

**SOBREEXPRESIÓN DEL ARN
MENSAJERO DE LAS
ONCOPROTEÍNAS E6-E7 DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO Y
DETECCIÓN DE P16INK4a EN LA
LESIÓN ESCAMOSA
INTRAEPITELIAL DE BAJO GRADO
DE CÉRVIX UTERINO.**

**SOBREEXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LAS
ONCOPROTEÍNAS E6-E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO Y DETECCIÓN DE P16^{INK4a} EN LA LESIÓN
ESCAMOSA INTRAEPITELIAL DE BAJO GRADO DE CÉRVIX
UTERINO**

Servicio de Ginecología y Obstetricia

Servicio de Anatomía Patológica

Hospital Universitario del Mar

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

**DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRÍCIA I GINECOLOGIA I MEDICINA
PREVENTIVA**

M^a TERESA GOMEZ SUGRAÑES

ABRIL 2009

DIRECTORES: PROF. FRANCESC ALAMEDA QUITLLET

PROF. RAMON CARRERAS COLLADO

El Dr. Ramón Carreras i Collado, Professor Titular del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de Servei del Servei d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Universitari del Mar, i el Dr. Francesc Alameda i Quitllet, Professor Associat d'Anatomia Patològica i Cap de Secció de Citologia del Servei d'Anatomia Patològica del Hospital Universitari del Mar.

CERTIFIQUEN:

Que M^a Teresa Gomez Sugrañes ha realitzat sota la seva direcció el treball **“Sobreexpresión del ARN mensajero de las oncoproteínas E6-E7 del Virus del Papiloma Humano y detección de P16^{INK4a} en la lesión escamosa intraepitelial de bajo grado de cérvix uterino”**, i reuneix les condicions per ser presentada i defensada, per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

Bellaterra, Abril 2009



Prof. .Ramón Carreras Collado



Prof. Francesc Alameda Quitllet

A Lluís

A Ignasi, Miquel, Mireia

A mis padres

A mis hermanos

“Nothing in Biology makes sense
except in the light of Evolution”

“Nada tiene sentido en Biología
si no es a la luz de la Evolución”

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Ramón Carreras, por su acogida, por su orientación desde el punto de vista metodológico, por animarme en este proyecto y a su vez proporcionarme todos los recursos para poder llegar al fin de los objetivos propuestos.

Al Profesor Francesc Alameda, por su constante motivación, dirección y por ser el alma y motor del presente estudio, ya que sin su apoyo y confianza hubiese sido imposible su realización. A su vez me ha introducido en este interesante campo. Y también por su colaboración en el procesamiento de los análisis y pruebas practicadas en las citologías y en las biopsias cervicales que han sido objeto de este estudio.

Al Servicio de Anatomía Patológica de Hospital Universitario del Mar, por ayudar en las pruebas diagnósticas y de detección de lesión celular en muestras citológicas y biopsias cervicales.

Al laboratorio central de Stanford, (Invirion diagnostics), California, donde fueron enviadas las muestras congeladas para ser procesadas y donde realizaron el estudio de ARNm de las oncoproteínas E6 y E7. También a Bibiana Palau, por su asesoramiento científico en el procesamiento y elaboración del mismo.

Al Dr. Pere Fusté, por su ayuda durante el periodo inicial de la elaboración del presente estudio, tanto en la recogida de datos clínicos como en la selección de las pacientes.

Al Sr. Sergi Mojal, por su asesoramiento y colaboración en la elaboración del análisis estadístico de los resultados.

Al Profesor Josep M^a Oller, por su capacidad de interpretar y analizar los resultados obtenidos y ayudarme en el razonamiento final de los mismos.

Al Dr. Javier Del Pozo, por su experiencia, consejos, enseñanzas clínicas, ánimo y apoyo constante durante estos últimos años.

A Montse Baixauli, por estar a mi lado durante la fase inicial.

A Maria Costa, por su colaboración informática y por su capacidad de estar siempre dispuesta a ayudar.

Al Sr. Albert Castelló por ayudarme en la búsqueda bibliográfica de determinados artículos.

A todos mis compañeros de trabajos anteriores y actuales por haberme enseñado y acompañado en todo momento y siempre que ha sido preciso.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

PRÓLOGO

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades	3
1.2. VPH en la etiopatogenia del cáncer de cérvix	5
1.3. Evidencia epidemiológica en la relación causal entre VPH y CCU	6
1.4. Mecanismos de transmisión	11
1.5. Potencial oncogénico del VPH	13
1.5.1 Factores genéticos del huésped	13
1.5.2 Respuesta inmune del huésped	14
1.5.3 Factores virales	16
1.5.4 Cofactores del medio ambiente	19
1.6. Duración de la infección por VPH. Mantenimiento y resolución	23
1.7. Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado	23
1.7.1 Patogénesis	23
1.7.2 Evolución L-SIL	24
1.7.3 Diagnóstico precoz del cáncer de cérvix	26
1.7.3.1 Citología convencional	26
1.7.3.2 Citología líquida	28
1.7.3.3 Colposcopia	31
1.7.3.4 Biopsia de cérvix	35
1.8. Citopatología e Histopatología de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas	36
1. 8.1 Nomenclatura citopatológica e histopatológica	36
1.8.2 Características citológicas de las lesiones escamosas	41
1.8.3 Características histológicas de las lesiones escamosas	42

1.8.4 Características citológicas de las lesiones glandulares	43
1.8.5 Características histológicas de las lesiones glandulares	44
1.9. Detección de VPH. Secuencias genómicas	44
1.9.1 Métodos inmunohistoquímicos	46
1.9.2 Detección de ácido nucleico de VPH.	
Técnicas de biología molecular.	48
1.9.2.1 Hibridación in situ	48
1.9.2.2 Captura de Híbridos	48
1.9.2.3 Reacción en cadena de polimerasa. PCR	49
- Hibridación inversa, SPF-PCR	51
-PCR, RFLP	51
-PCR tiempo real	51
- Arrays	51
- Ensayo multiplex “luminex”	52
1.9.2.4 Secuenciación automática de ADN	53
1.9.3 Detección de lesión celular	53
1.9.3.1 Proteína p16 ^{INK4a}	54
1.9.3.2 Ki67	55
1.9.3.3 Oncoproteínas	56
1.10. Utilidad clínica del diagnóstico molecular del VPH	57
1.11. Cambios y/o avances en el tratamiento de las L-SIL	59
1.12. Posibles cambios futuros de los resultados	
positivos de la citología cervical	61
1.13. Ciclo celular del VPH. Patogénesis y oncogénesis	62
HIPÓTESIS DE TRABAJO	
2.1 Justificación del estudio.	75
2.2 Hipótesis.	77
OBJETIVOS	83
MATERIAL Y METODOS	
4.1. Diseño del estudio.	85

4.2. Citología líquida.	86
4.3 Tipificación del VPH. PCR.	87
4.4 Detección de ARNm mensajero de las oncoproteínas E6/E7 del VPH.	88
4.4.1. Inmunofenotipificación/ Hibridación in situ con fluorescencia ultrasensible simultánea y citometría de flujo.	89
4.4.2. Citometría de flujo.	90
4.4.3 Análisis estadístico.	91
4.4.4 Obtención de resultados.	91
4.5 P16 INK4a. Citología líquida.	92
4.5.1. Valoración morfológica de P16 INK4a.	92
4.6 P16 INK4a. Histopatología.	94
4.7. Colposcopia.	97
4.8. Pacientes.	98
4.8.1. Criterios de inclusión.	98
4.8.2 Criterios de exclusión.	98
4.9. Variables objeto de estudio.	100
4.9.1 Variables epidemiológicas.	100
4.9.2 Determinaciones virales y técnicas de detección de lesión celular.	100
4.9.3. Variables principales objeto de estudio.	101
4.10. Análisis estadístico.	102
4.11. Plan de trabajo.	103
4.11.1 Inclusión de las pacientes en el estudio.	103
4.11.2. Seguimiento de las pacientes.	105
4.11.3. Análisis de los datos y redacción del trabajo.	105
RESULTADOS	
5.1 Estudios descriptivo de la muestra	107
5.2. Variables principales objeto de estudio.	108
5.3. Variables epidemiológicas.	109
5.4. Variables cuantificables. Determinaciones virales.	115
5.5. Cuantificación de oncoproteínas y asociación con una futura	

progresión de la lesión de bajo grado. L-SIL.	119
5.6. Tinción inmunohistoquímica P16 ^{INK4a} y asociación con una futura progresión de la lesión de bajo grado. L-SIL.	125
5.7. Regresión logística con las variables oncoproteínas y P16 ^{INK4a} con ambos sistemas de puntuación nuclear.	131
5.7.1 Regresión logística con Oncotech y Wentzensen.	131
5.7.2 Regresión logística con Oncotech y Wentzensen modificado.	135
5.8. Biopsias cervicales y conización. Tinción inmunohistoquímica P16 ^{INK4a} .	139
5.9 Correlación biopsia cervical, conización y citología con oncoproteínas, Wentzensen modificado y VPH.	144
DISCUSION	
6.1. Dificultades y procesos diagnósticos.	148
6.1.1. Selección de las pacientes.	148
6.1.2. Seguimiento de las pacientes.	150
6.1.3 Citología líquida.	152
6.1.4. Posibles variaciones de la realización de la colposcopia.	153
6.1.5. PCR viral. ADN VPH.	154
6.1.6. Cuantificación del ARNm para las oncoproteínas E6/E7.	156
6.1.7. P16 ^{INK4a} inmunohistoquímica.	157
6.1.8. Otros marcadores.	158
6.2. Variables epidemiológicas.	160
6.3. Genotipo viral. Carga viral.	164
6.4. Oncoproteínas E6/E7 ARNm.	166
6.5. P16 ^{INK4a} . Citología líquida.	168
6.6. P16 ^{INK4a} . Biopsia cérvix y conización.	171
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFIA	185

ABREVIATURAS

ACOG: Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos

ADC: adenocarcinoma

ADN: ácido desoxiribonucleico.

AGC: células glandulares atípicas

AGC-N: células glandulares atípicas, posible neoplasia

AIS: adenocarcinoma in situ endocervical

ASC: células escamosas atípicas

ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, que no puede excluir lesión escamosa intraepitelial de alto grado

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado

A.O: anticoncepción oral

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASCCP: Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical

CC: citología convencional

CEC: carcinoma escamoso celular

CIN: neoplasia intraepitelial cervical

CIS: carcinoma in situ

DIU: dispositivo intrauterino

ETS: enfermedad de transmisión sexual

EV: epidermodisplasia verruciforme

FDA: Food Drug Administration

FIGO: International Federation of Gynecology&Obstetrics

HC2: Hybrid Capture 2

H-SIL: lesión cervical intraepitelial de alto grado

IARC: International Agency for Research on cancer

IC: intervalo de confianza

Ig G: inmunoglobulina G

I.L.E: interrupción legal de embarazo

IMC: índice de masa corporal

L-SIL: lesión cervical intraepitelial de bajo grado

LLETZ: escisión de la zona de transformación con un loop amplio

OR: odds ratio

PCR: reacción cadena polimerasa

ROC: curva de rendimiento diagnóstico (receiver operating characteristic)

R.S: relaciones sexuales

SD: desviación standard

TPPT: Thin Pap Test, citología líquida

URL: unidades relativas de luz

VIH: virus inmunodeficiencia humana

VPH: virus papiloma humano

VPH-AR: virus papiloma humano de alto riesgo

VPH-BR: virus papiloma humano bajo riesgo

VPH-X: tipo de virus papiloma humano no determinado

VSH-2: virus simple herpes 2.

WEN: puntuación nuclear de Wentzensen P16^{INK4a}

WEN MOD: puntuación nuclear de Wentzensen modificada P16^{INK4a}

ZT: zona de transformación

PRÓLOGO

“El concepto de los virus , como el de todos los agentes toxico-infecciosos ha variado con la evolución de las ciencias médicas. La antigua cuestión de si los virus son organismos vivos o complejos moleculares de sustancias químicas no es, propiamente, un problema biológico, sino un problema semántico, pues lo que conviene definir es lo que entendemos por viviente, ya que si bien no “respiran”, ni tienen un metabolismo independiente del de la célula que los alberga”. Son muchos los años que han pasado, pues este texto que escribo, pertenece a un libro que data del año 1930 (1) .

Si profundizamos en la historia de los virus, cuando más se avanzó y más estudios se publicaron fue durante la década de 1950 a 1960.

Un virus (de la palabra latina *virus*, toxina o veneno) es una entidad biológica que para replicarse necesita de una célula huésped.

Aunque el conocimiento de los “ virus filtrables “ es ya antiguo , de finales del siglo XIX, el aislamiento de una proteína cristalina identificada como virus del mosaico del tabaco (VMT=TMV o “tobacco mosaic virus”) data del año 1935 (2), y se descubre que está compuesto en su mayor parte de proteínas (3,4).

La clásica pregunta de si los virus son o no son organismos vivos, aún continúa. Algunos biólogos consideran que no están vivos, ya que a diferencia de la mayoría de los organismos, los virus no tienen células. Sin embargo, tienen genes y evolucionan por selección natural. En cambio otros los describen como organismos en el borde de la vida. Esta posición de los virus entre la vida y la no vida plantea a los científicos la cuestión de su origen (5), la cual no se puede responder a través de un único mecanismo.

Los métodos más utilizados para hipotetizar su origen son las técnicas moleculares (6), y las dos principales hipótesis que existen en la actualidad son: por un lado los virus serían los primeros seres, en la historia de la evolución de lo inerte a lo vivo y que lograron conseguir con eficacia las funciones de replicación, transcripción y traducción, por lo que serían los organismos menos evolucionados (7). Por otro lado, el hecho de que los virus solamente puedan realizar esas tres funciones vitales en el interior de células vivas, lleva a pensar que los virus no pudieron existir antes de que aparecieran las primeras células, por muy simples que éstas fueran. Independientemente de la historia de los virus en general , de su origen y de su descubrimiento, cuando ya se concretiza en cada tipo determinado de virus y

buscamos en profundidad la historia del virus papiloma humano (VPH), se puede observar y apreciar que el conocimiento de este virus en concreto, que es el que actualmente nos preocupa, nos interesa y está en ininterrumpida investigación, ha supuesto y continúa siendo un reto y un avance muy importante en la prevención del cáncer de cuello de útero a nivel mundial.

Este descubrimiento se debe en gran parte a los estudios del médico e investigador Alemán, el Dr. Herald Zur Hausen, quién justamente en la década de los años 70 postuló que el virus del HPV era el responsable del cáncer de cuello uterino y que lo sugirió como hipótesis en el año 1976.

En 1983 identificó que el 70 % de los casos de este cáncer eran producidos por los tipos 16 y 18 del virus, al demostrar que ciertos tipos de genomas del ADN del VPH, que hoy en día conocemos como tipos “oncogénicos” o “de riesgo elevado” están asociados a anomalías de cérvix premalignas y cancerosas (8). Finalmente logró el reconocimiento de la comunidad científica por su gran aporte a la ciencia con el premio Nobel de Medicina 2008 .

Como es de suponer, el conocimiento del virus papiloma humano (VPH) como causa del cáncer de cuello uterino, dio lugar a una enorme cantidad de investigaciones. A lo largo de estos treinta años, se ha evolucionado desde la identificación de este agente etiológico, se sigue avanzando la investigación para el aislamiento de otros marcadores oncogénicos más específicos que el virus papiloma humano, así como para descubrir otros métodos de exploración del cérvix como por ejemplo la utilización de variaciones espectrales de cromóforos tisulares, y se ha llegado incluso hasta la aplicación de una vacuna, hecho que representa un cambio de paradigma en la prevención de dicho cáncer.

No sólo esto, si no que el conocimiento del virus, las investigaciones sobre su historia natural, el entendimiento de su modelo de oncogénesis, ha ayudado a mejorar la prevención, a plantear nuevas estrategias de cribado y a lograr cambios en las indicaciones del tratamiento. Además gradualmente se han cambiado, o en un futuro, se irán reemplazando los modelos morfológicos antiguos de diagnóstico, basados únicamente en la citología y la histología.

Si todos estos conocimientos junto a las nuevas tecnologías se aplican ampliamente y de manera clínicamente validada y consensuada se puede lograr una marcada disminución del cáncer de cérvix, con toda la morbilidad y mortalidad asociada que conlleva, incluso sería ideal que se llegara a aplicar en lugares o países con menos recursos.

INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El cáncer de cuello de útero es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo y suele afectar a pacientes con una edad inferior a la de otros tipos de cáncer. (9). La infección persistente por genotipos del virus papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico, es la principal causa de carcinogénesis en el cuello uterino.

El virus papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *papillomaviridae* y se encuentra ampliamente distribuido por la naturaleza. Aunque los papilomavirus se hallan en una gran variedad de especies animales, los VPH son específicos de la especie humana. Son unos virus pequeños, de aproximadamente 55 nm, sin envoltura externa que contiene ADN circular de doble hebra como material genético de aproximadamente 7.900 pares de bases, envuelta por una cápside proteica icosaédrica, que tiene un especial tropismo para infectar el epitelio cutáneo y mucoso dando lugar a lesiones benignas y malignas. Existen aproximadamente más de 120 genotipos de virus diferentes, se ha completado la secuencia de los genomas de más de 80 y entre ellos aproximadamente una tercera parte infectan las células del epitelio ano-genital, produciendo lesiones diversas como condilomas, lesiones intraepiteliales del epitelio escamoso, carcinoma in situ y carcinoma invasivo (10).

Los tipos de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), se asocian a enfermedades malignas del aparato genital y contribuyen al desarrollo del carcinoma de cuello uterino (11).

Si bien hace más de cien años que ya se establecieron relaciones causales epidemiológicas entre el cáncer de cérvix y las conductas sexuales de riesgo, fue a principios de los ochenta que se descubrió la asociación entre el VPH y el cáncer de cérvix (8). Posteriormente múltiples estudios han identificado el ADN virus papiloma humano en más del 95% de todas las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino (12). Actualmente se considera que el VPH es la causa de prácticamente el 100% de los cánceres de cuello uterino, escamosos o glandulares y que no hay posibilidad de desarrollo en ausencia de VPH. (13). Además se relaciona causalmente con el 90% de los cánceres del canal anal, con el 40% de los cánceres de vulva y pene y con el 12% de los

orofaríngeos. Se está investigando su relación con otro tipo de cánceres (de piel no melánicos, subungueal, retinoblastoma) (14).

La infección por VPH del epitelio ano-genital es una de las enfermedades de transmisión sexual más prevalente en personas sexualmente activas y es el virus que más frecuentemente se transmite por esta vía. Más de dos tercios de los adultos jóvenes adquieren el VPH durante los dos primeros años de actividad sexual (15), la mayor parte de las infecciones son transitorias y asintomáticas (16) desapareciendo aproximadamente entre 12 y 18 meses con un aclaramiento total del virus en el transcurso de 24 meses.

Las infecciones por VPH de la mucosa cervical se clasifican como latentes (asintomáticas o transitorias), subclínicas o clínicas.

Estas infecciones latentes, que son la mayoría, sólo se detectan con test específicos de detección viral. Los análisis virológicos parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por el VPH precede a la remisión de los cambios citológicos (17).

Las lesiones clínicas son aparentes y suelen ser verrugas genitales, lesiones benignas conocidas como condilomas y son causadas por los VPH de bajo riesgo oncogénico (los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) en particular los genotipos 6 y 11 son los causantes de más del 90 % de los condilomas acuminados, aunque no se excluyen como posibles agentes carcinógenos.

Las infecciones de cérvix uterino por VPH de alto riesgo oncogénico siguen predominantemente un curso silente, tienden a establecer infecciones persistentes y generan alteraciones citológicas características englobadas mayoritariamente en el grupo de las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (L-SIL). Estas lesiones subclínicas se identifican con la aplicación de ácido acético a 3-5 % y la visión directa con aumento.

En una proporción menor, las infecciones por VPH de alto riesgo oncogénico pueden progresar a lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (H-SIL). La tasa de aclaramiento de la infección viral disminuye con la mayor gravedad de la lesión intraepitelial. Si esta infección es persistente, estas pacientes presentan un mayor riesgo de desarrollar posteriormente un carcinoma cervical (18), aunque esta progresión hacia la malignidad es poco frecuente, aproximadamente menos del 1% (19).

