASCUS. La determinació de VPH positiva no proporciona cap informació respecte el pronòstic de les lesions, ja que el fet d'obtenir un LSIL-VPH positiu no augmentava el risc considerablement de progressió a CIN2+ (114).

La sensibilitat en les lesions citològiques LSIL la sensibilitat per VPH-AR és del 97,9%, però l'especificitat és de 29,1%, menor que el grup ASCUS. Això és degut a que la majoria de lesions LSIL són portadores de VPH i malgrat això, la determinació viral VPH-AR és positiva en la majoria d'infeccions transitòries.

Taula 66: Comparació S, E, VPP i VPN en diferents estudis

Lesió citològica	Sensibilitat		Especificitat		VPP		VPN	
	LSIL	ASCUS	LSIL	ASCUS	LSIL	ASCUS	LSIL	ASCUS
Bergeron	98,4%	100%	15,6%	60,4%	18,6%	10%	98%	100%
Arbyn	94%	97%	67%	28%	22%	27%	98%	98%
Paluszkiewicz	92,7%		57%		-		-	
Wentzensen	93,5%		31,9%		-		-	
Schmidt	96%	91%	19,1%	36,3%	-		-	
Fujii	94,4%		33%		24,4%		96,6%	
Sèrie present per resultat citològic	95,3%	81,8%	29,1%	63%	-	-	-	-
El nostre estudi global	93,5%		34,3%		30,2%		94,5%	

Arbyn *et al* analitzen 10 estudis i observen una sensibilitat alta (97%) i una especificitat baixa (29%). La sensibilitat relativa del test VPH comparada amb les citologies repetides va ser d'1.07. A més a més, la captura d'híbrids va mostrar una baixa especificitat respecte la repetició de la citologia (112).

Els nostres resultats són similars als que podem trobar a l'estudi PALMS, realitzat per Bergeron *et al* (115). Les taxes de sensibilitat i especificitat són similars a les nostres, amb una sensibilitat alta tant en el cas de LSIL i ASCUS i una especificitat de 15,1% en LSIL i de 60,4% en els ASCUS.

Paluszkiewicz també analitza la sensibilitat i especificitat de la detecció ADN VPH comparant amb la citologia i observa que els tests moleculars augmenten la sensibilitat per les lesions d'alt grau si ho comparem amb la citologia. En la seva sèrie, l'especificitat és més alta, probablement degut a l'estratificació per edat (116).

L'estudi ALTS (ASCUS-LSIL Triage Study) (78) va ser dissenyat amb l'objectiu d'establir les estratègies de cribratge en les pacients diagnosticades per ASCUS/LSIL. Aquest estudi demostra que en el cas dels ASCUS, la determinació per VPH-AR té una elevada sensibilitat i un elevat VPP en quan a la progressió a CIN2+. En el cas dels LSIL, la

prevalença de VPH és molt elevada i no és efectiva la determinació del VPH. Això concorda amb els nostres resultats, on les pacients diagnosticades d'ASCUS i determinació viral negativa, curen espontàniament la lesió citològica en el transcurs dels següents 24 mesos.

La sèrie de Schmidt troba resultats similars als nostres en termes de sensibilitat, i l'especificitat obté un valor de 19,1%. Probablement, aquesta diferència en l'especificitat és deguda a la diferència d'edat de les pacients en les dues mostres (73). La sèrie de Fujii, els valors de la S, E, VPP i VPN són molt similars als nostres (88).

Cox *et al* (2) va comparar el triatge per VPH-AR, repetir citologia i colposcòpia a totes les dones i va arribar a la conclusió que repetir la citologia tenia una sensibilitat inferior en les citologies ASCUS, mentre que la detecció per VPH-AR i la derivació a colposcòpia eren iguals en termes de seguretat.

En el nostre estudi, quan la detecció de **VPH és negativa**, l'evolució a lesió cervical d'alt grau és de 1,5% en els següents 24 mesos. Arbyn *et al* defineixen un model de risc per CIN2+ i determinen que si el risc a CIN2+ és menor del 2%, és segur tornar la dona al cribatge poblacional. Tropé *et al* tenen resultats similars als nostres, amb taxes d'evolució cervical amb VPH negatiu de 1,8% (117). Aquesta dada ens demostra que a moltes d'aquestes pacients se'ls hi realitzarà una colposcòpia no necessària. Una detecció de VPH negatiu confereix un risc baix de progressió a CIN2+, resultats comparables als trobats a la sèrie de Budal *et al*, on observen que el VPH negatiu era superior a l'hora de predir la no evolució de la lesió. L'alt VPN de la determinació VPH+ en la progressió a CIN2+ ha estat demostrat en múltiples estudis (118). En la nostra sèrie, la no presència de VPH és de 0,73, tenint un efecte protector en el desenvolupament de la lesió. Castle obté resultats similars als nostres, amb un RA de progressió a CIN2+ de 2,9% (79).

En la nostra sèrie hem tingut dos casos d'evolució de CIN2+ en dones VPH negatives, un cas de adenocarcinoma infiltrant i un cas de CIN III. El 99% dels càncers cervicals estan provocats per VPH-AR però existeix un 1% de càncers amb VPH negatiu. Rodriguez-Carunchio analitza 136 dones amb càncer de cèrvix i conclou que el CC amb

VPH negatiu és més freqüents en les lesions glandulars, probablement degut al tropisme de determinats virus per canal cervical (119).

Seguint en la línia dels estudis reportats i els nostres resultats, observem que en funció de la citologia basal i la detecció del VPH, l'evolució de la lesió és diferent. La detecció del VPH en LSIL ens proporciona poca informació degut a que les LSIL tenen una infecció per VPH-AR positiva en el 80% dels casos. En canvi, la detecció del VPH en les pacients ASCUS, li confereix un risc d'evolució similar a les LSIL, i si es negativa el risc és similar a una citologia negativa.

RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ I EL GENOTIPAT ESPECÍFIC

Nombrosos estudis han analitzat l'associació entre genotips específic de VPH i l'evolució a CIN2+. És àmpliament demostrat que el VPH 16 i 18 són els causants del 70% dels càncer de cèrvix a nivell mundial (1,120). Les guies nacionals i internacionals només confereixen un risc augmentat de progressió als VPH 16 i 18, que han estat recentment integrats en el programa de cribratge de càncer cervical en el algorismes per VPH positiu i citologia negativa, obviant els altres virus.

La quantificació del risc per les lesions cervicals associades als diferents VPH és una àrea d'investigació intensa. La distribució del VPH difereix en funció del grau de severitat de la lesió, amb una major diversitat de tipus de VPH en les lesions cervicals de baix grau i una dominància dels VPH 16 i 18 en les lesions d'alt grau (121).

En la nostra sèrie, els tres VPH més amb risc major de progressió a CIN2+ són el VPH 16, el VPH 31 i el VPH 18. L'associació entre la infecció amb VPH oncogènic i el risc de CIN va ser més forta a mesura que augmentava el grau de la lesió.