Si bien la carcinogénesis no ocurre en la mayoría de individuos afectados, el cáncer de cérvix uterino todavía supone un 6% de todas las enfermedades malignas femeninas (20) y continua siendo la segunda principal causa de muerte por cáncer en las mujeres a nivel

mundial. En los países en vías de desarrollo supone entre el 12% y 25% de todas las neoplasias (21).

Por lo tanto, es conocido y se puede confirmar que el cáncer de cuello de útero es una complicación muy poco habitual de una infección viral muy frecuente, en la que aun existen temas sin resolver y que la vía de transmisión predominantemente es por contacto sexual. Actualmente se conoce que la infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo (22).

La disponibilidad de ADN del genoma del VPH clonado molecularmente ha permitido una amplia investigación acerca de la relación entre infección de VPH y cáncer cervical, y del papel de algunos de los tipos virales de alto riesgo asociados a tumores en otras localizaciones ano-genitales y al cáncer orofaríngeo (23, 24).

El VPH es responsable de aproximadamente el 5% de todos los cánceres del mundo, más proporción que los cánceres atribuibles a otros tipos de virus. El VPH representa un importante objetivo en la prevención primaria y secundaria, en el diagnóstico y en el tratamiento del cáncer. Este hecho ha llevado a dos importantes avances clínicos: la prevención primaria a través de la vacunación del VPH y el diagnóstico a través de la detección del VPH. Estos avances representan un gran logro a largo plazo en la investigación básica del VPH (25) y en la epidemiología del cáncer cervical (26).

1.2 VPH EN LA ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER DE CÉRVIX

La naturaleza causal de la asociación entre el VPH y el cáncer de cérvix se basa en:

1. Los resultados de múltiples estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones y con diferentes diseños, que demuestran de forma coherente que las infecciones por ciertos tipos virales son el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical.
2. La detección regular de ADN de VPH de alto riesgo en las células cancerosas, en un 99.7% en una serie internacional de cánceres de cuello uterino mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de alta sensibilidad y en el 100% de los casos confirmados histológicamente (12), y más del 90% en lesiones precursoras.
3. La demostración de la expresión de las proteínas oncogénicas virales de los tipos de alto riesgo producidas por los genes E6 y E7 del VPH en el tejido neoplásico, pero no en el tejido sano.

4. La capacidad transformadora de estos oncogenes por bloqueo efectivo de las proteínas reguladoras del ciclo celular (p53, pRb).
5. La expresión mantenida de E6 y E7 como requisito indispensable para mantener el fenotipo maligno de las células cancerosas. (27).

1.3 EVIDENCIA EPIDEMIOLOGICA A FAVOR DE LA RELACIÓN CAUSAL ENTRE EL VPH Y EL CÁNCER DE CUELLO DE UTERO.

En los últimos años se han desarrollado múltiples investigaciones clínicas, epidemiológicas, virológicas y de biología molecular que han demostrado que el principal agente etiopatogénico de las lesiones precursoras y del cáncer de cuello de útero es el VPH.

La mayor serie de casos de cáncer de cérvix invasivo investigados con un protocolo estándar ha sido elaborada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) (28). En un estudio en el que participaron aproximadamente 1.000 mujeres, con cáncer de cérvix invasivo confirmado histológicamente de 22 países de todo el mundo (29). Se analizaron biopsias congeladas de los tumores en un laboratorio central para detección de ADN del VPH, utilizando un estricto control mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores PCR GP5+/6+, y se detectó ADN del VPH en el 99.7% de los tumores, incluso en aquellos casos inicialmente VPH negativos, llegando a la conclusión que la presencia de infección por VPH es una causa necesaria para el desarrollo de un cáncer de cuello de útero (12).

En 1995, el grupo de trabajo del Programa de Monografías de la IARC concluyó que existía evidencia suficiente para confirmar la carcinogenicidad de los VPH 31 y 33 (30).

La distribución de los tipos de VPH ha sido publicada en un análisis combinado de 12 estudios llevados a cabo en 25 países de 3.085 casos de cáncer de cérvix incluidos en los estudios de la IARC (29). Los quince tipos del VPH más comunes detectados en ambas series, en orden de frecuencia decreciente, fueron los VPHs 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73 y 82 siendo éstos responsables de aproximadamente el 89% de todos los casos de cáncer de cuello uterino en el mundo.

En un exhaustivo meta-análisis de 85 estudios publicados hasta febrero de 2002 (incluyendo la serie mencionada anteriormente de la IARC) se incluyeron 10.058 casos de cáncer de cérvix (31), los tipos de VPH identificados con más frecuencia han sido, en

orden de prevalencia decreciente, los VPHs 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 56, 51, 39, 6, 73, 68 y 82. Este meta-análisis fue posteriormente actualizado incluyéndose más de 14.500 casos de estudios publicados hasta enero de 2006 (32).

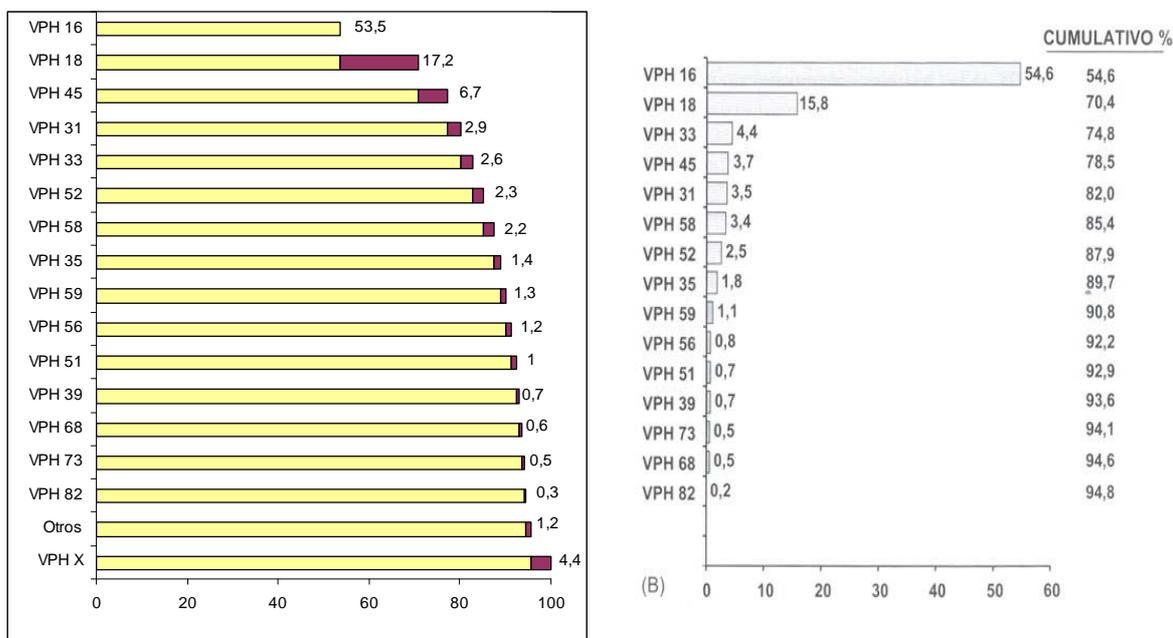


Figura 1. Porcentaje de casos de cáncer de cuello uterino atribuidos a los tipos del VPH más frecuentes en todas las regiones del mundo combinadas, estimado a partir de : (A) el análisis combinado de la IARC con 3.085 casos y (B) el meta-análisis con más de 14.500 casos. (Clifford 2006) (33).

Los VPHs 16 y 18 son responsables del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino a nivel mundial y los ocho tipos más comunes (VPH s 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 y 35) son responsables del 90% de los casos. Por lo tanto se obtienen hallazgos altamente consistentes si se compara el análisis combinado de la IARC con el meta-análisis. (figura 1)

La figura 2 muestra la prevalencia, según un meta-análisis, de los tipos más comunes del VPH en el cáncer cervical en cada zona geográfica y a nivel mundial (33). En todas las regiones se identifica a los mismos 8 tipos del VPH (VPHs 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) como los más frecuentes, con la leve excepción de que en Europa el VPH 56 ocupa el octavo puesto en lugar del VPH 52. La prevalencia del VPH 16 varía del 52% en Asia al 58% en Europa y la prevalencia del VPH 18 varía del 13% en América Latina al 22% en

Norteamérica. La importancia relativa de los tipos del VPH 31, 33, 35, 45, 52 y 58 varían ligeramente en función de la región, con especial prevalencia del VPH 58 en Asia.

Este meta-análisis también mostró que la distribución de los tipos del VPH varía significativamente entre el carcinoma escamoso celular (CEC) y el adenocarcinoma (ADC), identificándose el VPH 16 con mayor frecuencia en el CEC que en el ADC y el VPH 18 con mayor frecuencia en el ADC que en el CEC. (33,34).

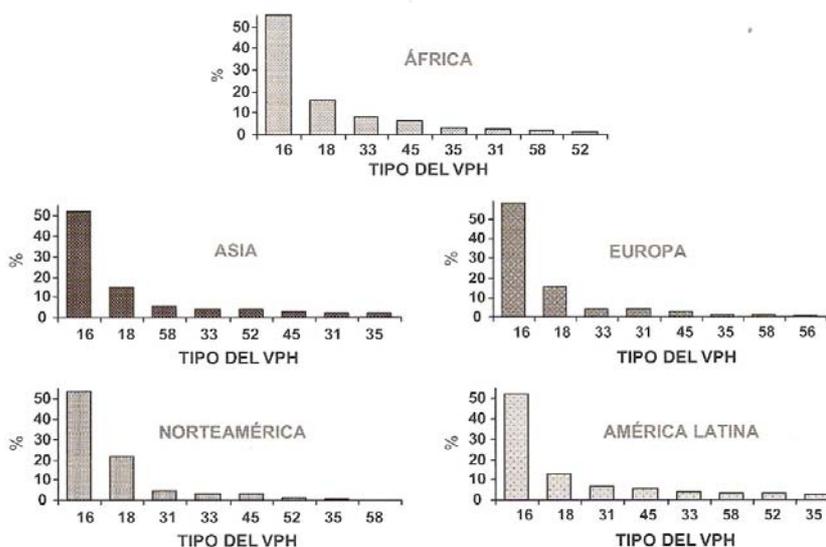


Figura 2 . Prevalencia de los ocho tipos del VPH más comunes en más de 14.500 casos de cáncer de cuello uterino, por región geográfica. (Clifford 2006) (33).

Estos estudios usan un protocolo de estudio común y métodos de PCR correctamente validados para la detección de los 33 tipos del VPH llevados a cabo en un laboratorio central. El estudio de mayor tamaño sería un análisis combinado de 11 estudios de casos y controles de cáncer de cuello de útero invasivo correspondientes a 11 países y elaborado por la IARC (35). Se calcula la prevalencia de ADN del HPV entre los casos y controles y sus correspondientes cocientes de probabilidades (*odds ratio*) para carcinoma escamoso celular (CEC) y adenocarcinoma/carcinoma adenoescamoso (ADC) del cuello de útero, respectivamente. Los tipos 16 y 18 fueron los tipos más comunes en ambos tipos histológicos pero el porcentaje de CEC atribuible a los VPH 16 y 18 fue del 70%, siendo el 86% en el caso de los ADC (36).

Desde entonces, se han finalizado al menos diez estudios más de casos y controles con diagnósticos histológicos de cáncer y pruebas de detección de ADN del VPH mediante métodos basados en la PCR que estiman el riesgo de cáncer asociado a la presencia de tipos adicionales del VPH.

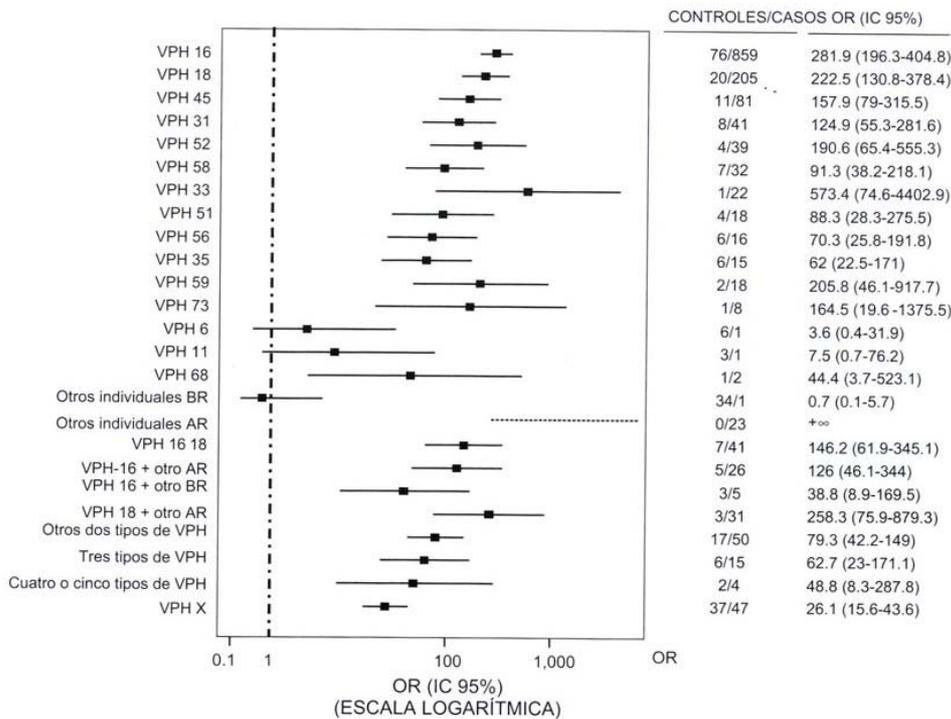


Figura 3: Odds ratio (OR) específicas por tipo de VPH e intervalos de confianza (IC) del 95% para el carcinoma de cuello de útero (escamoso celular y adenocarcinoma combinados). Los casos VPH negativos constituyeron la categoría de referencia. Los OR están ajustadas por país y grupo de edad. AR: alto riesgo; BR: bajo riesgo; VPH X: tipo de VPH no determinado. (Castellsagué , 2007) (36).

Son varios los estudios prospectivos que demuestran un riesgo mayor de desarrollo de CIN-III en las mujeres positivas para ADN del VPH, que las mujeres con resultados negativos para ADN del HPV, pero sólo este dato no es suficiente para conocer y discriminar entre los casos que remitirán espontáneamente o progresarán.

Pocos estudios han evaluado el riesgo tipo-específico de desarrollar CIN-2/3, aunque en todos ellos se ha comunicado de forma consistente un riesgo aumentado para CIN-2/3 asociado con la detección basal de VPH 16. Además, algunos de estos estudios han informado de un riesgo aumentado asociado con la presencia del VPH 18 y de otros tipos relacionados filogenéticamente con los VPH 16 y 18.

Estudios de caso-control en los que se han examinado citologías antiguas de mujeres con cáncer actual de cuello de útero invasivo y de mujeres sin cáncer, han demostrado una prevalencia mayor de ADN del VPH 16 en las citologías de las mujeres que desarrollaron posteriormente cáncer de cuello de útero que en las citologías de las mujeres control sin cáncer de cuello (28).

En esta monografía de la IARC, se concluye que hay suficiente evidencia epidemiológica a favor de la función carcinogénica de los VPH 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 y 66 en el desarrollo del cáncer de cuello de útero en humanos. Se ha establecido una clasificación de bajo riesgo y de alto riesgo con evidencia establecida o probable.

Tabla1: Riesgo alto establecido o tipos oncogénicos

Grupo	TIPOS DE VPH
Tipos de alto riesgo (evidencia establecida)	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59
Tipos de alto riesgo (evidencia probable)	26,53,66,68,73,82
Tipos de bajo riesgo (evidencia establecida)	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81,CP6108

Tipos del VPH cuyas *odds ratio* (OR) altas se basaron en 10 o más casos de cáncer de cuello de útero para el tipo analizado.

Riesgo alto probable o tipos oncogénicos: tipos del VPH cuyas OR altas se basaron en 9 o menos casos de cáncer de cuello de útero positivos para el tipo analizado.

Riesgo bajo establecido: tipos del VPH con OR moderadamente elevadas pero con el límite inferior de sus intervalos de confianza del 95% por debajo de 1 o aquellos del VPH que sólo se detectaron en las mujeres control y no en las mujeres con cáncer de cuello de útero. (Castellsagué 2007) (36).

La persistencia del VPH 16 o 18 se asocia estrechamente con un riesgo elevado de lesión pre-cancerosa. Sin embargo en cohortes prospectivas con seguimiento minucioso e intensivo, se están documentando rápidos desarrollos a CIN-2 y CIN-3, a veces pocos meses después de la infección incidente. Se desconoce el significado biológico de estos diagnósticos “tempranos” de CIN-3.

En resumen, existen numerosos estudios epidemiológicos que proporcionan pruebas sólidas y permiten concluir que ciertos tipos de VPH son la causa principal y necesaria del desarrollo del cáncer de cuello de útero.

1.4 MECANISMOS DE TRANSMISION

El VPH ano-genital se transmite por vía sexual principalmente por contacto directo piel y mucosa, es el virus que más frecuentemente se transmite por esta vía, con un especial tropismo para infectar el epitelio cutáneo y mucoso (37).

La probabilidad de infección por acto sexual no es conocida, no se han publicado datos empíricos referentes al grado de transmisibilidad, pero es claramente elevada y se conoce diferencia entre los diferentes tipos de VPH. Un estudio de simulación estocástica por ordenador investigó valores de transmisión del VPH coincidentes con la incidencia observada entre estudiantes universitarias (38) en que la probabilidad de transmisión del VPH por cada acto sexual oscilaba entre el 5 y el 100%, con una mediana del 40%. Otro estudio similar (39) estimaron utilizando datos finlandeses de seroprevalencia que la probabilidad por cada nuevo compañero sexual de transmisión del hombre a la mujer es del 60% para el VPH 16. Este porcentaje es idéntico al observado en relación a la probabilidad por cada pareja nueva de transmisión de verrugas genitales (40). Estos resultados sugieren que el VPH es más transmisible que otras enfermedades de transmisión sexual víricas (ETS víricas), pero es comparable con la tasa de transmisión de las ETS bacterianas.

Debido a que existe una única y común vía de transmisión, se estima que diferentes tipos de VPH se suelen transmitir a la vez (41), resultando en una elevada proporción (20-30%) de infecciones concurrentes con diferentes tipos de virus, comprobado cuando se toman muestras en la población general (42). Los hombres se pueden infectar por diferentes tipos de VPH concomitantemente, por lo que también puede transmitirlos en un único contacto sexual.

El epitelio metaplásico del cérvix, en la unión escamoso-cilíndrica (zona de transición), es especialmente vulnerable al contagio, independientemente del tipo de VPH. En esta unión, las células basales con capacidad de replicación, son muy susceptibles a la infección vírica, ya que se encuentran en contacto con la superficie y aún se vería más favorecida la transmisión en caso de pequeñas fisuras o erosiones como vía de entrada aprovechando la dinámica celular para replicarse, y después beneficiándose de la maduración del epitelio metaplásico para expresar sus genes de forma secuencial. El virus también podría permanecer latente en las células basales del epitelio.

Muchas mujeres se infectan justo con su primera relación sexual, (43) con una mayor prevalencia en mujeres de menos de 25 años de edad, generalmente a esta edad las infecciones son transitorias y a menudo incluyen múltiples tipos de virus. En las mujeres jóvenes, el epitelio metaplásico de la zona de transformación escamo-cilíndrica es inmaduro, por lo que podría justificar el mayor riesgo de infección cuando el inicio de la actividad sexual es precoz, que a su vez se suma, mayor número de parejas y relaciones sexuales con hombres que tienen o han tenido múltiples parejas sexuales.

Los estudios transversales muestran un segundo pico de infección en mujeres mayores, a una edad próxima en la que la incidencia de cáncer de cérvix es mayor (44, 45). En concreto, este último es un estudio transversal de mujeres sexualmente activas de la población general de 15 áreas en cuatro continentes; describe curvas de VPH prevalencia específicas por edad y llama la atención un segundo pico de infección por VPH en mujeres más mayores.

Los motivos del segundo pico de infección, pueden estar influenciados por uno o varios mecanismos (46). Por ejemplo, la reactivación de infecciones previamente no detectables adquiridas a una edad más temprana causadas por una pérdida gradual de la inmunidad tipo específica ocasionada por cambios hormonales durante los años de la postmenopausia. Incluso también podría explicarse por la adquisición de infecciones nuevas a través de contactos sexuales con nuevas parejas a una edad más madura o al comportamiento sexual de sus parejas masculinas, u otra posible explicación sería la mayor exposición a factores y cofactores de riesgo.

La mucosa anal sería también susceptible de infección, por las características del epitelio, pero otras zonas como la vagina o la vulva probablemente sería necesario la existencia de mínimas erosiones en piel o mucosa para favorecer la infección.

Se considera el uso de preservativos como barrera eficaz en la transmisión del VIH. Sin embargo los datos relativos a otras enfermedades de transmisión sexual, incluyendo el VPH, son equívocos (47). Después de diferentes estudios y resultados controvertidos, se admite que si el uso es correcto y durante todo el acto es un complemento para disminuir el contagio (48). Algunos estudios han observado una asociación entre una menor persistencia y una disminución en la progresión de las lesiones intraepiteliales cervicales y el uso del preservativo. (49, 50).

También los hombres circuncidados tienen menos riesgo de infectarse y de ser transmisores, posiblemente debido a la dureza del epitelio queratinizado, por lo tanto la circuncisión masculina supondría un efecto protector en la mujer (51).

En cuanto a la infección por el VPH mediante transmisión perinatal o en niños también ocurre, ya que se ha detectado ADN del VPH y anticuerpos séricos en bebés y niños (52), aunque los datos disponibles sugieren que se trata de casos poco frecuentes y con pocas probabilidades de desencadenar una infección persistente (53).

1.5 POTENCIAL ONCOGENICO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO

El primer vínculo de unión entre infección por VPH y cáncer epitelial fue en pacientes con epidermodisplasia verruciforme (EV), éstos pacientes desarrollaban múltiples lesiones verrugosas atípicas que podían progresar a un carcinoma escamoso, especialmente en las áreas de exposición solar (54) y se catalogaron como un tipo de VPH asociados a la EV. Tras los avances en tecnología molecular, se conocen más de 100 genotipos de VPH, la mayoría de ellos producen proliferaciones benignas epiteliales (verrugas) y los tipos con riesgo oncogénico pueden inducir una transformación maligna. Han sido asociados además a cáncer de vulva, vagina, ano, pene, y algunos tipos de VPH incluso asociados a cáncer de piel, laringe y esófago.

Si bien la infección viral es la causa necesaria para el desarrollo de una lesión preinvasiva y posteriormente cáncer de cérvix, no todas las mujeres infectadas desarrollarán hacia una transformación neoplásica. Son necesarios factores exógenos, endógenos, características virales, respuesta inmune y una susceptibilidad genética, que en conjunción con la infección por VPH pueden determinar esta progresión (55).

1. Factores genéticos del huésped.
2. Respuesta inmune del huésped.
3. Factores virales.
4. Cofactores del medio ambiente en la carcinogénesis cervical.

1.5.1 Factores genéticos del huésped.

Estudios experimentales han demostrado que cambios en la transcripción del VPH están asociados a modificaciones en el ADN, que en ciertas personas serían responsables de la transformación e inmortalización celular, con alteraciones genéticas en las células transformadas por VPH. Se han documentado diferentes estudios citogenéticos, pero sólo

alguno ha localizado el loci responsable, por ejemplo se documentó una delección en el cromosoma 11, ya que en general las delecciones en esta región se asocian a una desregulación en la transcripción génica viral (56).

Es difícil el estudio de la oncogénesis, ya que por razones obvias no se puede reproducir el modelo animal en humanos. Múltiples estudios han indicado que aspectos genéticos juegan un papel en la oncogénesis, pero no está claro si la infección por VPH induce mutaciones genéticas o si algunos individuos son más susceptibles a la transformación celular inducida por VPH debido a ciertos polimorfismos genéticos. La naturaleza exacta y el mecanismo por el cual el gen del huésped produce una regulación de la expresión oncogénica del VPH y previene una inmortalización celular inducida por el VPH, permanece aún desconocido. Se han asociado algunas seleccionadas mutaciones genéticas que podrían estar asociadas con la oncogénesis, entre ellas: ácido retinóico receptor (RARA), polimorfismos de p53 (TP53), polimorfismos de interleuquina polimorfismos (IL)-10(IL10), gen metilendetetrahidrofolato reductasa (MTHFR), loci susceptibilidad EVER1 y EVER2 (TMC6 y TMC8), gen WAF1 (CDKN1A) (57), y HLA loci (58).

A pesar de que los genes del sistema HLA han sido los más extensamente investigados, se necesitan más estudios acerca de los mecanismos de estos complejos procesos que contribuyen a la asociación entre los polimorfismos de los genes del sistema HLA y la susceptibilidad de cánceres asociados al VPH (59).

1.5.2 Respuesta inmune del huésped.

El papel de la inmunidad en controlar la infección por VPH es evidente por la alta frecuencia de la misma en pacientes inmunodeprimidas post-trasplantes y en infectadas por VIH. Se considera que las pacientes inmunodeprimidas tienen un riesgo relativo 17 veces mayor de infección por VPH y nueve veces mayor para desarrollar cáncer cervical, así como aumento de la neoplasia intraepitelial anal y cáncer de ano. En ellas se ha comprobado a nivel cervical la disminución de los linfocitos CD4 y la inversión del cociente CD4/CD8, así como la disminución de los linfocitos natural killer. Esta alteración de la inmunidad local facilitaría la integración del ADN viral del VPH, con la consecuente progresión (60). Las mujeres VIH negativas presentan un aclaramiento de las infecciones cervicales por VPH de cuatro a diez veces más frecuentemente que las mujeres VIH positivas, con la tasa más baja de aclaramiento asociada a CD4 <200mm³.

(61). Sin embargo, posteriormente, sí que se ha demostrado en pacientes VIH positivas, un aumento en la prevalencia y persistencia del VPH y una disminución en el aclaramiento del mismo en función del número de CD4+ células T y de la carga viral del VIH, sí que se ha observado en todos los tipos de VPH, pero no así para el VPH 16 que es el más persistente y más altamente oncogénico. Los individuos infectados por VIH generalmente se infectan por más de un serotipo del VPH que los individuos sanos, por lo tanto habrá diferencias en el tipo de VPH y en el éxito de la respuesta inmune (62). La probabilidad de invasión no está fuertemente afectada por el VIH. Una terapia antirretroviral altamente activa no parece que afecta a la historia natural del VPH o a reducir el riesgo de lesión preinvasiva cervical o cáncer; sin embargo, la relación entre este tratamiento y el riesgo de progresión a carcinoma, probablemente es confuso porque las mujeres infectadas por el VIH bajo tratamiento antirretroviral viven más años y permiten al cérvix una más larga exposición al VPH carcinogénico en el contexto de una relativa inmunosupresión. En definitiva, las mujeres infectadas por el VIH, contraen más fácilmente la infección por los diferentes tipos VPH altamente oncogénicos y tienen un riesgo aumentado de lesiones intraepiteliales y cáncer, especialmente aquellas pacientes que no responden al tratamiento antirretroviral. (63).

Una serie que examina la prevalencia de cáncer anal, neoplasia anal intraepitelial e infección anal por VPH en pacientes después de un trasplante, observan un riesgo relativo de 10 de desarrollar un cáncer anal, indicando que la inmunosupresión asociada al trasplante es un factor de riesgo significativo. (64).

Está clara la importancia de un sistema inmunitario eficiente y está avalado por datos epidemiológicos. Sin embargo, la inmunidad del huésped en la oncogénesis del VPH es muy compleja y se están investigando numerosos mecanismos.

Existe evidencia del papel de las citoquinas, glucocorticoides, mediadas por genes de represión, así como la formación de anticuerpos contra las proteínas virales E2 y L1. Se han hecho ensayos clínicos en fase I / II, muy experimentales, con el uso potencial de una vacuna viral recombinante para tratar lesiones CIN 1-3 con eliminación de las lesiones precancerosas en 34 de las 36 mujeres que recibieron la vacuna (65). La presencia de L1 antígeno y la producción del apropiado L1 anticuerpo colabora en la supresión tumoral en una compleja interacción (66).

Existe una inmunidad sistémica contra E6 y E7 tanto para el VPH 16 como el VPH 1(67).

En cuando a su detección, la infección del VPH, produce una respuesta inmune contra la proteína mayor de la cápside (L1), creando unos anticuerpos que permanecen detectables durante varios años, y no será útil para detectar infecciones antiguas o actuales. Además se ha demostrado en diversos ensayos clínicos, que aproximadamente el 70% de niñas y jóvenes sexualmente activas menores de 26 años y con una media de dos parejas sexuales, eran positivas para el ADN viral y sin embargo serológicamente negativas, ya que aproximadamente el 50% de todos los individuos expuestos previamente a esta infección, nunca desarrollan anticuerpos.

Otro tema sería el de la infección concomitante de varios serotipos. Algunos estudios han sugerido que en caso de coinfección de un VPH tipo 6 (bajo riesgo) y un VPH tipo 16 tienen un riesgo significativamente menor de desarrollar carcinoma que una infección por únicamente el VPH tipo 16, aunque se necesitan más estudios para demostrar los posibles mecanismos de este antagonismo (68). En cambio otros autores no han encontrado relación en el caso de coinfección con otros tipos virales (69), y otros, sí que consideran una infección múltiple como un determinante importante de persistencia (70).

1.5.3 Factores virales.

- Genotipo viral.

El genotipo viral es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preinvasiva. Los VPH 16 y 18 son los que presentan el mayor riesgo de progresión. En concreto el VPH 16, presenta un riesgo absoluto de diagnóstico de precáncer cerca del 40% después de 3-5 años de una infección persistente (71, 72, 73). El riesgo total de precáncer en una mujer con más de un serotipo de VPH es mayor que otra mujer con un solo serotipo, pero sin embargo no está claro cual sería la asociación en cuanto a suma de riesgos (42). Además la mayoría de mujeres del mundo están infectadas con al menos uno o varios genotipos durante toda su vida sexual (74). La exposición total es difícil de medir porque la detección del ADN es generalmente transitoria y la serología no es exacta. Por ello, una proporción considerable de VPH ADN negativas, mujeres seronegativas, han estado sin embargo expuestas a la infección (75).

Tabla 2: Proporción de cáncer de cérvix causado por tipos de VPH (Smith 2007) (32).

Tipo de VPH	Proporción de Cáncer de cérvix	Total Acumulado
VPH 16	54.6%	54.6%
VPH18	15.8%	70.4%
VPH33	4.4%	74.8%
VPH45	3.7%	78.5%
VPH31	3.5%	82%
VPH58	3.4%	85.4%
VPH52	2.5%	87.9%
VPH35	1.8%	89.7%
VPH59	1.1%	90.8%
VPH56	0.8%	92.2%
VPH51	0.7%	92.9%
VPH39	0.7%	93.6%
VPH73	0.5%	94.1%
VPH68	0.5%	94.6%
VPH82	0.2%	94.8%
No se identifica tipo VPH.	5.2%	100%

El VPH 16 debe tener una consideración especial en los programas de prevención por las siguientes razones (76):

- VPH 16 causa la mitad de los casos de cáncer de cérvix en todo el mundo y es el principal tipo carcinogénico en casi cada país estudiado (33).
- VPH 16 es el tipo carcinogénico más común en la población general, suponiendo acerca del 20% de infecciones entre mujeres con citología normal (77), el 20% entre mujeres con lesiones equívocas, y el 26% de aquellas con anomalías leves.
- Aunque VPH 16 no es más probable que cause más anomalías citológicas que otros tipos carcinogénicos, si que desproporcionalmente causa cambios sugestivos de pre-cáncer y se contabilizan acerca del 45% de estas interpretaciones severas (78).
- Prospectivamente VPH 16 persiste una media de tiempo más prolongado que cualquier otro tipo y su persistencia está altamente asociada con pre-

cáncer. Aproximadamente 40% de mujeres con VPH 16 persistente son diagnosticadas en los siguientes 5 años de lesión precancerosa.

- VPH 16 es el principal tipo VPH que causa otros cánceres ano-genitales y oro-faríngeos, que no son lo suficiente comunes como para implantar un programa de screening, pero que se podrían prevenir con una vacuna eficaz.

El VPH 18 está asociado a una mayor proporción de adenocarcinoma, y se ha demostrado un bajo rendimiento en el screening poblacional de las lesiones endocervicales o glandulares (79). VPH 45 también se ha encontrado en una elevada proporción de cáncer y lesiones premalignas.

- Variantes del VPH.

Se han identificado variantes por la detección de pequeñas diferencias en la secuencia de bases del ADN del VPH. Son mínimas variaciones en función de la geografía, por lo que no está claro si existe una relación con polimorfismos inmunogenéticos (80). Se supone que estas variantes podrían influir en la historia natural de la infección.

- Carga viral.

La medida de la carga viral no siempre es clínicamente útil. Una carga viral elevada no implica un incremento prospectivo de riesgo, excepto para el VPH 16 (81). Se ha sugerido que una carga viral elevada indica una mayor posibilidad de integración del ADN viral en el genoma del huésped, sin embargo es discutible la utilidad de medir la carga viral

Los niveles se detectan mediante PCR en tiempo real que determina el número de copias de VPH por equivalente celular, o también por captura de híbridos II ó de segunda generación (HCII) que valora unidades relativas de luz (URL) de forma semicuantitativa, dando una idea aproximada del número total de copias virales de la muestra.

Se debe sumar además del ADN del VPH medido del epitelio cervical, la compleja suma del conjunto del número, tamaño y grado de las lesiones asociadas, por lo que el significado de la carga viral es ambiguo (82). Puede haber una carga viral muy elevada y ser atribuida a una reciente infección de lesiones menores, análogo a las verrugas benignas. En el caso de infección por los tipos de VPH 16 y 18 y citología normal, una

carga viral elevada, determinada por PCR en tiempo real, si que se asocia con mayor riesgo de progresión a CIN y cáncer (83).

La carga viral determinada por HC2 muestra en general un incremento progresivo paralelo a la progresión de la lesión (84), sin embargo debe tenerse en cuenta que una carga viral baja no es excluyente de lesión grave, un 30% de CIN 2-3 y un 46% de carcinomas invasores presentan valores de detección inferiores a 100 URL, y un 8% de los CIN 2-3 y un 15% de los carcinomas invasores presentan incluso valores inferiores a 10 URL (85).

- Integración.

La integración del genoma viral en el genoma del huésped se ha asociado con cáncer invasivo y podría llegar a ser un biomarcador importante para distinguir una lesión preinvasiva de una infección por VPH (86). Sin embargo, la integración no siempre debería ser necesaria para causar invasión, ya que no todas las mujeres con cánceres invasivos presentan una integración notable (87, 88). Se necesita una actividad transcripcional continuada de los oncogenes del VPH para mantener el cáncer (89).

1.5.4 Cofactores del medio ambiente.

La transformación maligna secundaria a factores ambientales está bien establecida y documentada para un número determinado de cánceres. Sin embargo el papel de algunos cofactores en la oncogénesis del VPH es menos clara y complicada por la falta del modelo animal para poder confirmar epidemiológicamente esta vinculación.

Algunos cofactores son factores de riesgo sólo para la adquisición del virus, entre ellos la falta de uso de preservativo durante la relación sexual, inicio precoz de relaciones sexuales, exposición a parejas sexuales de alto riesgo o promiscuas, elevado número de compañeros sexuales, poca higiene genital o la ausencia de circuncisión en el hombre (55).

Los cofactores implicados en contribuir a una transformación neoplásica incluyen:

otras enfermedades de transmisión sexual, alteraciones hormonales, obesidad, exposición a radiaciones, tabaco, dieta, multiparidad. Entre ellos los agentes con más evidencia científica para promover la oncogénesis son el tabaco, las radiaciones ionizantes, la dieta y la coinfección con otros patógenos virales o bacterianos.

- **Radiaciones ionizantes:** aunque no tenga relación con las lesiones intraepiteliales del cérvix uterino, si en concreto con la epidermodisplasia verruciforme (EV) y la papilomatosis laríngea, los rayos-X y los UV son mutagénicos e inmunosupresivos cuando exceden tres veces las dosis de exposición y ambos se han asociado en la transformación neoplásica de algunos tipos de cáncer asociados al VPH.

- **Tabaco:** las nitrosaminas y el alquitrán, carcinógenos del tabaco, están presentes en la secreción del moco cervical de las mujeres fumadoras (90, 91). Plummer et al. (92) demostraron de manera consistente la asociación de tabaquismo y cáncer cervical tras una extensa revisión de 10 estudios de casos y controles realizados hasta entonces. El tabaco tiene efecto carcinogénico directo y además produce alteración de la inmunidad local del cuello del útero contribuyendo a cronificar la infección por VPH y es uno de los cofactores ambientales más uniformemente identificado, con un aumento del riesgo de progresión de 2-4 veces respecto a las no fumadoras, incluso el cese del tabaco se ha asociado a una disminución del tamaño lesional de la CIN (93, 94).

También se relaciona el tabaco con el número de cigarrillos consumidos y el número de años fumando (95,96), en que aumenta el riesgo de desarrollo de cáncer cervical en proporción al número de cigarrillos.

Ocho estudios de cohorte y 44 estudios caso-control, relacionan la infección por VPH y tabaco con la aparición de lesiones precursoras y cáncer de cuello de útero (RR=2,17) (97).

Según otros autores (98), el efecto del tabaquismo sobre la adquisición del VPH no está claro. Existen estudios tanto en hombres como en mujeres que no han encontrado una asociación entre tabaquismo y detección de VPH y que la posible explicación es que el tabaquismo aumenta la susceptibilidad a la infección, o bien que las asociaciones positivas quedaron atenuadas después de averiguar el comportamiento sexual. Otros estudios han reportado una asociación positiva significativa entre la condición de fumador actual y la infección incidente por el VPH, incluso después de controlar por diversas medidas el comportamiento sexual (99). Una posible explicación de este hallazgo es que el tabaquismo aumenta la susceptibilidad a la infección pero a su vez también puede ser una medida sucedánea de conductas sexuales no medidas.

En conclusión, existe suficiente evidencia epidemiológica para relacionar el consumo de tabaco como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer de cérvix (35).

- **Coinfección** con otros patógenos víricos o bacterianos. Otras enfermedades de transmisión sexual:

Los dos patógenos que se han asociado con efecto en la progresión a cáncer de cérvix son el Virus simple herpes-2 (VSH-2) y la Chlamydia Trachomatis.

Se ha demostrado en estudios epidemiológicos, que mujeres VPH- ADN seropositivas tienen entre dos y nueve veces incrementado el riesgo de progresión si hay una seropositividad concurrente con el VSH-2 (100). Sin embargo, estudios in vitro (101), no detectan HVS-2 Bg/II N en las piezas de biopsia de carcinoma escamoso, cuya integración (fragmento Bg/II N subfragmento Xho2) en los queratinocitos inmortalizados por VPH 16 y 18 había demostrado previamente que inducía transformación neoplásica (102).

La infección por Chlamydia Trachomatis tiene una alta prevalencia. Es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en la adolescencia, pero la prevalencia más alta se observa en edades entre los 30 y 34 años, con un 7,9% que desciende al 1,5% en mujeres de más de 45 años. Es causa de cervicitis, uretritis y con frecuencia enfermedad inflamatoria pélvica. Son frecuentes las re-infecciones durante el primer año después del diagnóstico y tratamiento. Una infección antigua con IgG anticuerpos en suero para Chlamydia Trachomatis junto a positividad para VPH, se asocia a un incremento entre dos y diecisiete veces de desarrollar un carcinoma de cuello de útero (103), sin embargo la adquisición de la infección después del desarrollo de un SIL bajo grado (LSIL) no parece que afecte a la progresión hacia un SIL alto grado (HSIL) o una carcinoma. (104).

Aunque existen controversias, la evidencia es una asociación con la infección de Chlamydias, VHS-2 y VPH oncogénesis, generando radicales libres, así como una respuesta inflamatoria asociada y secundariamente inestabilidad genética.