El **risc absolut (RA)** de progressió a CIN2+ en les pacients del nostre estudi amb VPH 16 va ser de 43,6% (IC 95%: 30,3-57,67), per VPH 18 de 46,8% (IC 95%: 19,22-74,86) i pel VPH 31 del 40% (IC 95%: 22,65-59,39). Els resultats són similars a la sèrie reportada per Naucler *et al*, amb seguiment a 4 anys, on trobem riscos absoluts de VPH 16, 18 i 31 de

36,6%, 25,6% i 36,7% respectivament (122). Matsumoto *et al* descriuen un RA de progressió del 26,5% pel VPH 16, un 7,7% en VPH 18 i un 33,7% en VPH 31. Podem explicar aquestes diferències degut a la mida de la mostra (123). La sèrie de Quint descriu RA de persistència o progressió a CIN2+ del 62,5% pel VPH 16, del 60% en VPH 18 i del 48,6% pel VPH 31 (113). Aquests valors són més elevats que en la nostra mostra perquè Quint inclou els resultats persistents. El nostre estudi difereix de l'estudi VIVIANE, on s'observa un major risc de lesió cervical per VPH 16 i 33. Comparant la infecció per VPH 16 i/o 33 amb genotip no oncogènic, en el cas del VPH 33 hi havia un risc de lesió d'alt grau 30-40 vegades superior, i en el cas del VPH 16 el risc de lesió d'alt grau era 20 vegades superior que un VPH no oncogènic (99), aquest fet fa a plantejar als autors el maneig del VPH 33 com els VPH 16/18. Aquesta diferència amb els nostres resultats pot ser deguda que en la nostra sèrie hi ha molts pocs casos de VPH 33 i no obtenim resultats significatius. A més a més, existeixen unes prevalences diferents en les diferents àrees geogràfiques. A l'estudi PATRICIA també obtenien una associació forta entre els VPH 33 i 16 amb les lesions d'alt grau. En la sèrie de Wheeler *et al* s'observa que els VPH més freqüentment implicats en la progressió CIN2+ són el 16/31/33 (124). La diferència amb els nostres resultats té una explicació possiblement geogràfica i d'altra banda, la nostra sèrie és petita amb molts pocs casos de VPH 33.

En el nostre estudi, el **Risc Relatiu (RR)** de **VPH 16** és de 2,63 (IC 95%: 1,78-4,02), resultats estadísticament significatiu. Si estratifiquem el risc per edat, amb el punt de tall als 30 anys, observem un augment del risc de 2,98 en les dones majors (IC 95%: 1,01-5,41). Això s'explica pel caràcter transitori de les infeccions per VPH en les dones joves. Naucler *et al* obtenen un RR de progressió per VPH 16 de 6,3, aquesta diferència es podria explicar per les diferències en les mostres, en aquest estudi totes les dones tenen entre 32 i 38 anys, per tant, les taxes de prevalença són majors i les de persistència i evolució també (122). Nakamura *et al* descriuen una OR de progressió a CIN2+ de 5,18 en el cas del VPH 16 (107) i Matsumoto *et al* obtenen una OR de progressió a CIN2+ en dones VPH 16 de 7,63. Quint defineix una OR de 3,48 (IC 95%: 1,16-10,41) per VPH 16, obtenint una diferència estadísticament significativa (113). El valor de la OR és superior a la nostra mida d'associació perquè en aquest estudi,

analitzen els casos persistents i que evolucionen. Les diferències entre els altres estudis on estudien les OR poden ser degudes a que les *odds ratio* sobreestimen el risc, mentre que nosaltres hem treballat amb riscos absoluts i relatius.

Monsonogo *et al* analitzen l'associació amb lesió d'alt risc entre el VPH 16, 31, 33 i 52. El VPH amb més risc d'evolució és el VPH tipus 16 en menors de 30 anys amb un risc de 7,5, però si ens fixem en dones majors de 30 anys el risc és major amb el VPH 31. Obtenen riscos baixos amb el VPH tipus 18, tot i que està associat a un percentatge elevat del càncer de cèrvix a nivell mundial (125). Aquest fet pot ser degut al tropisme particular del VPH 18 i la seva preferència en fer lesions a nivell del canal cervical, i la seva dificultat de presa de la mostra sobretot en casos on es localitza en nivells superiors del canal cervical. Soderlund *et al* analitzen un total de 1595 dones amb lesions cervicals de baix grau i es realitza en totes elles genotipatge del VPH, i observen que en funció del genotip de VPH involucrat, es confereix un risc diferent de progressió. En el cas del VPH 16 obtenen un OR de lesió d'alt grau de 3,4 (IC 95% 2,65-4,37) (21). L'estudi Patricia obté risc relatiu de progressió majors en el cas del VPH 16 i 33, i els VPH que menys eliminen el virus són el 16 i el 31 (126).

El **risc relatiu** de progressió en el cas del **VPH 18** va ser de 2,21 (IC 95% 1,49-4,15). Els resultats són superiors als descrits per Nakamura *et al*, on el RR de VPH 18 és 1.03 (IC 95% 0.25–4.23) (107), Soderlung obté resultats pel VPH 18 OR 1,36 (IC 95% 0,91-2) (21). Quint *et al*, defineixen OR de progressió a CIN2+ del VPH 18 de 3,14 (113). Tot i això cap d'ells obté resultats estadísticament significatius. En la nostra sèrie no hem pogut valorar el risc en funció de l'edat, perquè només hi ha 3 dones menors de 30 anys portadores i no han desenvolupat lesió d'alt grau. Skinner *et al* obtenen un risc menor pel VPH 18 que el VPH 16 o 33, probablement degut a que es detecta en menor mesura. El VPH 18 és detectat menys, però té una progressió major a lesió CIN2+, resultats similars a la nostra mostra, on només tenim 13 casos de VPH, però 6 d'ells evolucionen a CIN2+ (99).

El **risc relatiu** de progressió a CIN2+ en el cas del **VPH 31** en el nostre estudi és 2,01 (IC 95%: 1,21-3,33), resultats en la línia de Soderlund que descriuen un OR de 2,75 (IC 95% 196-3,85). Nakamura descriu un risc de progressió a CIN2+ del 3,90 (IC 95% 1,57-9,67).

En la sèrie de Quint et al, s'analitzen 300 pacients LSIL i obtenen una OR de progressió a CIN2+ pel VPH 31 de l'1,97 (IC 95% 0,74-5,24). A més, en aquest darrer estudi, descriuen un major risc en evolució i persistència en majors de 30 anys. En el nostre estudi, en la línia d'aquests resultats, obtenim un RR de progressió a CIN2+ en dones menors de 30 anys és de 2,01 i si són majors de 30 anys és de 2,18, tots dos estadísticament significatius.

El **risc relatiu** de progressió a CIN2+ en pacients **VPH 45** positives va ser de 2,32 (IC 95%: 1,01-5,34) sense obtenir diferències estadísticament significatives entre majors i menors de 30 anys. Soderlund obté un risc de 1,74 (IC 95% 1,10-2,73) i Quint et al obtenen un OR de 2.45 sense obtenir resultats estadísticament significatius.