- **Dieta:** si bien se encuentran varios estudios por diferentes autores que relacionan las dietas ricas en frutas y vegetales como protectoras por su riqueza en folatos, vitamina B6 y B12, y que la carencia en vitamina A, carotenos, vitamina C y vitamina A también podría influir en sentido contrario, actualmente no existe evidencia científica entre la asociación de dieta y VPH oncogénesis (105).

- **Obesidad:** se ha encontrado un posible asociación en un estudio caso-control comparando 273 pacientes con adenocarcinoma y carcinoma escamoso celular y 307 casos control en cuanto a índice masa corporal (IMC), altura y peso, encontrando una asociación positiva con adenocarcinoma pero no con carcinoma escamoso celular (106),

el elevado nivel hormonal endógeno inducido por la obesidad podría ser responsable de esta asociación (107).

-Factores socioeconómicos: los factores socioeconómicos estudiados tampoco han podido ser evaluados adecuadamente para establecer una relación.

- Multiparidad: existen estudios casos-control que relacionan la alta paridad con CIN III y carcinoma de cérvix, en que asocian un riesgo incrementado de HSIL, con un riesgo 2,6 más alto en las multíparas de presentar cáncer que las nulíparas y se incrementa el riesgo con 7 o más partos. El motivo de esta asociación no está muy clara, pero podrían ser las modificaciones hormonales del embarazo que modulan localmente la respuesta inmune, los cambios cervicales por el traumatismo del parto o una mayor persistencia de la zona transformación exocervical. (108, 109, 110).

- Anticonceptivos hormonales: el consumo de contraceptivos hormonales durante cinco o más años actúa como cofactor para cáncer cervical y aumenta el riesgo a medida que se suman años (111). Incluso existe una relación a largo plazo con el uso prolongado de anticonceptivos, de un aumento de riesgo hasta cuatro veces sobretodo si el uso es superior a diez años ya que existe un cambio en la respuesta inmunitaria local. Se estima que el riesgo disminuiría después de ocho años de suspenderlos. Otro tema que se podría asociar es que el uso de anticonceptivos iría unido a un mayor número de compañeros sexuales y a un menor uso del profiláctico (60). Estaría en discusión si es aconsejable dejar de tomar los anticonceptivos en caso de infección por VPH, ya que hay autores que no encuentran asociación (93).

Se necesitan más estudios futuros, de cuantificación de carga viral, expresión genética y de oncoproteínas en las células neoplásicas, entre otros, así como una correlación con casos-controles y/o estudios de cohorte para identificar los odds ratio y riesgos relativos asociados, y poder verificar asociaciones ya establecidas e identificar cuantitativamente, especialmente dosis dependiente, la evidencia entre exposición a cofactores medioambientales y cáncer.

1.6 DURACION DE LA INFECCION POR HPV. MANTENIMIENTO Y RESOLUCION.

La duración media de la infección por VPH es variable según los diferentes estudios, puede oscilar entre 6-12 meses y 2 años. Está claro que es de más larga duración en los VPH de alto riesgo que en los de bajo riesgo (98). También se encuentran diferencias marcadas entre el VPH 16 y el VPH 18 y el resto de genotipos virales. La duración de la infección es difícil de determinar ya que varía según se considere la infección incidente (de adquisición reciente) o la prevalente (la que se desconoce el momento de la adquisición) y además se deben añadir las posibles reinfecciones.

Es mucho más frecuente el aclaramiento de la infección que su persistencia. No existe un acuerdo general sobre el tiempo que debe transcurrir para considerar una infección como persistente. En la práctica, se define una persistencia como la detección del mismo tipo viral en dos o más determinaciones realizadas en un periodo de tiempo de uno a dos años. Se conoce que la persistencia de la infección durante más de seis meses, ocurre en menos del 50% de las mujeres infectadas por VPH con citología normal, y sólo persistirá la infección en el 7% de las mismas después de 5 años (69).

1.7 LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO GRADO.

L- SIL. CIN DE GRADO 1.

1.7.1 Patogénesis.

La conducta clínica en las mujeres con citología correspondiente a lesión intraepitelial de bajo grado (L-SIL, CIN 1) no sólo es controvertida, si no que supone un seguimiento y manejo problemático, principalmente por la falta de estudios aleatorizados que permitan establecer guías de conducta basadas en la evidencia. Además sólo una pequeña proporción progresarán hacia un carcinoma microinvasivo y a un carcinoma cervical invasivo. En otras ocasiones el VPH puede permanecer de manera episomal en el núcleo celular en estado de latencia.

No es posible identificar, cuales son las pacientes con L-SIL que tienen mayor riesgo de progresión hacia una lesión de alto grado y además no se puede diferenciar si se trata de una progresión biológica o de una lesión "oculta" en la citología inicial. La prevención es muy difícil de forma que no hay ninguna manera de predecir de manera concluyente

cuantas mujeres infectadas por el VPH tienen probabilidades de evolucionar hacia una lesión precancerosa. Estos interrogantes podrían resolverse si se implantaran nuevos "tests" de diagnóstico en la selección de las mismas. (112).

Las lesiones cervicales de bajo grado (L-SIL), constituyen el prototipo de infección denominada productiva, en la que tiene lugar la producción de grandes cantidades de viriones completos. El patrón de diferenciación del epitelio escamoso infectado es similar al patrón de diferenciación del epitelio normal observándose células inmaduras de tipo basal confinadas en el tercio inferior del epitelio y una correcta maduración en superficie.

En la infección transitoria, el VPH se localiza en el núcleo de forma episómica, es decir sin integrarse el ADN viral en el ADN del huésped. Para iniciar y mantener la transformación neoplásica, el VPH necesita de la acción de dos proteínas virales denominadas E6 y E7 pertenecientes a los serotipos virales de alto riesgo oncogénico. Las propiedades bioquímicas de E6 y E7 son distintas en los virus de alto y bajo riesgo. Estas oncoproteínas se unen e inician la degradación de las proteínas, producto de los genes supresores tumorales, p53 y proteína de retinoblastoma (pRb) respectivamente. La supresión de la acción de p53 induce a la célula a no chequear el buen estado de su ADN e impide que la misma active mecanismos de apoptosis. La supresión de la acción de PRb lleva a la célula a dividirse continuamente. Estas dos acciones llevan a inmortalización de la célula infectada y a un acúmulo de defectos en el ADN de la misma. Asimismo el virus aprovecha los mecanismos de división celular para dividirse él mismo, lo cual favorece la replicación viral y la generación de viriones maduros en las zonas más superficiales del epitelio. Los errores genéticos acumulados en las células infectadas pueden conducir en un momento determinado a una transformación maligna (113).

La integración del ADN viral junto al ADN de la célula huésped, se produce rompiendo una región del genoma viral, la región E2, que normalmente tiene por función ejercer un control de la producción de las proteínas E6 y E7. Por lo tanto la integración del ADN viral conduce a la sobreexpresión de estos oncogenes virales E6-E7 que regulan el ciclo celular normal en las células epiteliales, necesaria para la conversión y progresión de la transformación neoplásica (114).

1.7.2 Evolución de las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado.

Una cuarta parte de las mujeres que presentan infecciones transitorias por VPH muestran cambios citopáticos propios de las lesiones intraepiteliales de bajo grado que son

visualizados en la citología cérvico-vaginal (115). Una lesión de bajo grado (LSIL, CIN 1) regresa sobretodo en mujeres jóvenes y adolescentes. A los doce meses han regresado el 61 % (IC 95%: 53-70) y a los 36 meses el 91 % (IC 95%: 84-99) (116). No se encuentran estas cifras en los diferentes estudios publicados en mujeres de mayor edad, en las que la probabilidad de regresión es menor.

Una conocida y clásica revisión de la literatura sobre la historia natural de CIN , concluía que las lesiones CIN I regresaban espontáneamente en el 60%, persistían en el 30%, progresaban a CIN 3 en el 10% y a cáncer invasor en el 1% (117). Posteriormente se han realizado muchos estudios, observando que el riesgo de desarrollar CIN 2-3 o cáncer a partir de lesiones de CIN1 sin tratamiento y confirmadas por biopsia fue del 9 al 16% (118).

Los análisis virológicos parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por el VPH precede a la regresión de los cambios citológicos (119) y asimismo la tasa de aclaramiento disminuye con la mayor gravedad de la lesión intraepitelial. Con la ayuda de estos datos , se puede evitar sobretratar a las mujeres con citología de LSIL y de esta forma detectar el aclaramiento de la infección del VPH y la regresión de la lesión.

Por otro lado, existen trabajos, como el de Spitzer 2006 (120), en que encuentra que entre un 23% y un 55% de casos tratados con asa diatérmica en diagnósticos previos de posible lesión de bajo grado, el resultado anatomo-patológico final era una neoplasia intraepitelial de alto grado. Este hecho es más frecuente en determinados casos, por lo que la ASCCP (121) aconseja tratamiento excisional en los casos de colposcopia insatisfactoria, legrado endocervical positivo, lesiones muy extensas, lesiones que persisten durante largo tiempo y en mujeres de más de 40 años. Otro estudio (122) muestra una relación lineal entre el análisis de carga viral previa al tratamiento escisional en lesiones de bajo grado (LSIL, CIN1) y el riesgo de lesión residual o recurrente, con el consiguiente mayor riesgo después de la exéresis. Si bien es difícil de predecir con sólo una determinación viral, el porcentaje de pacientes con lesiones de bajo grado que presenten riesgo de progresión y que sean candidatas a tratamiento escisional (84).

Es por ello que algunos autores complementan la determinación de ADN del VPH con el genotipo viral (123), u otros tests (124) para aumentar la especificidad en predecir las lesiones de bajo grado que podría evolucionar o enmascarar una lesión del alto grado, se basan en citología convencional y a partir de estos resultados personalizar la conducta clínica en cada paciente.

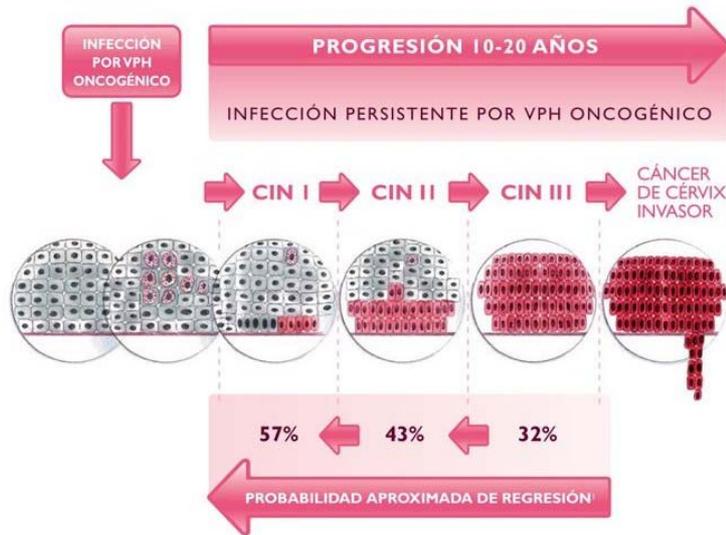


Figura 4. Evolución y cronología de las lesiones cervicales intraepiteliales. (Ostor 1993)(117).

1.7.3 Diagnóstico precoz del cáncer de cérvix.

1.7.3.1 Citología convencional.

Los programas de diagnóstico precoz de cáncer de cérvix uterino basándose en la detección de alteraciones en la citología cérvico-vaginal con tinción de Papanicolau (introducida desde 1940 por Dr. George Papanicolau y conocida como citología convencional o Pap test), han sido efectivos en la reducción de la incidencia de cáncer de cérvix en los países desarrollados. Se conoce y se acepta que, si bien en el cribado poblacional no se han realizado estudios prospectivos aleatorizados que avalen la eficacia del método, en los últimos años la incidencia de cáncer cervical ha disminuido en un 70% en Estados Unidos y Europa (125), aun a pesar de que la citología cervico-vaginal convencional es sólo moderadamente fiable y no consigue una alta sensibilidad y especificidad. (126).

Se conoce, según datos recientes cuando se revisan los diferentes estudios, que una única citología cervical puede no detectar hasta el 40-50% de las lesiones de alto grado o invasivas, ya que presenta una serie de limitaciones, entre ellas :

- La naturaleza subjetiva de la prueba y con ello una potencial ambigüedad.
- Una marcada variabilidad en función del medio en que se realiza y del control de calidad en todo el proceso desde que se toma la muestra hasta que se procesa y posteriormente se interpreta (127).
- Baja reproducibilidad del método, con un amplio rango de sensibilidad y especificidad.
- La necesidad de una organizada y compleja infraestructura sanitaria para llevar a cabo todo el cribado.

Estas limitaciones conllevan a una serie de hechos:

- Una proporción considerable de resultados falsos-negativos (sensibilidad).
- Elevada frecuencia de resultados falsos-positivos (especificidad).
- Alta variabilidad entre diferentes observadores.
- Falta de fiabilidad o precisión en el diagnóstico global.

A nivel de la práctica clínica significa:

- Pérdida o falta de diagnóstico de lesiones de alto grado (H-SIL).
- Procedimientos diagnósticos de seguimiento innecesarios y sobre-tratamiento.
- Intensos recursos, costes innecesarios.

Este hecho ha ayudado o ha obligado a que se desarrollen nuevos métodos citológicos con el objetivo de obtener una mayor sensibilidad diagnóstica, y por otro lado, a desarrollar técnicas especiales en citología e histología que permitan comprobar y, a su vez, confirmar el diagnóstico.

A pesar de las limitaciones conocidas y comentadas, la práctica sistemática de citologías cérvico-vaginales, ya sea en cribado poblacional u oportunista, ha disminuido notablemente la incidencia de cáncer de cuello de útero en los países occidentales en los últimos años, al identificar las lesiones intraepiteliales precursoras al cáncer, y de forma inmediata aplicar un adecuado tratamiento. Precisamente el éxito de los programas de cribado se basa en el tratamiento de las lesiones pre-invasivas identificadas. El reto se ha fundamentado siempre en asegurar que los beneficios del tratamiento de las mujeres a las que se ha detectado la presencia de lesión intraepitelial, bien sea por citología o colposcopia, sean mayores a los riesgos del tratamiento. Como consecuencia, la mujeres de todo el mundo, desde una perspectiva global poblacional se han beneficiado con la "prueba de Papanicolau" o "citología cervical" y, de esta manera, cualquier alternativa de sustitución o complemento de la misma, deberá superarla en términos de efectividad, coste, seguridad y aceptabilidad.

Sin embargo, debido a la gran extensión natural de la infección por VPH y a las dificultades por falta de recursos para una adecuada atención sanitaria en muchos países del mundo en vías de desarrollo, el cáncer cervical inducido por el virus papiloma humano continua siendo un importante problema de salud, ya que el 80% de la incidencia y la mortalidad por cáncer de cuello uterino ocurre en estos países (9).

1.7.3.2 Citología líquida.

La citología en medio líquido (Thin Pap Test [TPPT]) es un método de preservación y manejo de las muestras citológicas, que puede sustituir al método tradicional (citología convencional [CC]) aprobado por la Food and Drug Administration desde 1996, concluyendo que era significativamente más efectivo que la tradicional citología convencional para la detección de la presencia de células atípicas, cáncer cervical o lesiones precursoras (Lesiones Intraepiteliales Escamosas de bajo y alto grado (L-SIL y H-SIL), en el cervix, así como otras alteraciones citológicas definidas por el Sistema Bethesda 2001. Los análisis clínicos que condujeron a la FDA a aprobar esta técnica se basaron en el estudio de más de seis mil mujeres y concluyeron con un aumento significativo en la detección de lesiones escamosas intraepiteliales leves o severas, y reducción próxima al 30% en el número de muestras insatisfactorias o inadecuadas para su evaluación y que llevan a la repetición innecesaria de la prueba.

Con esta técnica, la muestra citológica que se obtiene de la zona de transformación del cérvix, es la misma que la que se obtiene para una estudio de citología convencional (CC, Papanicolau), sin embargo tiene la ventaja que la muestra líquida, al ser procesada mediante centrifugación y filtro, se eliminan la sangre, moco cervical, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y otros artefactos de la suspensión, obteniendo las células en una sola capa con la morfología celular preservada y ausencia de aire, grumos, sangre, crecimiento celular y células deterioradas o de difícil interpretación (128).

Desde la aprobación de la citología líquida (TPPT) por la FDA en 1996, se han realizado múltiples estudios comparando esta técnica con la citología convencional (CC) (128). Es conocido que en la citología convencional (CC) falsos negativos y falsos positivos, que pueden deberse a errores en el muestreo, en la interpretación o en ambos, pero, según algunos autores, estas lesiones constituyen el 30% de los nuevos casos de cáncer de cérvix (129).

Tabla 3: Ventajas e inconvenientes de la citología líquida sobre la citología convencional.

VENTAJAS DE LA TPPT SOBRE LA CC:

- Muestras más representativas.
- Mejor conservación de la muestra.
- Disminución de las muestras no satisfactorias.
- Aumento del número de lesiones precursoras (en controversia).
- Disminución del número de ASC-US y AGC (en controversia).
- Reducción del tiempo de lectura
- Utilización del material restante para técnicas complementarias.

INCONVENIENTES DE LA TPPT SOBRE LA CC:

- Tiempo de procesamiento más largo.
- Formación especializada para la interpretación de los estudios.
- Necesidad de un periodo, variable, para la lectura.
- Requiere mayor concentración en la lectura.
- Sensible aumento del coste en todas las fases del proceso.

Diferentes estudios demuestran que el TPPT permite diagnosticar un 30-200% más casos de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) y un 25-103 % más casos de alto grado (HSIL) (130, 131,132, 133) entre otros, con un incremento de la sensibilidad y de los resultados citológicos verdaderos positivos utilizando diferentes tipos de citología líquida (134). Existen diversos dispositivos basados en las propiedades de la citología de base líquida con mejor calidad y representatividad celular en capa fina, exenta de elementos enmascadores e incluso a menor coste, pero son nuevas alternativas que carecen de suficiente documentación bibliográfica.

En un metaanálisis de Berstein et al que incluye 154.380 casos de citología líquida (Thin Prep) y 311.175 casos de CC, se observa un incremento porcentual del diagnóstico de ASCUS de un 3,28% en la CC a un 3,94% en la citología líquida y además muestra un incremento de muestras satisfactorias en la citología líquida respecto a la convencional. (135).

Abulafia et al. realizan un metaanálisis de los datos publicados en la literatura médica respecto a la comparación entre CC y TPPT, revisando un total de 17 artículos que incluyen 35.592 pacientes, y 10 artículos comparando correlación citología-histología en 21.752 pacientes. En este metaanálisis se observa un incremento de la sensibilidad y la especificidad del TPPT respecto a la CC, tomando como patrón de referencia la

colposcopia y la biopsia (128). El valor predictivo positivo, la sensibilidad y la especificidad es mayor en el TPPT respecto a la CC. Comparando citología-histología la tasa de sensibilidad fue de 68% (CC) y 76% (TPPT), y la especificidad 79% (CC) y 86% (TPPT). Utilizando el método denominado split-sample, que en una misma toma efectúa un extendido convencional y el material sobrante lo disuelve en medio líquido, si bien no proporcionan los mismos resultados y se encuentran conclusiones contradictorias. Otros estudios de comparación en muestras divididas (split-sample), directos y de meta-análisis documentados en la bibliografía concluyen que la citología líquida mejora la calidad de la muestra en todos los casos, disminuye el número de muestras no satisfactorias, de ASC-US y de células glandulares atípicas (AGC), además aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de SIL de bajo y alto grado.

Otros autores defienden similares valores predictivos positivos para lesiones malignas con ambas técnicas (136). Y también se encuentran estudios que obtienen peores resultados con TPPT que con CC, y concluyen que el TPPT es menos válido y más susceptible de obtener falsos positivos y falsos negativos que la CC (137), concluyendo que no hay diferencias significativas entre la CC y la TPPT, ni en la tasa de citologías satisfactorias ni en la tasa de detección de lesiones pre-invasivas (138).

El Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos, en sus recomendaciones, basadas en la evidencia científica, indica que el TPPT es tan válido como la CC para el cribado poblacional (139).

Las ventajas de la citología líquida es la posibilidad de efectuar distintas pruebas añadidas o técnicas complementarias al diagnóstico citológico, ya que se pueden obtener más de un porta del mismo vial entre ellas Captura de híbridos , hibridación in situ mediante inmunocitoquímica, análisis de ADN, citogenética, PCR, P16, ARNm E6-E7, u otras (140). Aprovechando la misma muestra de la paciente y así no tendría que repetirse la prueba con las molestias que supone, junto a la pérdida de tiempo, acumulación de visitas, gasto adicional por lo que ayudaría a reducir la presión asistencial en los consultorios de patología cervical y a disminuir la ansiedad de las pacientes.

Las células se conservan bien preservadas en el vial, durante 4-6 semanas en medio ambiente, y al menos 1 año en frigorífico y mínimo 5 años si las muestras son congeladas a -70°C-80°C, pudiéndose descongelar para poder aplicar las técnicas o pruebas complementarias que se crean convenientes. (141).

1.7.3.3 Colposcopia.

La colposcopia es una técnica de exploración óptica, que a través de una lupa binocular provista de una luz potente, proporciona una visión con aumento variable de los epitelios del cuello uterino, vagina y vulva. El colposcopio fue introducido por Hinselman en 1925. La realización de una colposcopia es una prueba de exploración dinámica, con una sistemática sencilla para aprovechar al máximo sus posibilidades, pero que requiere entrenamiento y experiencia.

La visión directa del cuello del útero a través del espéculo, apenas ofrece información, es necesario el uso del colposcopio para estudiar e identificar cambios mínimos inapreciables a simple vista, que son la manifestación de alteraciones patológicas, pudiendo diferenciar el tejido normal del anormal, así como la morfología y topografía de las lesiones o procesos patológicos y localizar el área más sospechosa para obtener una biopsia.

La colposcopia no tiene indicación en el cribado poblacional, se ha reservado para el estudio de las mujeres con citología anormal o si las características clínicas lo aconsejan. Si bien, en determinados países, o dependiendo de las circunstancias locales la colposcopia se incluye como rutina en el examen ginecológico habitual.

Los hallazgos colposcópicos normales que se describen en la clasificación de Barcelona 2002 (142), se corresponden con los tres tipos de epitelio que se hallan en el cuello normal: epitelio cilíndrico, epitelio escamoso y epitelio metaplásico (zona de transformación), por lo que para interpretar estos epitelios normales al colposcopio, se debe conocer el estudio histológico de los mismos. Ocurre lo mismo con las imágenes patológicas, es imprescindible el conocimiento histológico y los mecanismos etiopatogénicos que contribuyen a su desarrollo para entender e interpretar el significado de las imágenes observadas y valorar las limitaciones de la técnica. Con este mejor conocimiento de la biología de las lesiones intra-epiteliales, a través de la colposcopia, se llega a un mejor diagnóstico y una adecuada estrategia terapéutica.

Los objetivos principales que persigue la colposcopia son:

- Visualizar cérvix, vagina, vulva y región perianal.
- Identificar la unión escamoso-cilíndrica y el epitelio metaplásico (zona de transformación).
- Determinar si la exploración es satisfactoria o no satisfactoria.

-Identificar y valorar las características de la lesión (tamaño, bordes, contornos, localización y extensión).

-Explorar y valorar adecuadamente el canal endocervical.

-Identificar las zonas o áreas más significativas y realizar biopsias dirigidas bajo control colposcópico.

-Diagnosticar u observar neoplasias multicéntricas.

Posteriormente se deben correlacionar los resultados de la impresión colposcópica, la citología y la biopsia, de esta forma se establece un plan terapéutico que es el que se comunica y se ejecuta en cada paciente.

La digitalización de las colposcopias, técnica que se ha desarrollado en la última década, aporta ventajas respecto a la colposcopia convencional:

-Mayor objetividad en la valoración de las imágenes.

-Posibilidad de cuantificar la superficie de las lesiones intraepiteliales y su topografía.

-Posibilidad de un estudio evolutivo comprobando y comparando si las lesiones no tratadas van en aumento o disminuyen.

Cuando nos referimos únicamente a las lesiones intraepiteliales de bajo grado (o CIN de bajo grado) tras un diagnóstico citológico, generalmente no presentan signos específicos en el examen colposcópico. Los signos colposcópicos menores que sugieren una lesión de bajo grado serían:

- Superficie lisa.

- Ligera acidofilia que aparece lentamente y desaparece rápidamente.

- Yodonegatividad ligera, irregular y parcial con imágenes de punteado y mosaico finas y regulares.

Estas anomalías menores también podrían existir en los casos de lesiones de alto grado, si se suma también las interferencias de los casos de metaplasias inmaduras, disminuye mucho la especificidad global de esta prueba, en que imágenes colposcópicas anormales no siempre corresponden a lesiones intra-epiteliales, para ello ha ayudado la nueva terminología (IFCPC, Barcelona 2002) en que precisa la situación y la visibilidad de la zona de transformación, como criterio más objetivo que las propias imágenes (143). Por lo tanto, a los cuadros clásicos de los signos colposcópicos, se añadieron las tres posibilidades referentes a la situación y la visibilidad de la zona de transformación: totalmente exocervical y visible (ZT1), endocervical totalmente visible, eventualmente con localización exocervical (ZT2), y por último, endocervical no totalmente visible con

localización exocervical eventual (ZT3). Las CIN de bajo grado generalmente se clasifican como ZT1. Si no se visualiza la unión escamo-cilíndrica la colposcopia se considera insatisfactoria y en este caso es importante descartar una posible lesión no visualizable, localizada en el canal endocervical.

Dentro del apartado hallazgos colposcópicos anormales, se establece una gradación que diferencia los cambios sutiles o leves (cambios menores) de los patrones colposcópicos abigarrados y que muestran mayor severidad (cambios mayores). Aunque ya se sabe que no todo hallazgo colposcópico anormal corresponde con una lesión precancerosa, mediante esta categorización la mayoría de las imágenes catalogadas como cambios menores suelen correlacionarse con metaplasia o LSIL-CIN1 y las catalogadas como cambios mayores con HSIL-CIN2-3 o invasivas (27, 144).

Anexo 1. Terminología colposcópica, IFCPC. Barcelona 2002 (Tomado de Puig-Tintoré et al) (93).

Comité de Nomenclatura de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia

- I. Hallazgos colposcópicos normales**
 - A. Epitelio escamoso original
 - B. Epitelio columnar
 - C. Zona de transformación
 - a. Tipo 1, localizada en el ectocérvix, totalmente visible (pequeña o grande)
 - b. Tipo 2, con un componente endocervical , totalmente visible (pequeña o grande)
 - c. Tipo 3, con un componente endocervical, no totalmente visible (pequeña o grande)
- II. Hallazgos colposcópicos anormales**
 - A. Epitelio acetoblanco
 - B. Punteado
 - C. Mosaico
 - D. Negatividad el yodo
 - E. Vasos atípicos
- III. Características colposcópicas sugestivas de lesión de bajo grado (cambios menores)**
 - A. Superficie lisa con borde externo irregular
 - B. Cambio acetoblanco mínimo, que aparece lentamente y desaparece con rapidez
 - C. Yodo positivo débil, a menudo parcialmente moteada
 - D. Punteado fino y mosaico fino y regular
- IV. Características colposcópicas sugestivas de lesión de alto grado (cambios mayores)**
 - A. Superficie generalmente lisa con un borde exterior bien definido
 - B. Cambio acetoblanco denso, que aparece pronto y desaparece lentamente (blanco de ostra)
 - C. Color acetoblanco denso en los orificios glandulares
 - D. Negatividad al yodo, de aspecto amarillento en un epitelio intensamente blanco
 - E. Punteado grosero y mosaico extenso e irregular con losetas de diferentes tamaños
 - F. Un cambio acetoblanco denso en el epitelio columnar puede indicar enfermedad glandular
- V. Características colposcópicas sugestivas de cáncer invasivo**
 - A. Superficie irregular, erosiva o ulcerada
 - B. Cambio acetoblanco denso
 - C. Punteado y mosaico extenso e irregular
 - D. Vasos atípicos
- VI. Colposcopia insatisfactoria**
 - A. Unión escamoso-vertebral no visible
 - B. Asociación con trauma, inflamación o atrofia que impida valorar
 - C. No se visualiza el cuello
- VII. Hallazgos misceláneos**
 - A. Condilomas
 - B. Queratosis
 - C. Erosión
 - D. Inflamación
 - E. Atrofia
 - F. Deciduosis
 - G. Pólipos

A través del colposcopio, en la fase intra-epitelial se observan lesiones de color blanco debidas a los cambios epiteliales que impiden el paso de la luz hasta el estroma. Es un signo poco específico pero muy útil para delimitar con precisión el área anormal (142). En colposcopia el único punto en común de las lesiones de bajo grado es la ausencia de cambios mayores, por lo que su especificidad es menor que la citología (45%), a expensas de una mayor sensibilidad (95 %), con lo cual en el contexto o algoritmo que se emplea es adecuada, ya que identificar todas las lesiones que pueden ser neoplásicas es más importante que no caracterizarlas (145), según este estudio, un meta-análisis sobre 9 publicaciones, la colposcopia ofrece una elevada sensibilidad para diferenciar el epitelio normal del patológico. Sin embargo, la colposcopia presenta una mejor especificidad para distinguir LSIL de HSIL que para diferenciar el epitelio normal del anormal. Estos resultados corroboran la validez de la actual clasificación colposcópica, que distingue entre cambios mayores, propios de las HSIL-cáncer, de los cambios menores, propios de las normales LSIL.

Una revisión Cochrane (146), basada en la evidencia sobre el empleo de la colposcopia, concluye que es un método excelente para el estudio de mujeres con citología anormal y así poder individualizar el tratamiento, pero sin utilidad como test de cribado primario ni como sustituto de la evaluación histológica.

Además, como ya se ha comentado, el objetivo de la colposcopia no es realizar diagnósticos sólo por la imagen sino mediante la biopsia dirigida. Por lo tanto para evitar el sobre-diagnóstico y/o sobre-tratamiento, la elevada sensibilidad de este método exige una buena preparación y experiencia, un conocimiento amplio de la anatomía, una extensa formación citológica e histológica, y además dominar las bases y los límites de la técnica.

Además es conocido, que en las lesiones citológicas de bajo grado (LSIL), la presencia de un VPH de alto riesgo oncogénico es muy frecuente y complica tanto el diagnóstico como la conducta a seguir en estos casos. En efecto y de manera equívoca, cuando existe una discordancia entre citología e histología, la presencia de VPH altamente oncogénico, sobretodo si la carga viral es elevada, cuenta más que la colposcopia llevando a un sobre-tratamiento o a una conización innecesaria. Se necesitaría más información, a través de marcadores u otros métodos, para conocer el estado de las células epiteliales e identificar las células neoplásicas. Pero hasta el momento, si la colposcopia es satisfactoria (zona de transformación totalmente visible y accesible a la biopsia: ZT1 o ZT2), si no hay cambios

colposcópicas mayores, y si la biopsia muestra una lesión de bajo grado, no existiría indicación de exéresis.

En resumen, el proceso que se debe seguir en el diagnóstico de las lesiones de bajo grado se basa, en el estudio citológico, en visualizar la presencia de anomalías menores a través de la colposcópica, y si existen, sobre éstas dirigir la toma de muestras para obtener un examen anatomopatológico y posteriormente se verifica si lo que se observa en la colposcopia, se correlaciona con el diagnóstico citológico previo y con el estudio histopatológico posterior, y así orientar la conducta terapéutica a seguir.

1.7.3.4 Biopsia de cérvix.

La biopsia dirigida colposcópicamente permite confirmar el diagnóstico y así decidir la conducta terapéutica a seguir.

La biopsia del exocérvix realizada bajo control colposcópico, está indicada en:

- Colposcopia anormal con cambios mayores.
- Colposcopia anormal y valorable con cambios menores (con citología mayor o igual a LSIL).

El estudio endocervical (biopsia por legrado o citología por cepillado), está indicado en :

- Imagen colposcópica anormal que penetra en el canal cervical.
- Citología anormal con colposcopia no satisfactoria.
- Citología con lesiones glandulares: células glandulares atípicas (AGC). adenocarcinoma in situ endocervical (AIS), adenocarcinoma.
- Antes de practicar un tratamiento destructivo.

El estudio endometrial (biopsia por legrado o aspiración), está indicado en:

- Citología con lesiones glandulares en mujeres de más de 40 años: células glandulares atípicas (AGC) , adenocarcinoma in situ endocervical (AIS), adenocarcinoma.

La conización, practicada con cualquier técnica, siempre que se obtenga una única pieza bien orientada, está indicada en:

- Diagnóstico de CIN2 y CIN3.
- Estudio endocervical diagnóstico de SIL-CIN, AIS.
- Citología igual o mayor a HSIL confirmada tras la revisión, con cérvix y vagina normales a la colposcopia.
- Citología igual o mayor a HSIL confirmada tras la revisión, y biopsia negativa o LSIL.
- Biopsia con microinvasión.
- Citología con células glandulares atípicas (AGC), adenocarcinoma in situ endocervical (AIS) o adenocarcinoma, con estudio endocervical negativo.

En estos dos últimos casos es conveniente realizar una conización amplia y profunda junto a un legrado endocervical.

En los diagnósticos citológicos de lesión intraepitelial de bajo grado, la excisión con asa diatérmica estaría indicada en: casos de colposcopia insatisfactoria, legrado endocervical positivo, infección por VPH de alto riesgo durante más de dos años con persistencia de LSIL, o infección durante más de dos años en mujeres mayores de 40 años.

En los casos con discordancia entre la citología y el resultado de la colposcopia-biopsia, se deben revisar ambas técnicas, por lo que es conveniente y habitual una constante comunicación entre el clínico, el citólogo y el patólogo (93).

1.8 CITOPATOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DE LAS LESIONES CERVICALES PRENEOPLÁSICAS Y NEOPLÁSICAS

1.8.1 Nomenclatura citopatológica e histopatológica de las lesiones cervicales preneoplásicas y neoplásicas

Durante los últimos años se han utilizado diferentes nomenclaturas citológicas para denominar las lesiones escamosas cervicales, que han ido cambiando en relación con el incremento de conocimientos morfológicos, evolutivos, etiológicos y carcinogénicos. Por otro lado, y a excepción de la clasificación numérica de Papanicolau, la clasificación citológica ha ido siempre ligada de forma estrecha a la clasificación histológica (147).

En 1910 ya se hablaba de “cáncer incipiente” o “carcinoma temprano”, para denominar los cambios que se observaban en el epitelio adyacente al carcinoma invasor. En 1932 ya usaba el término de “carcinoma in situ”, “carcinoma epitelial no invasor” o “enfermedad de Bowen del cuello de útero”.

La progresiva introducción de la citología y la biopsia sistemáticas demostró que el espectro de anomalías intraepiteliales no se limitaba al carcinoma in situ. En 1949, Papanicolaou utilizó los términos “displasia en histopatología” y “discariosis en citopatología” para designar estos cambios. En 1961, en el primer Congreso Internacional de Citología, se acordó que los términos para designar citológicamente las tres lesiones cervicales mayores serían “carcinoma invasor”, “carcinoma in situ” y “displasia”. Posteriormente, la displasia se subdividió en leve, moderada o grave.

Esta clasificación, aplicable tanto en citología como en histología, presentaba dos grandes problemas: por un lado grandes dificultades para distinguir la displasia grave del carcinoma in situ, y por otro lado la idea de que el carcinoma y la displasia eran dos lesiones biológicamente distintas e independientes.

Para intentar resolver este problema, se propuso el término de “neoplasia intraepitelial cervical” (CIN, del inglés cervical intraepithelial neoplasia), con tres grados progresivos, incluyendo en el grado 3 la displasia grave y el carcinoma in situ de la clasificación anterior. La ventaja principal era el reconocimiento de la unidad del proceso patológico, la evidente relación con el tratamiento y la buena correlación cito-histológica. Esta clasificación ha sido la más utilizada durante más de 20 años. Sin embargo, no podemos negar que es evidente la ausencia de reproducibilidad en los diagnósticos, tanto citológicos como histológicos, de las lesiones menos graves (148).

Todas estas razones comentadas y los nuevos conocimientos relativos a la carcinogénesis cervical motivaron una reconsideración de la clasificación, y se obtuvo como resultado la clasificación de Bethesda. Ésta tiene como fundamento un sistema binario de clasificación citológica de las lesiones, denominándose lesiones escamosas intra-epiteliales (SIL, del inglés squamous intraepithelial lesion) de bajo o alto grado. Esta clasificación fue adoptada en 1988, tuvo modificaciones mínimas en 1991 y se actualizó en 2001.

ANEXO 2

CLASIFICACION CITOLOGICA BETHESDA, 2001.

Idoneidad de la muestra

Satisfactoria para la evaluación (señalar la presencia o ausencia de células endocervicales o metaplásicas)

Insatisfactoria para valoración... (especificar el motivo):

Muestra rechazada o no procesada... (especificar el motivo).

Muestra procesada y examinada, pero insatisfactoria para valoración de anomalías epiteliales debido a... (especificar el motivo).

Categorización general (opcional)

Negativa para lesión intraepitelial o malignidad.

Células epiteliales anormales.

Otras

Interpretación/resultado

Negativa para lesión intraepitelial o malignidad.

Organismos

Trichomonas vaginalis.

Hongos morfológicamente compatibles con *Cándida*.

Flora sugestiva de vaginosis bacteriana.

Bacterias morfológicamente compatibles con *Actynomices*.

Cambios celulares compatibles con virus del herpes simple.

Otros hallazgos no neoplásicos (opcional).

Cambios celulares reactivos asociados a:

inflamación (incluye reparación típica),

radiación

dispositivo intrauterino

Células glandulares posthisterectomía

Atrofia

Células epiteliales anormales

Células escamosas

Células escamosas atípicas (ASC)

de significado indeterminado (ASC-US);

no puede excluir lesión escamosa intraepitelial de alto grado (ASC-H)

Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL)

Incluye: cambios por virus del papiloma humano/

displasia leve/ neoplasia cervical intraepitelial (CIN 1).

Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL)

Incluye: cambios por displasia moderada y grave,

carcinoma in situ ; CIN 2 y CIN 3.

Carcinoma escamoso

Células glandulares

Células glandulares atípicas (AGC) (especificar endocervical, endometrial o sin especificar)

Células glandulares atípicas, posible neoplasia (AGC-N) (especificar endocervical o sin especificar)

Adenocarcinoma in situ endocervical (AIS)

Adenocarcinoma

Otros

Células endometriales normales en mujer =40 años.

LECTURA AUTOMATIZADA Y TECNICAS AUXILIARES

(Incluir si precisa)

NOTAS DIDACTICAS Y SUGERENCIAS (opcional)

Tomado de Puig-Tintoré et al 2006 (93).

Este sistema no ha sido adoptado en todos los países, pero es el recomendado por la Sociedad Española de Citología. Además, la clasificación de Bethesda incorpora recomendaciones para la elaboración del informe citológico (149).

La siguiente tabla compara los tres sistemas de clasificación citológica de las lesiones escamosas cervicales.

Tabla 4. Sistemas de clasificación citológica de lesiones escamosas cervicales (Alameda 2007) (147)

Displasia/CIN	VPH	Leve	Moderada	Grave	CIS
CIN	VPH	CIN-I	CIN-II	CIN-III	CIN-III
SIL	L-SIL	L-SIL	H-SIL	H-SIL	H-SIL

CIN: neoplasia intraepitelial cervical; CIS: carcinoma in situ;

SIL : lesión escamosa intraepitelial; VPH, virus del papiloma humano

En el apartado “H-SIL” o lesión de alto grado, se incluyen los anteriores: displasia moderada o CIN-II, y displasia grave/carcinoma in situ o CIN-III, simplificando así el sistema de gradación. Y en el término “L-SIL” o lesión de bajo grado se incluye la displasia leve o CIN-I, y los cambios inducidos por infección del VPH, existiendo sólidos argumentos clínicos a favor de esta agrupación. El término “lesión” se utiliza aquí, frente al término “neoplasia” para resaltar el potencial biológico incierto de la alteración.