L'associació entre els diferents genotips de VPH-AR i la persistència/progressió de la lesió cervical ha estat estudiat en múltiples estudis on focalitzaven els VPH 16/18. Nakamura *et al* (107) obtenen una **sensibilitat** del 100% de lesió d'alt grau i una **especificitat** del 29% englobant els 13 VPH-AR causant la majoria dels càncer de cèrvix. Per tant, conclou que la determinació dels 13 VPH-AR no és efectiva com a triatge, ja que l'elevada prevalença d'aquests virus ens augmentaria el numero de falsos positius. En la nostra mostra, si analitzem la sensibilitat, especificitat, VPN i VPP dels 14 VPH-AR més freqüents, observem sensibilitats molt altes i especificitats molt baixes, un VPP baix i un VPN alt.

La positivitat per VPH 16/18, disminueix la sensibilitat fins el 52%, però l'especificitat augmenta fins al 73%. Aquests resultats són similars als nostres, i reforçant el oncogenicitat d'aquests dos tipus virals.

Soderlund descriu que la combinació de VPH 16,31 i 33 estan associats amb un risc augmentat de CIN 2+, amb un VPP més elevat, una sensibilitat del 76,7% i reduïa el numero de derivacions a colposcòpia basant-se en el genotip viral (21). En la nostra sèrie, amb la combinació de VPH 16/18/31 obtenim una sensibilitat del 67,7%, una especificitat del 76,3%, un VPP del 45% i un VPN de prop del 90%. Quan afegim el VPH 33, augmenta la sensibilitat però disminueix l'especificitat i el VPP. Això és degut a que molt poques pacients son portadores del VPH 33. En el nostre estudi, hem analitzat la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN de diferents VPH de manera individual i en

combinació. Destaquem sensibilitats baixes si ens fixem en VPH determinats, però augmenten a mesura que afegim VPH en el diagnòstic. La sensibilitat del VPH 16 aïllat és del 40,6%, del 10% en el cas de VPH 18 i del 19,1% en el cas del VPH 31, resultats en la línia de Soderlund *et al* (21). Si ens fixem en termes d'especificitat, pel VPH 16 és del 85%, pel VPH 18 del 92,1% i pel VPH 31 del 80,1%. Aquestes dades ens donen informació rellevant en quant al potencial oncogènic d'aquests virus.

Si utilitzem combinacions en el triatge d'aquestes lesions, observem que el risc major l'obtenim amb la detecció del VPH 16/18/31/45 amb un RR de 4,84. En la nostra mostra, la detecció de VPH 16/18 li confereix un risc de lesió cervical de 2,99, la detecció de VPH 16/18/31 li confereix un risc de 4,18. Contràriament, la no detecció de VPH 16/18/31 li confereix a la pacient un risc relatiu d'evolució de 0,24 estadísticament significatiu. Aquestes dades ens mostren que aquests VPH específics són els que realment tenen risc de progressió, comparant amb els altres genotips.

Per ser útil en el maneig clínic, el risc estimat que ens proporciona el genotipatge del VPH necessita dirigir les decisions clíniques com la derivació a colposcòpia immediata, colposcòpia diferida o repetir la citologia o el test de VPH. L'estudi ALTS considera el lliandar de l'augment del risc del 10% de CIN2+ per ser derivat a colposcòpia immediata.

Diversos estudis demostren que alguns genotips de VPH-AR estan fortament associats amb lesions d'alt grau. A l'estudi *According to Cervical Lesions Observed by Papillomavirus types-A Research in Europe* (CLEOPARE II), 12 VPH són associats amb lesió CIN2+, especialment el VPH **16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 i 58** (128). El nostre estudi, amb una n molt menor, els VPH implicats en la progressió són el VPH 16,18, 31, 45 i 58.

Analitzant els altres genotips de VPH no hem trobat diferències estadísticament significatives en l'augment del risc relatiu en la seva evolució a CIN2. Nakamura conclou que les pacients no portadores del VPH 16/18/31/33/35/45/52/58 podrien no necessitar colposcòpia i biòpsia. Aquest fet reduiria la colposcòpia fins al 40%. El nostre estudi, amb una mostra petita, ha trobat diferències estadísticament significatives en quant a la progressió del VPH 16, 18, 31 i 45, per tant aquestes serien les candidates a colposcòpia i biòpsia, resultats en la línia de Nakamura (107). Eun Sung categoritza els

12 VPH no 16 i no 18, per estratificació del risc en dos grups (VPH 31/33/35/45/52/58 vs VPH 39/51/56/59/66/68), on el grup VPH 31/33/35/52/45/52/58 necessita més seguiments i controls. En la nostra sèrie, els VPH no 16-18 on hem trobat un augment significatiu del risc són el VPH 31, 45 i 58, resultats en la línia de Eun Sung et al (128).

En canvi, Monsonogo et al conclouen que els únics amb risc augmentat de progressió són el VPH 16 i 18 com els responsables de la majoria de càncers cervicals, i conclou que la identificació de no VPH 16 i no 18 ens dona prou informació pel realitzar cribratge de tots ells.

L'estratificació per edat (menor de 30 o major de 30 anys) de tots els tipus de VPH que ens ha donat resultat estadísticament significatiu confereixen un risc relatiu de progressió elevat en ambdós grups. Tot i això, el subgrup major de 30 anys presenten riscos majors. Així, en cas del VPH 16, el RR en menors de 30 anys és de 2,34 i en majors de 30 anys de 2,98. Aquest fet, que es repeteix en tots els VPH on hem trobat diferències estadísticament significatives, s'explica amb el caràcter transitori de les infeccions en menors de 30 anys, i la tendència a la persistència de les dones majors. Matsumoto i Quint obtenen resultats similars als nostres: específicament, les dones majors de 30 anys tenen major probabilitat de no regressió que les menors de 30 anys (113,123) . Aquests resultats, estan en línia dels estudis realitzats per Khan *et al* i Monsonogo *et al* (125,129). Monsonogo confirma la utilitat de determinar la presència de VPH 16 i 18 en dones majors de 30 anys com a test complementari, contràriament la determinació dels altres tipus de VPH-AR és molt infreqüent i no justifica el genotipatge individual. Ye *et al* identifiquen VPH 16 i 18 com a factors predictors de progressió en dones majors de 30 anys, sense trobar resultats estadísticament significatius en les dones més joves (120). Aquests resultats estan en la línia de Wheeler *et al* on demostren que és més freqüent el diagnòstic de CIN2+ en dones menors de 30 anys, però el diagnòstic de CIN3+ és més freqüent en dones majors (130).

Els nostres resultats no mostren un augment de risc de lesió d'alt grau en **infeccions múltiples**, resultats contraris als de l'estudi PATRICIA on el risc de lesió era superior en pacients amb múltiples infeccions per VPH (126). El paper de les múltiples infeccions

per VPH en la història natural de la infecció és controvertit, amb estudis on existeix un risc major d'adquisició de nous VPH a noves infeccions i estudis que creuen que són fets independents. Wentzensen estudia recentment les infeccions múltiples per VPH i arriba a la conclusió que no existeix una associació sinèrgica entre la infecció per múltiples VPH i l'evolució a CIN2 (131). Quint estudia la lesió CIN2+ histològica i la microdissecció per làser de les lesions per CIN i ha demostrat que cada component de la lesió està associat a un tipus de VPH en concret (132).