También se puede establecer una correlación citohistológica utilizando la clasificación de Bethesda. El diagnóstico histológico de las lesiones cervicales asociadas a la infección por VPH se clasifican en la actualidad siguiendo los criterios de Richart, que es el criterio de referencia: CIN de grado 1 (la infección morfológica de la infección transitoria por el VPH) y , CIN 2 y 3 (auténticas neoplasias). La correlación citohistológica según la clasificación de Bethesda es la siguiente:

Tabla 5: Clasificación citohistológica según la clasificación de Bethesda.

Citología	Histología
L-SIL	Displasia leve/VPH Displasia leve
H-SIL	Displasia moderada Displasia grave/ carcinoma in situ

La primera clasificación de Bethesda incluye otro grupo de casos, que no habían sido incluidos en clasificaciones previas. Son los llamados ASCUS, término que significa Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. Este término se introdujo para intentar agrupar con mayor precisión las lesiones de bajo grado. La catalogación de un proceso de bajo grado debe realizarse por exclusión. Inicialmente, se interpretó que los cambios catalogables como ASCUS podían ser debidos a un proceso benigno pero intenso o bien a una lesión potencialmente grave.

Un aspecto conceptual importante introducido en esta última versión de esta clasificación de Bethesda, es el reemplazo de la palabra “diagnóstico” por “interpretación” o “resultado”, lo que indica que la citología no da un diagnóstico definitivo.

En esta última versión (2001), se ha mantenido la clasificación principal de LSIL y HSIL. Se ha eliminado el ASC-US reactivo y de esta forma reducir el número de citologías informadas de “ASC-US”, aquellas alteraciones citológicas sugestivas de lesión intraepitelial, pero insuficientes cuantitativa o cualitativamente para un diagnóstico definitivo “, y así se incluyen como negativas (en consecuencia, el ASCUS secundario a un proceso benigno pero intenso desaparece). La importancia del ASCUS reside en que en esta categoría subyace un número, variable según las series pero apreciable, de lesiones escamosas de alto grado.

Esta nueva clasificación incluye dos categorías: ASC-US, atipia de significado indeterminado, y se añade una nueva categoría ASC-H, atipia sugestiva de lesión de alto grado que se emplea para aquellos casos que no se puede excluir una lesión de alto

grado. El diagnóstico de ASCUS es citológico y no tiene, como tal, una traducción histológica definida. El término AGUS se ha sustituido por “células glandulares atípicas” (AGC) y se ha incluido en la categoría de AIS endocervical.

1.8.2 Características citológicas de las lesiones escamosas

Independientemente del método que se utilice, citología convencional o citología en monocapa, se observan cambios similares (147).

- **ASCUS.** Es una alteración citológica consistente en el agrandamiento del núcleo de la célula escamosa (2-3 veces el núcleo de una célula intermedia), con ligero aumento de la relación núcleo-citoplasma, conservando el aspecto redondeado u ovalado del núcleo y la textura de la cromatina, con ligera hipercromasia. La membrana nuclear es lisa. Puede haber binucleación. Las células se ven sueltas o en pequeñas láminas. Cuando estas alteraciones son muy sugestivas de H-SIL pero no concluyentes (mayor hipercromasia, afectación de células en capas bajas, etc.) se definen como ASC-H. De hecho el término ASCUS se debería reservar para las lesiones sugestivas pero no concluyentes de SIL, pero esto último no está claramente definido en la clasificación de Bethesda.

-**L-SIL.** Es una alteración citológica que consiste en el agrandamiento del núcleo de las células intermedias (3-4 veces el tamaño normal), con aumento de la relación núcleo-citoplasma. El núcleo muestra, además, hipercromasia e irregularidad de la membrana. Los nucléolos son pequeños o están ausentes. Se puede ver binucleación. Estos cambios pueden asociarse a otros, llamados cambios citopáticos, relacionados con infección por VPH y que consisten en la conocida coilocitosis, o atipia coilocítica. (Koïlos , en griego, significa “hueco” o “vacio”). El coilocito es una célula escamosa madura que muestra una voluminosa cavitación perinuclear de límites muy netos y que reduce el citoplasma visible a una ligera franja entre la membrana citoplasmática y la “cavidad”.

Estas células pueden verse sueltas o en láminas, y acompañarse de otras, de mediano o pequeño tamaño, citoplasma intensamente orangofílico y núcleo intensamente cianófilo, llamadas células disqueratósicas.

-H-SIL. Alteración citológica consistente en el agrandamiento del núcleo de las células de capas bajas, con aumento de la relación núcleo-citoplasma y escaso citoplasma, a veces delicado y otras, de aspecto metaplásico y, ocasionalmente orangofílico. El núcleo muestra, además, una marcada hiperchromasia e irregularidad franca de la membrana. Los nucléolos son pequeños o están ausentes. Las células están sueltas o en placas no cohesivas o, más raramente, en agregados de aspecto sincitial.

-Carcinoma escamoso. Los criterios citológicos que sugieren invasión serían: en una extensión citológica con cambios citológicos de H-SIL, los cambios que sugieren carcinoma escamoso infiltrante son nucléolo prominente, distribución irregular de la cromatina, agregados sincitiales y, fundamentalmente, fondo necrótico e inflamatorio, la llamada diátesis tumoral. Sin embargo, el concepto "invasión" es necesariamente histopatológico.

1.8.3 Características histológicas de las lesiones escamosas.

- **Displasia leve.** Consiste en la sustitución del epitelio normal por células atípicas situadas en el tercio interno del grosor epitelial, es decir, desde la basal hasta la superficie, interesando solamente una tercera parte del grosor epitelial. Las células muestran alteración de la relación núcleo-citoplasma y desorganización estructural con pérdida de la polaridad celular.

- **Infección por VPH.** Cambios citopáticos en relación con la infección por VPH, como cavitación citoplasmática y alteraciones nucleares consistentes en aumento del tamaño del núcleo, hiperchromasia, aspecto borroso de la cromatina y variaciones en la forma nuclear. Se observa, además, aumento del grosor del epitelio, sin alteración de la maduración epitelial. Si la superficie del epitelio permanece más o menos aplanada, la lesión se clasifica como condiloma plano; si muestra proyecciones papilares, hacia la superficie, como condiloma acuminado.

- **Displasia leve-infección por VPH.** En estos casos, se observan las alteraciones descritas en la displasia leve y en los casos de infección por VPH.

- **Displasia moderada.** Se observan las mismas alteraciones que en la displasia leve, pero afectan a más del tercio interno del epitelio; en general, la afectación

abarca dos tercios del epitelio. Puede acompañarse de alteraciones citopáticas relacionadas con infección por VPH, pero son menos frecuentes que en la displasia leve.

- **Displasia grave- Carcinoma in situ.** Se observan las mismas alteraciones que en la displasia leve, pero afectan a la totalidad del grosor del epitelio. En estos casos, la desorganización es marcada y se observan figuras mitóticas en capas altas. En los casos de displasia grave no se observan alteraciones citopáticas relacionadas con infección por VPH.

-**Carcinoma escamoso.** Los criterios histológicos son, esencialmente, ruptura de la basal del epitelio e invasión del estroma subyacente. La FIGO (International Federation of Gynecology&Obstetrics) distingue entre carcinoma microinvasivo y carcinoma invasor a efectos pronósticos. El carcinoma microinvasor es aquel que no excede en 7 mm de diámetro máximo en superficie y de 3 mm en profundidad a partir de la basal. Cualquiera de los carcinomas escamosos que excede en tamaño una sola de estas medidas se considera carcinoma invasivo.

1.8.4 Características citológicas de las lesiones glandulares

Es muy difícil, si no imposible, definir con precisión las características citológicas de las lesiones que preceden al adenocarcinoma *in situ*. Algunos autores piensan que la displasia glandular endocervical, definida como alteraciones menores que las observadas en el adenocarcinoma *in situ*, es una lesión preneoplásica precursora de éste, e incluso se ha llegado a subdividir esta “displasia” en grados, de forma similar a la subdivisión del epitelio escamoso, pero la reproducibilidad es escasa.

En la clasificación de Bethesda se incluye como atipia en células glandulares (ACG) aquellas con atipia nuclear que sugieren un adenocarcinoma *in situ* pero no cumplen todos los criterios de éste. Es posible diferenciar entre el origen endocervical y endometrial de las células glandulares en buena parte de los casos. Existen varios procesos relacionados con atipia glandular endocervical que deben ser excluidos, como artefacto de la toma, pólipo endocervical, procesos inflamatorios y reparativos, dispositivo intrauterino (DIU), endometritis, células intestinales en fístula recto-vaginal, prolapso tubárico, metaplasia tubárica, hiperplasia microglandular y atipia de Arias-Stela endocervical.

- **Adenocarcinoma in situ.** Presenta las siguientes características citológicas: placas, tiras o rosetas de células glandulares con núcleo hiper cromático, con nucléolo pequeño, alteración de la relación núcleo-citoplasma, dispuestas en empalizada con protuberancia nuclear en los bordes de los grupos celulares y amontonamiento nuclear. El citoplasma es escaso, mal definido y con pérdida de la mucosecreción.

- **Adenocarcinoma invasor.** Se define por la presencia de cambios del adenocarcinoma *in situ* localizados en abundantes grupos celulares planos, irregulares, papilaroides y, ocasionalmente, células aisladas, acompañados de diátesis tumoral, frecuentemente hemorrágica. Se observan, además, una destacada hiper cromasia y nucléolos muy marcados en las células tumorales.

1.8.5 Características histológicas de las lesiones glandulares.

Existen muchas variedades de adenocarcinoma endocervical, cada una con peculiaridades histológicas que tienen correlación citológica. Estos tumores pueden formar luces glandulares, papilas, grupos sólidos y material mucoide. El adenocarcinoma *in situ*, por definición, no atraviesa la membrana basal, a diferencia de las formas infiltrantes.

1.9 DETECCIÓN DE VPH - SECUENCIAS GENOMICAS.

El uso de técnicas moleculares, juntamente con la citología cervical como parte del cribado, nos informa de la presencia de VPH y es de utilidad en los casos de citología cervical con un resultado anormal: ASCUS, AGUS o SIL de bajo grado (150).

Otras investigaciones indican que las pruebas del ADN del VPH podrían llegar a convertirse en un método de screening primario para las mujeres de 35 años o más. En estas mujeres, con diagnóstico citológico cervical negativo, y añadiendo al cribado citológico el análisis de detección de VPH, la sensibilidad para lesión de alto grado se situaría cerca de 80 a 90 % (más elevada que la prueba citológica) y la especificidad oscilaría entre 57 a 89 % (151, 152). Sin embargo, son necesarios estudios poblacionales para valorar su utilidad y demostrar que con su empleo se reduce la tasa de cánceres

invasivos, como se ha evidenciado con la implantación de la citología cervical como método rutinario de cribado. Se debe tener en cuenta que para la detección de lesiones de alto grado, se precisa una elevada sensibilidad y especificidad, y dada la historia natural del VPH, sí que estaría indicada su aplicación en el cribado de mujeres mayores, por encima de los 35-40 años.

El VPH no crece en cultivos celulares convencionales y los ensayos serológicos tienen una utilidad limitada. La infección produce una respuesta inmunológica humoral frente a los antígenos de la cápside y los anticuerpos son detectables durante años, lo que impide distinguir las infecciones recientes o pasadas. Consecuentemente la detección molecular será la estrategia más eficaz.

La detección de VPH por cualquiera de las técnicas moleculares en casos de lesiones intra-epiteliales, solamente informa de la presencia de virus, dato que por sí mismo no nos permite conocer si se trata de una infección transitoria, latente, o bien si producirá lesiones posteriores, o incluso si subyace una lesión en aquel momento.

Las técnicas de detección de VPH consisten en un análisis cualitativo del ADN. Se basan en la detección específica de secuencias de ADN de HPV en la biopsia o en las citologías y algunas de ellas permiten identificar el tipo de virus presente en la lesión. Existen diferentes técnicas de análisis cualitativo del ADN con una amplia diversidad de variaciones y modificaciones de las mismas. Para saber si el DNA de una muestra contiene DNA viral, enfrentaremos el DNA de dicha muestra con un fragmento conocido de un ácido nucleico cuya secuencia es complementaria a la secuencia de ADN del virus, que se intenta detectar. Este fragmento marcado se denomina sonda y el proceso es conocido como hibridación (las sondas marcadas hibridan específicamente con el ADN del virus). Entre ellas presentan diferencias en cuanto a su sensibilidad, especificidad y valores predictivos así como complejidad y reproducibilidad. Básicamente pueden utilizarse células o tejidos en un portaobjetos, o bien células en suspensión.

La Hibridación in situ sobre células o tejidos tiene una sensibilidad escasa pero permite observar la localización de los VPH en las células. No es útil para identificar el genotipo de VPH ya que requiere el uso de múltiples sondas, una para cada tipo de virus, si bien existen sondas para múltiples virus, por ejemplo de alto riesgo.

La Hibridación in situ sobre células en suspensión es el método más utilizado y extendido dada la excelente sensibilidad de la prueba para lesiones de alto grado. Se denomina Captura de Híbridos y en la actualidad se utiliza la de segunda generación.

Alternativas como el southern blot o dot blot han sido abandonadas por poco sensibles y laboriosas.

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos (PCR), muestran también una excelente sensibilidad y especificidad, y constituyen la técnica de elección para detectar e identificar el virus presente en la lesión en muchos laboratorios de Patología.

Se han descrito y se pueden revisar múltiples estudios en los que se determina los límites de sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas y variantes (153). Existe un problema o dificultad en la conservación de la calidad del ADN y de su análisis, ya que una serie de factores técnicos, entre ellos la estabilidad de la muestra durante el transporte y su conservación, son muy importantes para el resultado y pueden ser determinantes para una buena calidad del ADN a estudiar. Para evitar estos problemas, y conseguir una mínima tasa de falsos negativos, el ADN debe estar protegido y asegurar su integridad para poder aplicar los análisis moleculares que se precisen, como entre ellos la detección del gen celular de la beta-globina (154). Existen diversos métodos para la extracción de ácidos nucleicos, que variará en función del test diagnóstico que se emplee. Cada una de las diferentes técnicas detecta un grupo determinado de VPH y para el grupo común de VPH detectados por todas las técnicas, las diferencias en sensibilidad y especificidad son variables en función de los diferentes estudios, aunque su aplicabilidad a nivel práctico es similar (155).

La elevada sensibilidad de las técnicas moleculares, permiten la detección de ADN del VPH en fases muy precoces del desarrollo de un proceso neoplásico, o incluso se detecta virus sin que vaya asociado o acompañado de una lesión pre-neoplásica. Por lo tanto se necesitan definir otros marcadores, con aplicación clínica potencial para identificar entre las mujeres infectadas por VPH, aquellas que presentan un mayor riesgo de desarrollar un cáncer y por lo tanto requerirán un mayor seguimiento o bien serán candidatas a un tratamiento de preferencia quirúrgico (156).

Una de las dificultades técnicas en la valoración de la integración viral, es la pérdida de la región L1 por lo que el virus puede hacerse indetectable para los tests de ADN, definiendo incorrectamente la muestra como negativa.

Otro problema existente es la pérdida de E2, secundaria a la integración en el genoma celular, por lo que E2 no ejerce el efecto represor con la consiguiente sobreexpresión incontrolada de las oncoproteínas E6 y E7. Para valorar la integración viral, puede detectarse la existencia de E2 dado que cuando el virus se integra lo hace siempre rompiéndose por E2. Por tanto si todos los virus de una muestra estuvieran integrados, no

podríamos detectar E2 en dicha muestra. Dado que en una muestra podemos tener virus integrados y no integrados a la vez, la mejor forma de valorar la integración es establecer un cociente E2/E6. Debemos recordar que hay un porcentaje de lesiones tumorales en las que o bien no se ha demostrado integración, o bien coexisten las formas episomal e integrada (157).

La combinación de algunas técnicas con la detección en concreto de los serotipos virales más implicados en la carcinogénesis, da lugar a unos niveles de sensibilidad y especificidad suficientes para la caracterización molecular de las patologías asociadas al VPH.

La identificación de las proteínas oncogénicas E6 y E7, una vez detectada una infección por VPH, puede asociarse a las infecciones producidas por todos y cada uno de los tipos de virus oncogénicos. Asimismo puede relacionarse con persistencia de infección y/o con integración viral. Se puede afirmar también, que la integración viral provoca, un estado persistente de expresión de oncoproteína con independencia de la carga viral. Sin embargo cuando no existe integración se produce también expresión de oncoproteína, y entonces es posible que pudiera relacionarse con la carga viral. Por tanto la integración es una causa suficiente, pero no necesaria, para que las células contengan cantidades de oncoproteína suficiente como para producir un estado de división celular constante sin chequeo del ADN y por tanto posibilidad creciente de acumulo de mutaciones a la vez que posibilidad creciente de integración y por tanto de adquirir un genotipo carcinogenético por cualquiera de las dos vías expuestas o por ambas. En consecuencia, si las oncoproteínas son negativas, se eliminaría prácticamente el riesgo de sufrir alteraciones celulares..

A continuación se describen los diferentes métodos existentes para la detección del DNA

1.9.1 Métodos inmunohistoquímicos. Detección de proteínas del VPH.

Los métodos inmunohistoquímicos permiten la detección de proteínas de la cápside del virus en tejidos determinados. Estos métodos utilizan técnica inmunohistoquímica convencional y marcaje con cromógenos. La sensibilidad es baja y no permite conocer de qué tipo de virus se trata.

1.9.2 Detección de ácido nucleico de VPH. Técnicas de biología molecular.

- 1.9.2.1 Hibridación in situ.

Esta técnica se puede practicar sobre extensiones citológicas o cortes tisulares. Existen varios métodos comercializados que utilizan secuencias de ADN conocidas, “complementarias” a las secuencias de ADN viral, buscadas en las muestras que se deben estudiar. Las secuencias de ADN conocidas corresponden a secuencias comunes de los virus de alto riesgo. Los tests de tipificación comercializados incluyen tres sondas cada una de las cuales detecta a dos o más tipos de virus agrupados según el riesgo de desarrollo de neoplasia (sonda 6-11 de virus de bajo riesgo, sonda 16-18 de virus de alto riesgo, y sonda 31-33-51 de riesgo intermedio).

Brevemente, el procedimiento es el siguiente: 1) se separan las cadenas de ADN objeto de estudio mediante calentamiento de la muestra; 2) se incuba con el ADN conocido, marcado de alguna forma; 3) se enfría la muestra, y 4) si el ADN objeto de estudio reconoce al ADN conocido, este último quedará fijado en la muestra, y se podrá identificar por los distintos cromógenos de revelado utilizados.

El resultado es similar al de la inmunohistoquímica y permite localizar la situación de las células positivas visualizando además su morfología. Ofrece dos tipos de imágenes, una en mancha y otra “granular”. La primera de ellas estaría relacionada con la situación “episomal” del virus y la segunda, con la integración, pero este detalle está pendiente de demostración (158, 159, 160). Su especificidad es elevada, ya que la detección de VPH siempre se asocia a la presencia de lesiones citológicas e histológicas. El inconveniente de esta técnica es su baja sensibilidad.

1.9.2.2 Captura de Híbridos.

El sistema de Captura de Híbridos es un método de amplificación de señal basado en la hibridación de una sonda de ARN debidamente marcada cuya secuencia es complementaria al ADN de VPH. Los híbridos ADN-ARN son capturados y fijados a la pared de una placa por anticuerpos monoclonales y la reacción es detectada mediante un sustrato quimioluminiscente, aportando una señal de medida semicuantitativa. El método proporciona información aproximada sobre la cantidad de ADN viral presente en la muestra y por tanto sobre la carga viral. Se utilizan dos mezclas de sondas que identifican tipos de VPH de alto y bajo riesgo. Los tipos de alto riesgo detectados son 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 y 68, y los tipos de bajo riesgo son el 6, 11, 42, 43 y 44, aunque

en la práctica habitual se aplica únicamente la sonda para detección de virus de alto riesgo. Se han realizado gran cantidad de estudios que han demostrado su precisión y reproducibilidad como método de cribado, por lo que se utiliza y se ha generalizado en muchos países, y además la captura de híbridos de segunda generación (Hybrid Capture 2, HC2), ha sido aprobado por la FDA como test diagnóstico, siendo uno de los test más ampliamente utilizados. Tras un metaanálisis (161), se concluye que el HC2 test es más efectivo (mayor sensibilidad e igual especificidad), que la citología convencional en el cribado de las pacientes con ASCUS, pero no en el caso de LSIL citológicos, debido a la alta tasa positividad de VPH (162). En el caso del seguimiento de pacientes tras tratamiento escisional presenta una alta sensibilidad en detectar recidivas con una no muy baja especificidad, respecto a un seguimiento con sólo citología (163).

En este método no es posible emplear tejido para la detección de VPH. Se trata de un método muy sensible, pero tiene un tanto por ciento de falsos positivos en cuanto a la detección de virus de alto riesgo debido a las reacciones cruzadas con virus de bajo riesgo que la literatura sitúa entre un 6 y un 15% (164, 165). El resultado que se obtiene es una negatividad o positividad para virus de alto riesgo, y además presenta la ventaja que semicuantifica la carga viral. Sin embargo, no permite distinguir entre los diferentes tipos virales ni la presencia de infecciones múltiples.

1.9.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa. PCR.

Es el sistema de amplificación molecular más utilizado en el laboratorio y se basa en la utilización de dos o más oligonucleótidos sintéticos ("primers") que detectan por hibridación un fragmento diana de ADN una vez terminada una reacción de polimerización del ADN problema obteniendo nuevas copias y permitiendo su detección con mayor sensibilidad.

Se puede utilizar en cualquier tipo de muestra, células en suspensión o cortes histológicos. La base del método es similar a la de la hibridación in situ, pero con un paso previo: se procede a la separación del ADN que se va a estudiar y se amplifica un número determinado de veces, de esta forma es mucho más fácil detectar el ADN objeto de estudio porque existen muchas más copias. Sin embargo, es posible que disminuya la especificidad dado que la posibilidad de detectar secuencias similares pero no exactas, aumenta. En consecuencia, el riesgo de falsos positivos es mayor.

La amplificación de un solo genotipo en una sola reacción obliga a múltiples ensayos para cubrir una diversidad de genotipos adecuada por lo que no es idónea para técnicas de

cribado en las que se desconoce los tipos que podrían ser infectantes. Por este motivo se ha generalizado la utilización de “ primers “ que reconocen regiones conservadas del genoma vírico, especialmente L1 y en menor medida E6. Los primers consenso que reconocen la región L1 permite la amplificación de la mayoría de los tipos de VPH muconasales. Los primers consenso MY09/11 son los clásicamente utilizados pero tienen en contra el gran tamaño del fragmento diana (450 pares de bases (bp)), lo que disminuye su sensibilidad. Así se diseñaron variantes como PGMY09/11 en las que un cóctel de cebadores sustituye a los MY09/11 con un relativo aumento de sensibilidad y espectro de detección viral. Por el contrario los primers SPF1/2 amplifican un fragmento muy corto (65bp) lo que le hacen ideal en muestras con ADN parcialmente cortado, como las incluidas en parafina. Con un tamaño intermedio (150-170 bp), los primers GP5/GP6, o su variante mejorada GP5+/6+ y los utilizados en distintos test comerciales obtienen mejores resultados y una mayor sensibilidad respecto a los otros primers consenso. Uno de ellos, el test Amplicor, incluye una mezcla de sondas de 13 tipos de alto riesgo y coamplifica el gen de la globina celular como control de la calidad de la muestra (166).

Si los “primers” detectan la presencia de VPH en una muestra determinada, se practica una segunda PCR utilizando enzimas de restricción para tipificar el virus. Empleando ambas PCR, se consiguen altas sensibilidades y especificidades. Molden et al (167), refieren una especificidad menor que el test captura de híbridos con una similar sensibilidad.

La PCR específica se basa en el diseño específico de “primers” para regiones diferenciales entre los diferentes VPH, por lo que su sensibilidad es muy elevada, ya que se pueden amplificar específicamente los oncogenes virales, (por ejemplo E6) de un determinado tipo, subtipo o variante viral. El uso de estos “primers específicos” permite ajustar las condiciones de la reacción a sensibilidades de femtogramo con especificidades próximas al 100%. Entre los “primers específicos”, se encuentran:

- Hibridación inversa. SPF-PCR
- RFLP.
- PCR en tiempo real.
- Array.
- Ensayo multiplex-“luminex”.

- Hibridación inversa. SPF-PCR

Es un procedimiento que combina la PCR y la técnica de hibridación. Se conoce como hibridación inversa en fase sólida y consiste en la amplificación, mediante PCR, de una región muy pequeña de la región L1 común a diferentes VPH y posteriormente se hibridan con oligonucleótidos específicos de múltiples tipos fijados a un soporte de nitrocelulosa o nylon. Existen varios métodos comercializados con muy buen rendimiento: por ejemplo INNO-LIPA, que utiliza SPF10 como primers, amplifica pequeños fragmentos de 65 bp en la región L1 y detecta 28 tipos de VPH; y el line-blotting, linear array (PGMY-LB) que utiliza una mezcla de primers (PGMY09/PGMY11) y puede discriminar 37 tipos de VPH. Ambas técnicas son similares en cuanto a complejidad y requerimientos técnicos, y su gran ventaja es la facilidad en detectar infecciones por múltiples tipos virales (168, 169, 170).

- PCR-RFLP

Consiste en amplificar por PCR y someter el producto amplificado a la acción de endonucleasas de restricción. El patrón de corte (número y tamaño de los fragmentos) puede discriminar la mayoría de los genotipos. Este método permite combinar la sensibilidad de la PCR con el poder discriminatorio de las endonucleasas de restricción. Es un sistema poco laborioso y menos costoso que LIPA y secuenciación. Tiene el inconveniente de que en las infecciones múltiples puede ser muy complicada su interpretación al sumarse los diferentes patrones de los genotipos presentes en la muestra (171).

-PCR en tiempo real.

Es una modificación del procedimiento convencional de la PCR mediante el cual puede ser detectado el producto amplificado a la vez que se sintetiza. Si lleva acoplada sondas marcadas específicas de tipo puede ser una técnica de genotipado además de realizar una cuantificación más precisa que la PCR convencional. Su versatilidad no es muy alta ya que en cada reacción no suele detectar más de cuatro marcajes distintos pero, gracias a la rapidez de la reacción (inferior a los 30 minutos), existen diversos prototipos en el que un algoritmo diagnóstico permite detectar los genotipos más importantes (172, 173).

- Arrays.

Como en los anteriores, también va precedido de una PCR de la región L1, que marca el producto amplificado del ADN viral, y se hibrida con los oligonucleótidos de la mayoría de los genotipos virales, que están dispuestos en microarray, que es un soporte con diseño de chip. Se generan sondas a cada tipo de VPH y se fijan a las zonas de reacción. La muestra se amplifica con "primers" genéricos marcando con Cy5 el producto amplificado.

La interpretación se realiza midiendo la señal de lectura de un marcador quimioluminiscente o fluorescente. Se están comercializando diversos ensayos de los cuales el clinical array es el más extendido, y en éste el chip se dispone en el fondo del tubo de reacción, facilitando el procedimiento (174, 175, 176).

- Ensayo multiplex con tecnología “luminex”

Es un sistema con un fundamento similar a los arrays en el que se utilizan microesferas con diferente espectro de excitación fluorescente, por lo que se pueden preparar sondas de los distintos genotipos unidas a las microesferas y utilizar tantos tipos de éstas como genotipos se quieran identificar en la muestra, utilizando incluso hasta cien sustancias marcadoras distintas. La lectura se realiza en un citómetro capaz de detectar la señal de fluorescencia distinta para cada sonda y de este modo detectar los tipos presentes en la muestra. En función de la intensidad de la señal también es posible cuantificar la reacción para cada genotipo (177).

En resumen, la reacción en cadena de polimerasa-PCR, puede ser utilizada para la detección, la cuantificación, la secuenciación y el análisis mutacional.

En cuanto al valor clínico real de esta prueba se debe considerar que en las lesiones de alto grado y carcinomas invasores, tanto los carcinomas escamosos como los adenocarcinomas, la detección de VPH de alto riesgo tiene poco valor ya que en la actualidad se sabe que prácticamente la totalidad de estos casos contienen VPH de alto riesgo. Podría, sin embargo, tener valor en la detección de metástasis así como valor pronóstico en el seguimiento de las pacientes después del tratamiento quirúrgico por lesiones de alto grado. En el caso de las lesiones de bajo grado (L-SIL, displasia leve), tampoco tiene mucho valor ya que se sabe, que aproximadamente un 20% de estas pacientes evolucionará a lesiones de alto grado, pero la detección de VPH de alto riesgo es positiva en el 85% de las pacientes con L-SIL (ALTS), (178), por lo que no nos proporciona una información útil, ya que no sabemos en concreto cuáles serán las pacientes evolucionarán hacia una lesión de alto grado. Si que podría tener más relevancia clínica en el caso de ASCUS, ya que la presencia de VPH de alto riesgo solamente se produce en, aproximadamente, un 40-50% de los ASCUS, y éstos serían los casos de riesgo que podrían evolucionar a lesiones de alto grado, o aquellos casos en que en el ASCUS se esconde o pasa desapercibida una ya existente lesión de alto grado (148).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR), es una prueba de gran sensibilidad y especificidad, sin embargo su coste es elevado y además requiere un personal y laboratorios especializados, ya que en caso de no cumplir este requisito existe el problema de contaminación o de interpretaciones diagnósticas erróneas

1.9.2.4 Secuenciación automática de ADN

La secuenciación de ADN es la obtención de la secuencia de nucleótidos que conforma una determinada región del ADN viral. Es la tecnología “definitiva” para el genotipado del virus, y es sin duda el patrón de referencia para cualquiera de las técnicas anteriores. Es la que aporta la mayor cantidad de información, ya que mediante este método se puede amplificar o clonar cualquier fragmento del ADN viral y determinar su composición nucleotídica y enfrentándola a la base de datos que contiene todas las secuencias conocidas de VPH determina ante qué tipo, subtipo o variante se encuentra. La instrumentación automática ha simplificado mucho el procedimiento y es la técnica imprescindible si estamos ante un posible nuevo genotipo cuya descripción se basa en comparar con el resto de genotipos descritos cuyas secuencias están almacenadas en las bases de datos de Genbank. Para la identificación rutinaria de los genotipos de una muestra no se necesita tanta potencia discriminativa, además las coinfecciones son difíciles de interpretar. Sí que es útil para realizar subgenotipado, por lo que es de interés en determinados tipos como el VPH 16. Su principal inconveniente es su coste y el hecho de necesitar laboratorios de alto nivel que ofrezcan o dispongan de esta metodología. La ventaja, además de obtener una tipificación directa e inequívoca, es el poder distinguir variantes y polimorfismos virales, que actualmente se considera una variable de riesgo importante de transformación neoplásica y que además se suma a la presencia de nuevos tipos virales.

1.9.3 Detección de lesión celular.

Consiste en la detección de diferentes productos presentes en las células en condiciones normales, que aumentan en cantidad en relación con la presencia del virus y el daño que produce. En este apartado describiremos los distintos productos bioquímicos que pueden detectarse como resultado del daño bioquímico que produce la infección por VPH en las células.

1.9.3.1 Proteína P16^{INK4a}

En patología cervical, son pocas las determinaciones inmunohistoquímicas que pueden ayudar al diagnóstico, principalmente Ki-67 para biopsias y p16 en citologías y biopsias, en concreto el p16^{INK4a}, que es una proteína codificada por el gen supresor CDKN2 (MST1, INK4a) situado en el cromosoma 9p21, inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas, cdk4 y cdk6, que participan en la regulación de la fase G1 del ciclo celular, y en concreto regula la pRb. Como se ha comentado antes, la proteína E7 es capaz de interferir con pRb y la E6 con p53, la ubiquitina las marca rápidamente y, por consiguiente anula su función y se consigue una célula que cycle constantemente (ausencia de actividad de pRb) y que no compruebe el buen estado de su ADN con el objeto de buscar mutaciones y repararlas (ausencia de actividad de p53). Cuando en la célula existe mucha cantidad de pRb, p16^{INK4a} desaparece, y a la inversa, cuando no existe pRb, p16^{INK4a} aumenta en cantidad. Consecuentemente, si pRb es prácticamente anulado por E7, la cantidad de p16^{INK4a} aumentará. Por lo tanto, la detección de p16^{INK4a} tanto en células como en tejido, podría relacionarse con la existencia de una infección de VPH de alto riesgo y con una alteración de la maduración epitelial de grado variable.

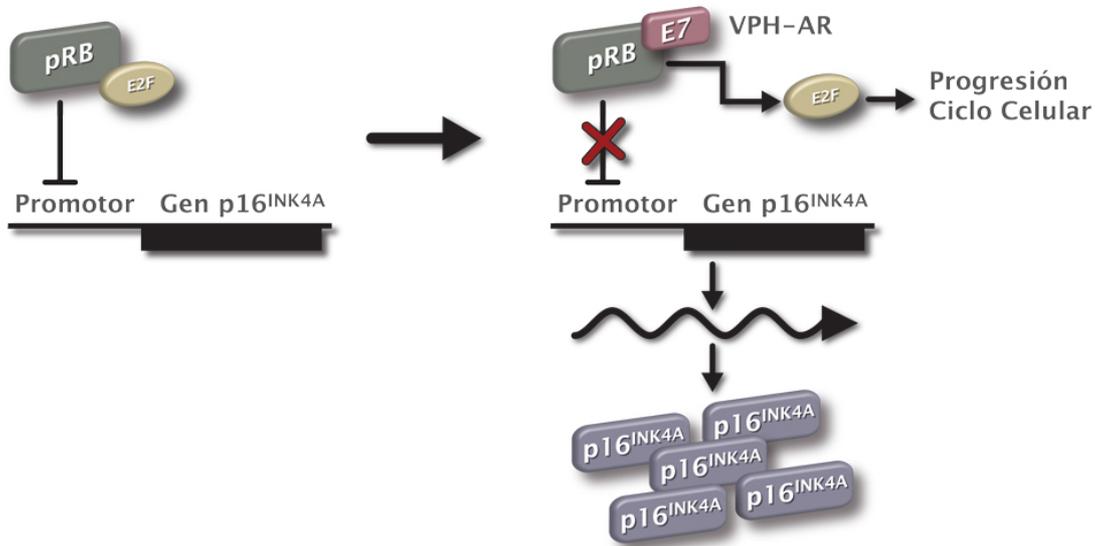


Figura 5: Mecanismo de la sobreexpresión de p16^{INK4a} en células precancerosas y cancerosas.

Los estudios practicados en muestras citológicas demuestran que p16^{INK4a} es un buen marcador de lesión intraepitelial, e incluso en ASCUS indica la posibilidad de lesión de alto grado. Meyer et al (179), evalúan la expresión de p16^{INK4a} en citología líquida en LSIL y ASCUS y confirmado con histopatología en casos de alto grado, con una sensibilidad de 100% y encuentran mayor especificidad para la detección de CIN-2 comparado con HC2 (68% vs 19 % respectivamente). Similares resultados comparando p16^{INK4a} con HC2 (180). Wentzensen et al. (181), investigan la eficacia de p16^{INK4a} como bio-marcador en identificar muestras con CIN alto grado entre citologías convencionales con resultado de ASCUS o LSIL, y utiliza una evaluación cuantitativa contando las células p16^{INK4a} positivas y una evaluación cualitativa usando una puntuación según los cambios del núcleo de la célula, demostrando una buena correlación entre la p16^{INK4a} en muestras citológicas y la p16^{INK4a} en biopsia. Se ha estudiado en citología convencional tanto ASCUS y LSIL con seguimiento anatómo-patológico, como en AGC-células glandulares atípicas (182).

También se ha demostrado su utilidad en citología líquida (183, 184, 185, 186, 187, 188, 189) y en biopsias, por lo que el p16^{INK4a} ayudaría a clarificar la aún confusa definición de lesión displásica de bajo grado y a distinguir las verdaderas lesiones displásicas con alto riesgo de progresión de aquellas que más bien podrían ser definidas con el término más general “efecto citopático inducido por VPH” (189,190). Otro estudio también defiende un mayor valor predictivo positivo con una probable futura reducción del número de colposcopias (191).

Los análisis practicados en las biopsias, demuestran la utilidad de p16^{INK4a} para marcar displasias, tanto del cuello de útero como alteraciones de la maduración epitelial relacionadas con infección por VPH en epitelios escamosos fuera del cuello de útero (192).

1.9.3.2 Proteína Ki-67

Ki-67 es una proteína que se expresa durante el ciclo celular, en especial en las fases G2M y S, y por lo tanto, debe hallarse inmunorreactividad en células que estén ciclando. Respecto al mecanismo de oncogénesis, la expresión de Ki-67 sería mayor en las alteraciones de la maduración epitelial que en los epitelios normales. En condiciones normales, Ki-67 se expresa en la capa suprabasal del epitelio cervical, aparece en capas superiores y es más intensa a medida que se incrementa el grado de displasia. La expresión de Ki-67 detectada mediante métodos inmunohistoquímicos no tiene valor

pronóstico (193). Algunos autores han explorado el valor Ki-67 en muestras citológicas y en concreto junto a la expresión inmunohistoquímica de p16^{INK4a}, y concluyen que se necesitan más estudios a largo plazo incluyendo tests moleculares para VPH de alto riesgo (194).

1.9.3.3 Oncoproteínas.

La cantidad de oncoproteínas puede ser estimada mediante la detección de un marcador de expresión proteica como es el ARN mensajero de E6 y E7, dado que por el momento no es posible detectar las proteínas E6 y E7 inmunohistoquímicamente. Es un indicador de la integración y expresión de estos genes y permite identificar células con potencial real de transformación. Diferentes estudios llegan a la conclusión que con la misma sensibilidad que una determinación de ADN de HPV, mejora la especificidad demostrando su utilidad en la selección de las mujeres con citología ASC-US o LSIL que tienen riesgo de progresión. Este hecho es debido a que aunque exista y se tipifique un virus de alto riesgo, independientemente de la tasa o de la cantidad detectada, no queda claro ni significa que de manera obligatoria se expresarán las proteínas que son capaces de afectar al ciclo celular y de provocar la inmortalización de las células infectadas secundaria a la integración viral. Existe un porcentaje de lesiones tumorales en que coexisten formas episomal e integrada, por lo tanto puede haber una gran cantidad de virus que expresen cantidades mínimas de oncoproteína, o bien al revés, una pequeña cantidad de virus que expresen tasas altas de proteína.

Existen diversos test de laboratorio con el objetivo de detectar estas proteínas de expresión temprana que se requieren para iniciar y completar el ciclo vital del VPH (latencia, replicación, maduración) y para caracterizar las propiedades biológicas asociadas a un potencial oncogénico. Entre ellos:

- Detecta el ARN m E6/E7 de 14 genotipos (Aptima^R - Gen Probe): VPH 16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-66 y 68 a partir de citología líquida. Amplifica el ARN m del HPV mediante un control de transcripción interno de amplificación mediado por una vía de transcripción (TMA) usando una transcriptasa inversa y T7 ARN polimerasa (195).
- Detección directa de ARNm de E6/E7 de 5 genotipos: VPH 16, 18, 31, 33, 45. (Nuclisens^R- Easy Q HPV- Biomerieux). Se aplica desde el mismo material recolectado a través de citología líquida (196).

- Cuantificación de E6/ E7 ARN m mediante hibridación in situ, y no destruye la célula durante el proceso de detección por lo que la conserva intacta y se pueden cuantificar el número de células que expresan oncoproteína (HPV Oncotect^R E6, E7- Invirion diagnostics) de todos los genotipos virales independientemente de la categoría de riesgo. El análisis de los datos se realiza mediante citometría de flujo (197, 198).

1.10 UTILIDAD CLINICA DEL DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL VPH

El desarrollo de ensayos de detección de ADN altamente sensitivos ha revolucionado y ha contribuido al diagnóstico del VPH y ha permitido a su vez el estudio de varios aspectos cruciales de las infecciones por el VPH. Los resultados de los test son siempre interpretados y realizados con sumo cuidado y a su vez para poderlos aplicar a nivel clínico requieren un largo proceso previo de validación en laboratorio (199). Está claro y es evidente que se necesita un control de calidad, internacional y bien caracterizado que compare los diversos y varios métodos diagnósticos.