El risc de desenvolupar una lesió cervical d'alt grau va ser major amb el VPH oncogènics respecte els no oncogènics. En la nostra sèrie cap portadora a de **VPH de baix risc** en monoinfecció ha desenvolupat lesió CIN2+, resultats en la línia de Jaisamrarn (126). Burk *et al* revisen els diferents VPH aïllats fins el moment, i destaquen que els VPH-BR poden persistir en el temps però no evolucionen a lesió CIN2+, resultats acords amb la nostra sèrie (133). Soderlund *et al* analitzen els diferents genotips involucrats en les displàsies cervicals de baix risc, i descriuen una OR d'evolució a CIN2 en els VPH-BR de 0,19 (IC 95% 0,09-0,41), obtenint un efecte protector respecte l'evolució. En el nostre estudi, cap dels VPH-BR s'han associat a diferències significatives en quan a persistència i evolució. Amb aquestes dades corroborem la poca utilitat del genotipatge dels VPH-BR, donat la seva alta prevalença i les poques implicacions clíniques.

Seguint en la línia dels estudis reportats i els nostres resultats, observem que en funció del VPH aïllat l'evolució de la lesió és diferent. La detecció del VPH 16, 18, 31 i 45 tant en pacients LSIL com en pacients ASCUS li confereix un risc major d'evolució de CIN2+ que no tenir-los. El genotipatge específic per VPH ens pot ajudar a estratificar les pacients LSIL/ASCUS per tal de determinar quina d'elles tindrà un major risc de persistència i progressió. Caracteritzar el risc de manera més precisa ens ajudarà a reduir el número de citologies de seguiment i les colposcòpies realitzades.

RELACIÓ ENTRE L'EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ I EL RESULTAT DE LA TINCIÓ DUAL

Les alteracions citològiques ASCUS i LSIL representen la majoria dels diagnòstics anòmals en citologia. En els casos de lesió citològica ASCUS utilitzem de manera generalitzada la detecció del VPH-AR, però no en el cas de lesions cervicals de baix grau, degut a que moltes infeccions són transitòries. Existeixen biomarcadors com p16 i Ki-67 que ens donen informació sobre les lesions intraepitelials d'alt grau en desenvolupament. En aquesta part de l'estudi hem avaluat la detecció d'aquests biomarcadors en pacients portadores VPH 16 i VPH 18, tant per citologies ASCUS com LSIL i la seva associació amb l'evolució a CIN2+.

En el nostre estudi d'entre les pacients a qui hem realitzat la tinció dual hem obtingut un 37,5% presenten positivitat per p16/Ki-67, resultats en la línia de la sèrie de White *et al*, que obtenen una positivitat del 30,4%. Ordi *et al* obtenen prevalences de positivitat p16/ki-67 del 55,6% en pacients LSIL (134).

En la nostra mostra, si estratifiquem per resultat citològic, 35% de positivitat per p16/Ki-67 en les LSIL i fins al 50% de les pacients ASCUS (135). Aquests resultats són diferents als trobats a la literatura, on està àmpliament acceptat que la positivitat de la tinció dual augmenta a mesura que augmenta la lesió citològica. En la sèrie de Wentzensen el 19.6% de les citologies negatives són positives a p16/Ki-67, el 40,2% de les citologies ASCUS són positives, el 68,8% dels LSIL, el 82,5% dels ASC-H i el 95,3% dels HSIL (109). Tot i això, en la nostra sèrie les pacients a qui hem determinat la tinció dual totes eren positives per VPH 16/18, aquest fet li confereix a la citologia ASCUS un risc similar que les LSIL. Schmidt refereix una taxa de positivitat en ASCUS del 34,9% (73) i Loghavi refereix positivitat del 45%, valor més similar al nostre (87).

D'entre totes les pacients VPH 16/18, un 43,8% progressen a CIN2+. D'aquestes pacients el 83,3% tenen una prova p16/ki-67 positives. Solares *et al* analitzen 160 dones amb ASCUS/LSIL amb VPH positiu, i de les dones que evolucionen a CIN2+, un 66% presentaven positivitat a la tinció dual, resultats similar als nostres (136).

En la nostra sèrie, el RR d'evolució a CIN2+ en pacients amb tinció dual positiva és de 1,56 (IC 95% 1,05-2,31). Tot i això, si estratifiquem per edat, destaquem que les dones menors de 30 anys tenen un RR de 9 i les majors de 3,24. Aquests resultats estan en la línia de Wetzensen *et al* que analitzen 1509 dones i descriuen un OR amb tinció positiva del 7,2 en menors de 30 anys (137). White *et al* també observen un risc major de progressió en dones menors de 30 anys. En aquestes pacients, a qui normalment no s'aconsella la realització de VPH de forma rutinària, seria el marcador d'elecció (135).

La nostra sensibilitat és del 71,4%, l'especificitat del 88,8%, el VPP del 83,3% i el VPN del 80%. L'estudi PALMS demostra que la citologia dual augmenta tant la sensibilitat com l'especificitat en la detecció de CIN2+ en un test individual. La tinció dual augmenta la sensibilitat de la citologia un 18% en dones de totes les edats i augmenta l'especificitat fins un 95,2% (138).

Fujii *et al* revisen les citologies LSIL i ASCUS de 479 pacients des de setembre del 2010 fins a l'agost del 2011 i conclouen que la tinció dual és més precisa per la detecció de lesió CIN2+ que la detecció per VPH-AR (88). Els nostres resultats són similars als trobats a la sèrie de Wentzensen *et al* amb xifres de sensibilitat i especificitat en la detecció de CIN2+ de 86,4% i 59,5% respectivament (139). Ikenberg troba resultats similars en el seu treball, on estudia 27.349 dones, amb una sensibilitat de 86,7% i un VPP més baix, probablement degut a un error en la tècnica (74). L'estudi PALMS compara l'ús de la tinció dual, la detecció de VPH i la citologia convencional en el cribratge primari (140) i obté que la tinció dual tenia una sensibilitat per CIN2+ un 20% superior que no pas la citologia convencional, amb especificitat comparable. Els nostres resultats no difereixen del trobats per Wright *et al* (141,142) on comparen la sensibilitat, especificitat, VPP i VPN de la tinció dual *versus* la citologia en pacients triades amb el mètode COBAS®. La sensibilitat de la tinció dual era molt superior a la trobada en la citologia convencional (74,1 *versus* 51,9 per CIN3+, $p < 0,0001$). A més a més, tant el VPP com el VPN són més alts en la tinció dual comparant els dos mètodes.

Ordi *et al* obtenen una sensibilitat menor que la obtinguda amb la detecció per VPH-AR en dones menors de 30 anys, però amb un augment de l'especificitat fins al 50% respecte la detecció del VPH-AR, resultats similars als nostres (134).