Se necesitan aún más estudios y futuras pautas en cuanto a las implicaciones de la detección del ADN del VPH en el control de las pacientes. Muchos y recientes estudios han demostrado que la prevalencia del ADN del VPH y de múltiples genotipos de VPH en la misma paciente es más elevado que lo que se esperaba. También, la eficacia de los estudios de screening de VPH a nivel de amplias comunidades, depende de la exactitud y de los valores predictivos de los ensayos o tests diagnósticos utilizados. Además, para identificar las mujeres que presentan un riesgo elevado de desarrollar un carcinoma de cérvix, está claro y es bien conocido que la detección del ADN del VPH como prueba única es insuficiente, y se están desarrollando nuevos algoritmos los cuales combinan con el screening citológico y el análisis del ADN del VPH, con el objetivo de optimizar los valores predictivos negativos y positivos para el desarrollo de la enfermedad (119).

En un metaanálisis (200), que compara el test de VPH con la citología, con el objetivo de determinar la exactitud en la detección de neoplasias intraepiteliales de alto grado que pasan desapercibidas o infradiagnosticadas a nivel de un screening primerio de cáncer de cérvix, concluyen que comparado con la citología, el HC2 y el PCR son sustancialmente más sensitivos para la detección de un CIN II existente o un grado mayor, pero significativamente menos específico. La combinación del test HC-2 y la citología

presentan la más elevada sensibilidad y la más baja especificidad. Sin embargo, también concluyen que aún no se ha demostrado una reducción de la incidencia o de la mortalidad secundaria a cáncer cervical invasivo, entre las pacientes sometidas a cribaje sólo citológico, comparadas con el grupo de pacientes en las que se determinó el VPH.

Independientemente del screening o del cribado, es esencial la determinación de un test exacto de tipificación del genotipo del VPH para poder establecer una adecuada clasificación de los pacientes en los dos diferentes grupos de bajo riesgo o de alto riesgo. Existe evidencia y se sugiere, que la presencia de múltiples genotipos de VPH podría reflejar una exposición repetida al mismo y podría estar relacionado con el aumento de riesgo de progresión de la enfermedad (201). Sin embargo es controvertido ya que no existe una evidencia concluyente (202). La persistencia durante largo tiempo de la infección por VPH también ha sido identificada como un importante factor de riesgo y debería ser incluido en los algoritmos de propuesta de la aplicación de tests clínicos (17, 114). Sin embargo, una infección por VPH, únicamente podría ser clasificada como verdaderamente persistente, en el caso de que idénticos tipos o subtipos sean detectados en muestras consecutivas durante los estudios de seguimiento. La carga viral también podría ser válida como predicción de enfermedad, aunque actualmente obtener medidas exactas de cuantificación de carga viral es técnicamente difícil en las muestras clínicas.

Además, la introducción reciente de la vacunas y el posible desarrollo de terapias antivirales tipo-específicas, requiere la introducción de algoritmos específicos para la detección y genotipificación del VPH (203). Estos métodos son también necesarios para un exacto seguimiento durante los ensayos clínicos, monitorización de tratamientos antivirales o tras tratamiento quirúrgico así como en el screening y en el seguimiento de pacientes.

Se necesitan amplios estudios epidemiológicos, para poder llegar a organizar una detección precoz del cáncer de cuello de útero a nivel mundial y para conocer la distribución geográfica de los diferentes genotipos del virus. Debido a la sustancial heterogeneidad genética de los VPH y de la posible relevancia clínica de los subtipos específicos, se utilizarán nuevos instrumentos moleculares específicos, por lo que se desarrollarán nuevas pruebas de ADN, de baja o alta densidad (ADN chips) con una tecnología adecuada para poder llegar a realizar todos estos estudios.

Por lo tanto, y en resumen, existirán dos grandes caminos hacia los que irán dirigidos el uso de los tests moleculares. La primera aplicación va dirigida a identificar las mujeres

con riesgo de desarrollar un cáncer cervical, tanto a nivel general en una comunidad y a nivel de programas de screening en general, o en aplicación clínica concreta. En estos casos, un test de detección de VPH altamente sensitivo, sobreestimarán de manera elevada la proporción de mujeres que presenten anomalías citológicas de bajo grado. Un test cuantitativo o menos sensitivo, podría ser más efectivo en identificar las mujeres con riesgo de progresión, mejorando tanto los valores predictivos positivos como negativos (204). Es también muy importante, que se detecten solamente los genotipos de alto riesgo, que son los que están asociados con un riesgo significativamente incrementado de desarrollar un carcinoma cervical. La segunda área o el segundo campo de aplicación de los test de VPH incluyen los ensayos de las vacunaciones, los estudios epidemiológicos y los estudios de historia natural del virus. A diferencia de la aplicación clínica, se requieren test o estudios altamente sensitivos y reproducibles, que evalúan el más amplio posible espectro de los genotipos de VPH. El principal objetivo de estos estudios es obtener la máxima información acerca del status del VPH en la población y en diferentes zonas geográficas y monitorizar la evolución de las infecciones con detalle. Por ejemplo, durante los estudios de vacunación, ayudarán a determinar la eficacia de la vacuna y la posible reacción cruzada con otros subtipos de VPH. Para que fuera útil y práctico en ambos campos, sería ideal poder obtener un test único de detección de VPH, con un "punto de corte" ajustable y unido a un método de genotipado. Actualmente este método no existe, y los algoritmos de diagnóstico y screening están compuestos por la combinación de tests diferentes y complementarios entre sí. No sólo esto, sino que aún faltaría por analizar la utilidad de otro tipo de marcadores, como por ejemplo los detectores de lesión celular, y llegar a conocer entre éstos cual sería su real utilidad y aplicabilidad clínica.

1.11 CAMBIOS Y/O AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE LAS L-SIL

Antes de la introducción de la colposcopia, cuando se obtenía un resultado anómalo en la citología se recurría habitualmente a la conización, la cual estaba considerada como técnica diagnóstica y terapéutica de estas lesiones. La colposcopia promovió el desarrollo de procedimientos terapéuticos ambulatorios al obtener más información acerca del tamaño, aspecto macroscópico y localización de estas lesiones antes de elegir el tratamiento. La ablación por láser, bien vaporización en lesiones iniciales o la conización, suplantó a la crioterapia y a la diatermia en los años 80 e inicio de la década del 90,

siendo sustituida entonces por la LEEP y la LLETZ, al ser procedimientos escisionales ambulatorios menos caros y técnicamente menos difíciles. Los resultados son más o menos similares con ambas técnicas con tasas de negativización prácticamente iguales (205, 145). La tasa de fracasos, bien sean persistencias o recidivas, para todos los procedimientos cervicales se ha asociado mayoritariamente con el tamaño de la lesión y en menor medida con el grado histológico, aunque recientemente la positividad para el VPH después del tratamiento, ha mostrado ser el mejor predictor de enfermedad persistente. A pesar de las altas tasas de éxito alcanzadas con todas las modalidades (90-95%), la tasa de cáncer invasivo de cuello uterino o de vagina después de un tratamiento escisional ha mostrado ser de al menos 2,8 veces la de la población general hasta 20 años después del tratamiento (206). Por lo tanto para asegurar una protección máxima, es fundamental que las mujeres acudan regularmente a las visitas de seguimiento postcirugía con el fin de facilitar la posible detección de alteraciones residuales o recurrentes en un estadio tratable. Varios estudios realizados durante los últimos 5-10 años han indicado claramente que si una prueba de detección del VPH es negativa 6 meses después del tratamiento, el riesgo de fracaso terapéutico es tan bajo que la paciente puede volver a un protocolo habitual de citologías periódicas.

Una vez transcurridos los 20 primeros años después de la introducción de la colposcopia y de las opciones terapéuticas ambulatorias, el tratamiento de las lesiones de bajo grado (CIN-1) se trataban de la misma manera que las lesiones de alto grado (CIN 2-3). Este hecho se produjo, en parte, por la disponibilidad de modalidades terapéuticas ambulatorias de bajo coste como la crioterapia y la LEEP y también por la presunción de que el CIN era de naturaleza progresiva, de CIN-1 a CIN-2 y CIN-3 y, eventualmente, a cáncer de cuello de útero invasivo. Por lo tanto, todos los grados de CIN se consideraban susceptibles de tratamiento con el objetivo de prevenir el supuesto o esperado riesgo de progresión. El posterior reconocimiento progresivo de que no todas las CINs tienen una evolución progresiva de bajo a alto grado y de que sólo los casos de CINs de alto grado, en concreto las CINs/carcinoma in situ, son los que constituyen un indicativo de un pre-cáncer verdadero, llevó a elaborar las Guías de Consenso 2001 de la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP) (121) y las Guías de Manejo del Programa de Cribado Cervical del Reino Unido (207), en las que se especifica que la conducta clínica adecuada a seguir en las mujeres diagnosticadas de lesión intraepitelial de bajo grado (CIN-1, L-SIL) se basa en continuar un seguimiento expectante sin tratamiento, ya que al menos un 70% de estas lesiones remite espontáneamente y ya se

dispone del tiempo necesario para detectar y tratar el 30% restante mientras todavía sean benignas. Como se ha comentado antes , sólo aconseja tratamiento excisional en los casos de colposcopia insatisfactoria, legrado endocervical positivo, lesiones muy extensas, lesiones que persisten durante largo tiempo y en mujeres de más de 40 años. En el año 2005, las guías de consenso elaboradas por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) sobre la conducta a seguir en el caso de resultados anómalos en la citología cervical ratificaron estas recomendaciones (208).

1.12 POSIBLES CAMBIOS FUTUROS DE LOS RESULTADOS POSITIVOS DE LA CITOLOGÍA CERVICAL.

La estrategia tradicional de la prevención del cáncer de cuello uterino, que consiste en la detección mediante citología cervical y tratamiento de cambios histológicos- está siendo paulatinamente sustituida por una dinámica o estrategia en la que el objetivo de la prevención se centra en la detección del agente causal (VPH) y también en la administración de vacunas contra el mismo. Por lo tanto, es probable que los algoritmos o pautas de conducta clínica, cambien a causa de los siguientes motivos:

- Son muchas las evidencias de que la detección de los tipos del VPH 16 y 18 pueden constituir un criterio de selección más específico para anomalías citológicas equívocas y de bajo grado y para el manejo post-colposcopia (71).
- La detección de los VPH de alto riesgo podría convertirse en la prueba de cribado primaria, seguida de la citología de Papanicolau o de pruebas de detección de tipos específicos del VPH en el caso de resultados positivos.
- Las vacunas contra el VPH tendrán un impacto significativo sobre las tasas y la distribución de resultados anómalos en las citologías y este hecho puede repercutir en las necesidades de cribado y de prevención secundaria, que hasta ahora han reportado buenos resultados.

En el estudio ALTS, el riesgo de resultados positivos para LSIL, sin saber el tipo del VPH, para predecir la detección de CIN-3 o mayor a lo largo de un periodo de dos años fue de menos de la mitad del riesgo documentado de LSIL que diera positivo para el VPH 16, en cambio el riesgo de ASCUS se triplicó cuando se detectaba el VPH de tipo 16. En cambio, el riesgo de ASCUS o LSIL positiva para cualquier otro tipo de alto riesgo fue sustancialmente menor, lo cual indica que las pruebas específicas para los VPHs 16 y 18 pueden desarrollar un papel importante en la estratificación de riesgo y constituir una

estrategia futura de conducta a seguir, sobretodo en el seguimiento post-colposcopia y podría ser en el seguimiento expectante de la CIN-1. Pero existe una dificultad, sabiendo que la inmensa mayoría de mujeres con L-SIL, son VPH positivas, la detección de ADN viral o la tipificación del virus, no permite ningún tipo de selección y no es coste-efectiva. Además falta determinar aquellas pacientes con resultados positivos para LSIL, por otros tipo de VPH altamente oncogénico que no sean VPH 16 ni VPH 18, que desarrollarían una lesión de alto grado, por lo que la tipificación del virus no sería suficiente y sería más adecuado implantar otras técnicas de detección viral o de sus proteínas que nos ayudarían a discriminar y predecir los casos con posibilidad de progresión.

Por lo tanto si se pretende un alto nivel de eficacia en la prevención del cáncer de cérvix, es necesario continuar con programas de detección precoz de cáncer de cuello uterino que se dirijan tanto a la vacunación contra el VPH como al cribado continuado, y también a una conducta de seguimiento rápida y eficaz en los casos positivos del cribado, utilizando biomarcadores moleculares que identificarían las proteínas que serían indicadores cuantificables de los efectos de exposición y de la susceptibilidad o del estado de la lesión.

1.13 CICLO CELULAR DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO. PATOGÉNESIS Y ONCOGENESIS.

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae, que se encuentra ampliamente distribuida por la naturaleza. Es un virus pequeño, de apenas 55 nm, sin envoltura, con una cápside icosaédrica, compuesta de 72 capsómeros pentaméricos, que encierra un ADN circular de doble cadena. Su genoma está constituido por unos 7.900 pares de bases. Los capsómeros están compuestos por dos proteínas estructurales: L1 que forma el 80% de la partícula viral y L2 que es la proteína menor de cápsides, de 43-53 kD. El genoma es una molécula de doble cadena de ADN organizada con 8 a 10 marcos de lectura abierta (ORFs) la cual es semejante para todos los VPH.

El genoma está estructurado en tres regiones funcionales:

1) la región larga de control, LCR (long control region) o también denominada zona reguladora superior no codificada, URR (upper regulatory region) que no tiene potencial

para codificar proteínas, pero si importantes elementos de regulación transcripcionales y replicacionales y donde se localizan los promotores que inician la replicación.

2) la región temprana con los genes E1 a E8 (región early) que se transcribe al inicio del ciclo vital del virus y codifica las proteínas necesarias para la replicación, la transcripción y la proliferación celulares.

3) la región tardía con los genes L1 a L2 (región late) que codifica proteínas estructurales de la cápsula y que se expresa al final del ciclo vital. Las proteínas E1 y L2 son necesarias para la replicación extracromosómica del virus y existen para poder completar el ciclo vital del virus.

Si se toma como modelo el VPH 16, es posible esquematizar el mapa genómico.

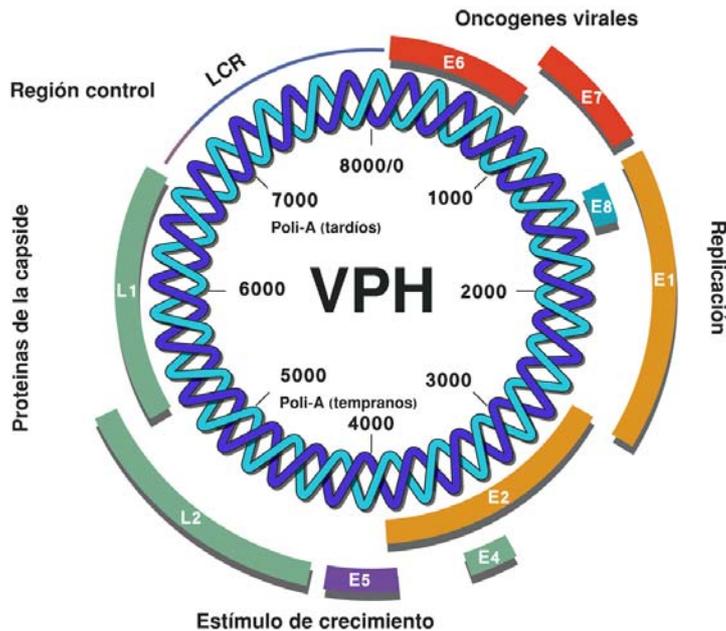


Figura 6: esquema del mapa genómico del VPH 16 (IARC adaptado) (28).

Estructura de aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región de control largo (LCR) y 8 regiones de lectura abierta (ORF) .

Las funciones de las proteínas codificadas de los genes se describen en la siguiente tabla (tabla 6). El genoma del VPH no codifica las enzimas necesarias para la replicación del

ADN y la transcripción viral; por ello, tiene que utilizar el mecanismo celular para replicarse, mediante sus tres proteínas de transformación: E5, E6 y E7.

TABLA 6: PROTEINAS DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO Y SUS FUNCIONES ASOCIADAS

Proteína	Función
E1	Iniciación y represión de la replicación del ADN vírico
E2	Proteína reguladora de la transcripción y de la replicación vírica.
E3	Función no conocida.
E4	Proteína que forma filamentos citoplásmicos. Interacciona o rompe la citoqueratina.
E5	Proteína que se une a la membrana celular, estimulando la transformación, e interacciona con los factores de crecimiento celular.
E6	Proteína con capacidad de transformación de la célula. En los VPH oncogénicos se une a p53, gen supresor tumoral , y provoca su degradación.
E7	Proteína transformadora. Inhibe la función de la proteína del retinoblastoma (pRb) del gen supresor tumoral.
L1	Proteína mayor de cápside.
L2	Proteína menor de cápside.

Si se intenta explicar el modelo de infección por virus papiloma humano (VPH) de alto riesgo, utilizando partículas de virus, se ha evidenciado que el virus se transmite con facilidad por contacto sexual, probablemente a través de erosiones mínimas o imperceptibles de la piel o mucosas. El cuello del útero es especialmente vulnerable al contagio, probablemente a través del epitelio metaplásico de la unión escamo-cilíndrica, y a la permanencia de la infección. Los VPH, al igual que otros virus, aprovechan la dinámica celular para replicarse, y en el cuello del útero, en particular la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi terminal (209). En primer lugar en las capas basales, hay genes promotores que inician la

replicación . Los genes E1 y E2 codifican las proteínas encargadas de modular la replicación del ADN viral (pE1 y pE2) actuando sobre la zona LCR, y después, en las capas superficiales más diferenciadas, se expresan sus proteínas tardías (L1 y L2), que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que se liberan y repiten el ciclo infeccioso (142). Dicho receptor de la célula basal ha sido asociado estructuralmente con Heparán Sulfato para los tipos virales 16-33 y con Alfa-6-Integrina para VPH 6 (210). Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, proceso conocido como endocitosis. Se han reconocido dos sistemas: el primero involucra un complejo proteico llamado Clatrina, utilizados por los tipos 16 y 18; el segundo, utiliza un grupo de proteínas principalmente Caveolina, denominado endocitosis por caveolas, en el que participa el tipo 31. Posteriormente a la endocitosis, se conoce a través de modelos de infección por partículas virales tipo 11 y 16 que la cápside viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfido que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (211).

Existiría una población viral no productiva, localizada en el estrato basal, en la cual se mantendría la replicación del ADN viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extracromosómica, llamados episomas y que se estructurarían en base a histonas y material genético. Durante esta fase tendría lugar una distribución difusa del ADN viral por las células basales proliferantes manteniendo un número reducido de copias e impidiendo la activación de la respuesta inmune. Las células basales proliferantes migrarían a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante (URR), por lo que permitiría producir ADN en múltiples copias por célula; estas etapas durante el ciclo viral son conocidas como fase vegetante, proliferante o productiva. En este proceso de replicación del ADN viral participan un grupo de proteínas con unas características determinadas.

Se sabe que la zona de rotura del genoma vírico se sitúa en E1 y E2, por lo que queda alterada su función; E1 y E2 son reguladoras en un sentido represor de la actividad

transcriptasa de E6 y E7. Es necesaria la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 para que se produzca la inmortalización-proliferación celular.

El ciclo comienza cuando las partículas infecciosas a través de pequeñas roturas, la capa basal del epitelio donde se unen a las células y las penetran. Se ha sugerido que, para mantener la infección, el virus debe infectar una célula madre epitelial. El ciclo de replicación en el interior del epitelio puede dividirse en dos partes. En primer lugar, el genoma viral se replica hasta un número de aproximadamente 100 copias y durante períodos variables de tiempo mantiene este número bajo de copias en estas células inicialmente infectadas pero que todavía son competentes y capaces de replicarse. Las proteínas virales E1 y E2 son esenciales para esta fase de replicación basal de ADN. Se puede especular que durante la persistencia viral, el sistema inmunológico mantiene la infección en este estado.