Taula 67: Comparació dels resultats de S, E, VPP i VPN en diferents estudis

Estudio	Sensibilitat	Especificitat	VPP	VPN
Fuji	87,3	76,4	45,7	96,4
Wentzensen	86,4	59,5	60,1	86,1
Ikenberg	86,7	95,2	15,6	99,9
Bergeron	85,7	53,3	26,5	95
Ordi	90,9	72,1	-	-
Schmidt	94,2	68	-	-
Wright	74,9	74,1	18,5	97,4
El nostre estudi	71,4	88,8%	83,3%	80%

En la nostra sèrie hi ha 6 pacients amb una tinció dual negativa i que desenvolupen CIN2+. Les possibles causes d'aquest resultat és l'error en la interpretació per part dels patòlegs i la lesió CIN2+ que estan patint una regressió espontània. Dona *et al* assumeixen que la majoria de lesions són CIN2+ en fase de regressió (77). En la nostra mostra podia ser un dels motius dels nostres resultats, ja que les pacients són menors de 25 anys. Loghavi atribueix els falsos negatius a una mala realització de la tècnica, en utilitzar una mostra de forma retrospectiva (87). Aquesta també podria ser una causa dels nostres resultats, ja que la tinció dual es va realitzar un any després del moment basal.

En la nostra mostra tenim 3 pacients que presenten resultat positiu per la tinció dual i regressen la malaltia. Entre les hipòtesis que ens plantejem com a possibles causants dels falsos positius és no donar temps a les lesions a regressar pels nostres protocols i un error diagnòstic en la interpretació de la tècnica dual. Koo *et al* atribueixen els falsos positius amb la interpretació de metaplàsia escamosa, metaplàsia tubàrica, cèl·lules endocervicals o cèl·lules inflamatores amb tinció p16 o Ki-67 com a cèl·lules positives. Una altra possibilitat és quan p16 està expressat al nucli que pot alterar el color vermell de Ki-67 (143).

Seguint en la línia dels estudis reportats i els nostres resultats, observem que la determinació de p16/Ki-67 confereix un risc augmentat de progressió a CIN2+. Si ens fixem en les dones menors de 30 anys, el risc de positivitat i d'evolució de lesió és major que en les dones majors. La tinció dual podria ser un bon biomarcador de persistència i evolució en les dones joves, on la determinació de VPH no està indicada per una alta prevalença del VPH, degut en gran part a les infeccions transitòries. El fet d'obtenir un resultat negatiu en la detecció p16/Ki-67 ens permetria espaiar els controls semestrals, disminuir l'angoixa de les dones i de manera indirecte el cost sanitari. Calen més estudis per confirmar els nostres resultats.

8. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- L'absència de VPH en pacients ASCUS i LSIL té un risc d'evolució a CIN2+ molt baix, amb un risc similar a les dones amb citologia negativa i no precisarien un control específic.
- Les pacients ASCUS amb detecció de VPH positiva tenen un risc d'evolució similar als LSIL, per tant la conducta clínica hauria de ser similar .
- La detecció del VPH en les LSIL no és una eina adequada de triatge ja que no ens dona informació pronòstica en quant a l'evolució de les lesions.
- La determinació de VPH-BR manca de transcendència clínica i per tant no caldria ser investigada.
- El genotipatge específic per VPH 16, 18, 31 i 45 ens pot ajudar a estratificar les pacients LSIL/ASCUS per tal de determinar quina d'elles tindrà un major risc de persistència i progressió. Per tant, constitueix una ajuda valuosa al clínic per reduir el numero de citologies de seguiment i les colposcòpies realitzades amb la consegüent millora d'eficiència i cost-efectivitat.
- La p16/Ki-67 és un marcador molecular que ens proporciona informació pronòstica relativa a l'evolució de la lesió independentment de la positivitat del VPH, especialment en població menor de 30 anys en la que la determinació del VPH no ens aporta informació addicional.

9. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110 (S2): S4-S7
2. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *Journal of Clinical Virology.* 2009; 45(S1):S3-S122
3. Moscicki A-B, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol.* 2010;116(6):1373–80.
4. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA.* 2001 Mar 21;285(11):1500–5.
5. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(10):2536–45.
6. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account., *Virology.* 2009; 384: 260–5.
7. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370: 890–907.
8. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453–9.
9. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. Vol. 25, *Clinical Microbiology Reviews.* 2012;25: 215–22.
10. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008 Sep;110(3 Suppl 2):S4-7.
11. Gage JC, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Castle PE, et al. Risk of precancer determined by HPV genotype combinations in women with minor cytologic abnormalities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(6):1095–101.
12. van Doorlaer K, Burk R. Evolution of humana papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res.* 2010;77:41–62.

13. Prof. Luis M. Puig Tintoré. PREVENCIÓN DEL CÁNCER CERVICAL : VACUNACIÓN Y COLPOSCOPIA. Curso de formación continuada. 2012
14. Yim E-K, Park J-S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 2005;37(6):319–24.
15. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology.* 2010; 117: s5-s10
16. Institut Català d'Oncologia (ICO). Human Papillomavirus and Related Diseases Report. HPV Inf Cent. 2016. Available from: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/COL.pdf>
17. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S et al. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. ICO Inf Cent HPV Cancer (HPV Inf Centre) Hum Papillomavirus Relat Disea. 2016; Available from: www.hpvcentre.com
18. Heard I, Cubie HA, Mesher D, Sasieni P. Characteristics of HPV infection over time in European women who are HIV-1 positive. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2013;120(1):41–9.
19. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796–802.
20. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(5):1157–64.
21. Söderlund-Strand A, Eklund C, Kemetli L, Grillner L, Törnberg S, Dillner J, et al. Genotyping of human papillomavirus in triaging of low-grade cervical cytology. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(2):145e1-145e6.
22. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jul 7;89(1):101–5.
23. Ermel A, Qadadri B, Morishita A, Miyagawa I, Yamazaki G, Weaver B, et al. Human papillomavirus detection and typing in thin prep cervical cytologic specimens comparing the Digene Hybrid Capture II Assay, the Roche Linear Array HPV Genotyping Assay, and the Kurabo GeneSquare Microarray Assay. *J Virol Methods.* 2010;169(1):154–61.
24. Renschmidt C, Kaufmann AM, Hagemann I, Vartazarova E, Wichmann O, Deléré Y. Risk Factors for Cervical Human Papillomavirus Infection and High-Grade Intraepithelial Lesion in Women Aged 20 to 31 Years in Germany. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23(3):519–26.
25. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-

- grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer*. 2013;108(1):234–9.
26. Schiff M, Miller J, Masuk M, van Asselt King L, Altobelli KK, Wheeler CM, et al. Contraceptive and reproductive risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in American Indian women. *Int J Epidemiol*. 2000;29(6):983–90.
 27. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 (SUPPL. 3).
 28. Meeuwis KAP, Hilbrands LB, Inthout J, Slangen BFM, Hendriks IMP, Hinten F, et al. Cervicovaginal HPV Infection in Female Renal Transplant Recipients: An Observational, Self-Sampling Based, Cohort Study. *American Journal of Transplantation* 2015; 15: 723–733
 29. Bosch FX, de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007;23(4):213–27.
 30. Ronco G, Franceschi S, Segnan N. HPV16 and HPV18 genotyping in cervical cancer screening. Vol. 12, *The Lancet Oncology*. 2011; 12 (9):831–2.
 31. Jones RW. The natural history of cervical and vulvar intraepithelial neoplasia. Vol. 202, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2010. p. 139–44.
 32. Schiffman M. Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer*. 2007 Jun 25;111(3):145–53.
 33. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, 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(9916):524–32.
 34. Kjaer SK, Bautista OM, Chan ISF, Chen J, Gesser R, Moeller E, et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. 2015;711–23.
 35. Yang DY, Bracken K. Update on the new 9-valent vaccine for human papillomavirus prevention. *Can Fam physician Médecin Fam Can*. 2016;62(5):399–402.
 36. Ficha técnica. Anexo i ficha técnica o resumen de las características del producto 1. 2014;1–41.
 37. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol [Internet]*. 2009;45 Suppl 1:S3–12.
 38. Delgado D, Marín JM, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios JL, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(5):230–5.

39. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen a M, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796–802.
40. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. Vol. 1, Papillomavirus Research. 2015. p. 22–31.
41. Peto PJ, Gilham PC, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet.* 2004;364(9430):249–56.
42. Torné Bladé A, Saladrígues M del P, Gimferrer MC, Quitllet FA, Ortiz DA, Piqué XC, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Progresos de Obstetricia y Ginecología.* 2014;57:1-53
43. Verdoodt F, Szarewski A, Halfon P, Cuschieri K, Arbyn M. Triage of women with minor abnormal cervical cytology: Meta-analysis of the accuracy of an assay targeting messenger ribonucleic acid of 5 high-risk human papillomavirus types. *Cancer Cytopathology.* 2013;121: 675–87.
44. Arbyn M, Buntinx F, Ranst M V., Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic Versus Cytologic Triage of Women With Equivocal Pap Smears: A Meta-analysis of the Accuracy To Detect High-Grade Intraepithelial Neoplasia. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):280–93.
45. Day N. Cribado de vph Guía provisional sobre el uso del test de VPH en combinación con la citología en el cribado cervical primario. HPV today, Newsletter on Human. Abril 2005. www.hpvtoday.com
46. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(5):271–81.
47. Pelea C. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Española Patol [Internet].* 2003;36(321):5–10.
48. Strander B, Andersson-Ellström A, Milsom I, Rådberg T, Ryd W. Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program : a prospective randomized study. *Cancer.* 2007;111(5):285–91.
49. Zaragoza J. Capítulo 2 Introducción a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC)(en español). *Cancer, Int Agency Res [Internet].* 2010;1312(321):13–9.
50. 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 [Internet].* 2012;120(1):166–72.
51. Del Pino M, Rodríguez-Carunchio L, Alonso I, Torné A, Rodríguez A, Fusté P, et al. Clinical,

- colposcopic and pathological characteristics of cervical and vaginal high-grade lesions negative for HPV by Hybrid Capture 2. *Gynecol Oncol*. 2011;122(3):515–20.
52. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32 (1): S16-24
 53. Ostör a G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 1993;12(2):186–92.
 54. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *Obstet Gynecol Surv [Internet]*. 1999;54(6):375–7.
 55. Melnikow J, Nuovo J, Willan a R, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998;92(4 Pt 2):727–35.
 56. McAllum B, Sykes PHH, Sadler L, MacNab H, Simcock BJ, Mekhail AK. Is the treatment of CIN 2 always necessary in women under 25 years old? *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(5).
 57. Serati M, Uccella S, Laterza RM, Salvatore S, Beretta P, Riva C, et al. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(12):1296–300.
 58. Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Cook E, Whittaker L, Rhodes-Morris H, Silva E. A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1998 Nov;92(5):737–44.
 59. Gosvig CF, Huusom LD, Andersen KK, Iftner A, Cederkvist L, Svare E, et al. Persistence and reappearance of high-risk human papillomavirus after conization. *Gynecol Oncol [Internet]*. 2013 Dec;131(3):661–6.
 60. Park J-Y, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park S-Y, Seo S-S. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol*. 2008 Mar;108(3):549–54.
 61. Paraskevaidis E, Koliopoulos G, Alamanos Y, Malamou-Mitsi V, Lolis ED, Kitchener HC. Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol [Internet]*. 2001;98(5 Pt 1):833–6.
 62. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol [Internet]*. 2009;113(1):18–25.
 63. Arbyn M, Roelens J, Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PP, et al. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013. Issue 3. <http://www.thecochranelibrary.com>

64. Guyot A, Karim S, Kyi MS, Fox J. Evaluation of adjunctive HPV testing by Hybrid Capture II in women with minor cytological abnormalities for the diagnosis of CIN2/3 and cost comparison with colposcopy. *BMC Infect Dis [Internet]*. 2003;3:23-30
65. Tao K, Yang J, Yang H, Guo Z, Hu Y, Tan Z, et al. Comparative Study of the Cervista and Hybrid Capture 2 Methods in Detecting High-Risk Human Papillomavirus in Cervical Lesions. 42(3):213–7.
66. Mateos Lindemann ML, Rodriguez Dominguez MJ, Chacón De Antonio J, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, et al. Analytical comparison of the cobas HPV test with hybrid capture 2 for the detection of high-risk HPV genotypes. *J Mol Diagnostics*. 2012;14(1):65–70.
67. Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonego J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol*. 2009;45(SUPPL. 1):S5-61
68. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of Human Papillomavirus-Based and Other Novel Options for Cervical Cancer Screening in Developed and Developing Countries. *Vaccine*. 2008;26(SUPPL. 10):29–41.
69. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev [Internet]*. 2009 May [cited 2014 Mar 21];35(3):210–20.
70. Carozzi F, Confortini M, Palma PD, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2008;9(10):937–45.
71. Ficha técnica. *Diagnostics R. CINtec® PLUS Cytology Kit - Package Insert*. 2016:1–7.
72. Tsoumpou I, Valasoulis G, Founta C, Kyrgiou M, Nasioutziki M, Daponte A, et al. High-risk human papillomavirus DNA test and p16INK4a in the triage of LSIL: A prospective diagnostic study. *Gynecol Oncol*. 2011;121(1):49–53.
73. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. P16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol*. 2011;119(3):158–66.
74. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(20):1550–7.
75. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus

- genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(5):1157–64.
76. Gómez DT, Santos JL. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer : Pathogenesis and Epidemiology. *Appl Microbiol.* 2007;680–8.
 77. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012;126(2):198–202.
 78. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 2003: 946–9.
 79. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(14):1066–71.
 80. Mazarico E. Gynecologic Oncology Prevalence of infection by different genotypes of human papillomavirus in women with cervical pathology. *Gynecol Oncol.* 2012;125(1):181–5.
 81. Castle PE, Shaber R, LaMere BJ, Kinney W, Fetterma B, Poitras N, et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical precancer and cancer at Kaiser Permanente Northern California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(5):946–53.
 82. Wheeler CM, Hunt WC, Cuzick J, Langsfeld E, Pearse A, Montoya GD, et al. A population-based study of human papillomavirus genotype prevalence in the United States: Baseline measures prior to mass human papillomavirus vaccination. *Int J Cancer.* 2013;132(1):198–207.
 83. Otero-Motta AP, Ordóñez J luis, González-Celador R, Rivas B, García Macías MDC, Bullón A, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *Apmis.* 2011;119(3):204–15.
 84. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect [Internet].* 2011;17(6):941–6.
 85. Dal Bello, Spinillo A. Cervical Infections by Multiple Human Papillomavirus (HPV) Genotypes: Prevalence and Impact on the Risk of Precancerous Epithelial Lesions. *J Med Virol.* 2009;81:703–12.
 86. Luu HN, Dahlstrom KR, Mullen PD, VonVille HM, Scheurer ME. Comparison of the accuracy of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction in detecting clinically important cervical dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2013 Jun;2(3):367–90.
 87. Loghavi S, Walts AE, Bose S. CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap

- smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(7):582–7.
88. Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K, et al. Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(1):134–42.
 89. Bansal N, Wright JD, Cohen CJ, Herzog TJ. Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions. *Anticancer Res*. 2008;28(3 B):1763–6.
 90. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia: An Argument for Intermediate Endpoint Biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(7):619–26.
 91. Santos C, Muñoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Alvarez M, et al. HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer*. 2001;85(7):966–71.
 92. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer [Internet]*. 2013;108(1):234–9.
 93. Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(2):337–42.
 94. Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, Saikku P, Leinonen M, Carter JJ, et al. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer*. 2007;120(3):650–5.
 95. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr [Internet]*. 2003;(31):20–8.
 96. Castellsagué X, Díaz M, Vaccarella S, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, et al. Intrauterine device use, cervical infection with human papillomavirus, and risk of cervical cancer: A pooled analysis of 26 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1023–31.
 97. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: Pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003;14(9):805–14.
 98. Krüger-Kjær S, Van den Brule AJC, Svare EI, Engholm G, Sherman ME, Poll PA, et al. Different risk factor patterns for high-grade and low-grade intraepithelial lesions on the cervix among HPV-

- positive and HPV-negative young women. *Int J Cancer*. 1998;76(5):613–9.
99. Rachel Skinner S, Wheeler CM, Romanowski B, Castellsagué X, Lazcano-Ponce E, Rowena Del Rosario-Raymundo M, et al. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study. *Int J Cancer*. 2016;138(10):2428–38.
 100. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *Journal of Adolescent Health*. 2005; 37; S3-S9
 101. McCredie MRE, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008 May;9(5):425–34.
 102. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research*. 2002; 89 (2):191–9.
 103. Ciavattini A, Clemente N, Tsiroglou D, Sopracordevole F, Serri M, Delli Carpini G, et al. Follow up in women with biopsy diagnosis of cervical low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL): how long should it be? *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(4):997–1003.
 104. Simoes RB, Campaner A B. Post-cervical conization outcomes in patients with high-grade intraepithelial lesions. *Apmis*. 2013;121(12):1153–61.
 105. Jensen KE, Schmiedel S, Frederiksen K, Norrild B, Iftner T, Kjær SK. Risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in relation to smoking among women with persistent human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(11):1949–55.
 106. Mcintyre-seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM, Group A. Smoking Is a Risk Factor for Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 among Oncogenic Human Papillomavirus DNA – Positive Women with Equivocal or Mildly Abnormal Cytology. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev*. 2005;14(5):1165–71.
 107. Nakamura Y, Matsumoto K, Satoh T, Nishide K, Nozue A, Shimabukuro K, et al. HPV genotyping for triage of women with abnormal cervical cancer screening results: a multicenter prospective study. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(5):974–81.
 108. Vicus D, Sutradhar R, Lu Y, Elit L, Kupets R, Paszat L. The association between cervical cancer screening and mortality from cervical cancer: A population based case-control study. *Gynecol Oncol*. 2014;133(2):167–71.
 109. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, Von Knebel Doeberitz M. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: Use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify

- patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*. 2007;111(1):58–66.
110. Budal EB, Haugland HK, Skar R, Maehle BO, Bjørge T, Vintermyr OK. HPV DNA testing improves CIN2+ risk stratification and detection of CIN2+ in delayed triage of ASCUS and LSIL. A population-based follow-up study from Western Norway. *Cancer Med*. 2014;3(1):182–9.
 111. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: A subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*. 2011;12(9):880–90.
 112. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: Triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: An update of pooled evidence. *Gynecologic Oncology*. 2005;99:(3 SUPPL1): S7-S11.
 113. Quint KD, de Koning MNC, Quint WG V, Pirog EC. Progression of cervical low grade squamous intraepithelial lesions: in search of prognostic biomarkers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* . 2013 Oct;170(2):501–6.
 114. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, et al. Five-year risks of CIN 2+ and CIN 3+ among women with HPV-positive and HPV-negative LSIL Pap results. *J Low Genit Tract Dis [Internet]*. 2013;17(5 Suppl 1):S43-9.
 115. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, et al. Prospective Evaluation of p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology for Managing Women With Abnormal Papanicolaou Cytology: PALMS Study Results. *Cancer Cytopathol*. 2015;1–9.
 116. Paluszkiwicz A, Pruski D, Iwaniec K, Krdzia W. Comparison of the diagnostic value of cervical cytology and HPV HR DNA testing for the diagnosis of low-grade and high-grade squamous intraepithelial lesions across different age groups. *Ginekol Pol*. 2017;88(3):141–6.
 117. Tropé A, Sjøborg KD, Nygård M, Røysland K, Campbell S, Alfsen GC, et al. Cytology and human papillomavirus testing 6 to 12 months after ASCUS or LSIL cytology in organized screening to predict high-grade cervical neoplasia between screening rounds. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1927–35.
 118. Clavel C, Cucherousset J, Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, Nazeyrollas P, et al. Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions. *Br J Cancer*. 2004;(90):1803–8.
 119. Rodríguez-Carunchio L, Soveral I, Steenberg RDM, Torné A, Martínez S, Fusté P, et al. HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: A distinct type of cervical cancer with poor prognosis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2015;122(1):119–27.

120. Ye J, Cheng B, Cheng Y-F, Yao Y-L, Xie X, Lu W-G, et al. Prognostic value of human papillomavirus 16/18 genotyping in low-grade cervical lesions preceded by mildly abnormal cytology. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed Biotechnol)*. 2017;18(3):249–55.
121. Elfström KM, Smelov V, Johansson AL V, Eklund C, Naucler P, Arnheim-Dahlström L, et al. Long-term HPV type-specific risks for ASCUS and LSIL: a 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial. *Int J Cancer*. 2015;136(2):350–9.
122. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Hansson BG, et al. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: A population-based prospective study. *Br J Cancer* [Internet]. 2007;97(1):129–32.
123. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: A prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2011;128(12):2898–910.
124. Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, Castle PE. Human Papillomavirus Genotypes and the Cumulative 2-Year Risk of Cervical Precancer. *J Infect Dis*. 2006;194(9):1291–9.
125. Monsonego J, Cox JT, Behrens C, Sandri M, Franco EL, Yap PS, et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: Data from the ATHENA trial. *Gynecol Oncol* 2015;137(1):47–54.
126. Jaisamrarn U, Castellsagué X, Garland SM, Naud P, Palmroth J, Del Rosario-Raymundo MR, et al. Natural history of progression of HPV infection to cervical lesion or clearance: Analysis of the control arm of the large, randomised PATRICIA study. *PLoS One*. 2013;8(11):1–15.
127. Khan M, Castel P et al. The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice *J Natl Cancer Inst* (2005) 97 (14): 1072-1079.
128. Sung YE, Ki EY, Lee YS, Hur SY, Lee A, Park JS. Can human papillomavirus (HPV) genotyping classify non-16 / 18 high-risk HPV infection by risk stratification? *J Gynecol Oncol*. 2016;27(6):1–10.
129. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman MS, Scott DR, et al. The elevated 10-Year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(14):1072–9.
130. Wheeler CM, Hunt WC, Cuzick J, Langsfeld E, Robertson M, Castle PE. The influence of type-specific human papillomavirus infections on the detection of cervical precancer and cancer: A population-based study of opportunistic cervical screening in the United States. *Int J Cancer*.

- 2014;135(3):624–34.
131. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis.* 2014;209(6):855–64.
 132. Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, Van De Sandt M, Doorbar J, et al. One virus, one lesion - Individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol.* 2012;227(1):62–71.
 133. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 2009;12(5–6):281–90.
 134. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodríguez-Carunchio L, Torné A, Del Pino M. Usefulness of p16/ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathology.* March 2014; 227–35.
 135. White C, Bakhiet S, Bates M, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, et al. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology.* 2016;27(4):269–76.
 136. Solares C, Velasco J, Álvarez-Ruiz E, González-Fernández L, Encinas AI, Astudillo A, et al. Expression of p16/Ki-67 in ASC-US/LSIL or normal cytology with presence of oncogenic HPV DNA. *Anticancer Res.* 2015;35(11):6291–5.
 137. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res [Internet].* 2008 Jan 1 [cited 2014 Mar 21];68(1):307–13.
 138. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(6):373–81.
 139. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012;18(15):4154–62.
 140. Ikenberg H, Angeloni C, Bergeron C, Dachez R, Griesser H, Tintore LP, et al. p16/Ki-67 Dual-stained cytology in screening for cervical disease: Results from the PALMS Trial in over 27,000 women. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;Conference(Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, DGGG):Gesellschaft-S13.
 141. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, Van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, et al. Triage of HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and

- longitudinal data. *Int J Cancer*. 2015;136(10):2361–8.
142. Wright TC, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*. 2017;144(1):51–6.
143. Koo YJ, Hahn HS, Lee IH, Lim KT, Lee KH, Kim HS, et al. Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion. *Virchows Arch*. 2013;463(5):689–96.
144. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1995;87(11):796–802.

10. ANNEXES



CONSENTIMENT INFORMAT PER PARTICIPAR EN UN ESTUDI D'INVESTIGACIÓ MÈDICA

Títol del protocol: Marcadors moleculars com a factors de persistència i evolució de les displàsies cervicals de baix grau

Investigador principal: Carla Lecumberri Estruch

Seu on es realitzarà l'estudi: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. ASSIR Badalona-St. Adrià del Besós

Nom del pacient.....

A vostè se l'està convidant a participar en aquest estudi d'investigació mèdica. Abans de decidir si participa o no, ha de conèixer i comprendre cadascun dels següents apartats.

Aquest procés es coneix com a consentiment informat. S'ha de sentir en absoluta llibertat per preguntar sobre qualsevol aspecte que la pugui ajudar a solucionar els seus possibles dubtes.

Una vegada hagi comprès l'estudi i si vostè decideix participar, es demanarà que signi un exemplar d'aquest consentiment, de la qual se li entregarà una còpia signada i datada.

- JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

Les infeccions de VPH són molt prevalents en el nostre medi, amb una prevalença d'infecció en dones joves de fins al 80%. Segons la literatura, aproximadament un 20% de les portadores presentaran una lesió de baix grau i només un 15% de les lesions evolucionaran a displàsia d'alt grau, mentre que les altres faran una eliminació del virus o bé persistiran en el temps.

Sabem que les infeccions persistents per virus d'alt risc oncogènic són necessàries per tal de desenvolupar malaltia, però no sabem exactament quins són els factors que determinen aquesta persistència. Sembla que és multifactorial.

L'objectiu d'aquest estudi és valorar si la detecció per VPH, el genotipatge del VPH i la detecció de p16/Ki-67 ens ofereixen informació pronòstica en quant a l'evolució de les lesions.

- **BENEFICIS DE L'ESTUDI**

A dia d'avui encara ens falta molta informació de les patologies del VPH. Tant vostè com totes les dones afectes o no de VPH obtindran beneficis si aconseguim determinar que si algun dels marcadors moleculars estudiats és un factor determinant de l'evolució i la progressió de la malaltia, per tal de tractar abans o no la infecció.

- **PROCEDIEMENTS DE L'ESTUDI**

En cas de participar en l'estudi es realitzaran preguntes sobre vostè, els seus hàbits i els antecedents mèdics, quirúrgics i gineco-obstètrics.

En una primera fase de l'estudi:

- Citologia
- Colposcòpia i biòpsia si s'escau
- Detecció del VPH i tipificació del VPH
- Detecció de les proteïnes p16/Ki-67

En la fase consecutiva:

- Citologia cada 6-12 mesos en funció de la citologia prèvia
- Colposcòpia cada 6 mesos i eventual biòpsia si s'escau

Els controls i tractaments als quals vostè serà sotmesa no difereixen dels procediments habituals acceptats per l'AEPC.

- **RISCOS ASSOCIATS DE L'ESTUDI**

No existeixen riscos potencials per la seva salut, essent els mateixos que podríem tenir en qualsevol consulta de patologia cervical.

- **ACLARACIONS**

- La seva decisió de participar a l'estudi és voluntària.
- No hi haurà cap conseqüència desfavorable per vostè, en cas de no acceptar la invitació
- Si decideix participar a l'estudi pot retirar-se en el moment que ho desitgi, podent informar o no de les raons de la seva decisió, la qual serà respectada en la seva integritat
- No tindrà cap despesa per participar a l'estudi
- No rebrà pagament per la participació
- En el transcurs de l'estudi, vostè podrà sol·licitar informació actualitzada sobre el mateix.

- La informació obtinguda en aquest estudi, utilitzada per a la identificació de cada pacient, serà mantinguda amb estricta confidencialitat pel grup d'investigadors.
- Si considera que no hi ha dubtes pot signar la Carta de Consentiment informat que forma part d'aquest document.

- **CARTA DE CONSENTIMENT INFORMAT**

Jo,

he llegit i comprès la informació anterior i les meves preguntes han obtingut respostes satisfactòries. He estat informada i entenc que les dades obtingudes en aquest estudi poden ser publicades o difoses amb fins científics. Accepto participar en aquest estudi d'investigació. Rebré una còpia signada i datada d'aquest consentiment.

Signatura:

Data:

Aquesta part ha de ser completada per l'investigador (o el seu representant)

Jo,.....he explicat a la pacient la naturalesa i el propòsit de la investigació. He explicat sobre els riscos i beneficis que implica la seva participació. He contestat les preguntes que se m'han formulat i he preguntat si hi havia dubtes. Accepto que he llegit i CONEC la normativitat corresponent per realitzar investigació amb éssers humans.

Una vegada conclusa la sessió de preguntes i respostes, es procedeix a signar el present document.

Signatura:

Data: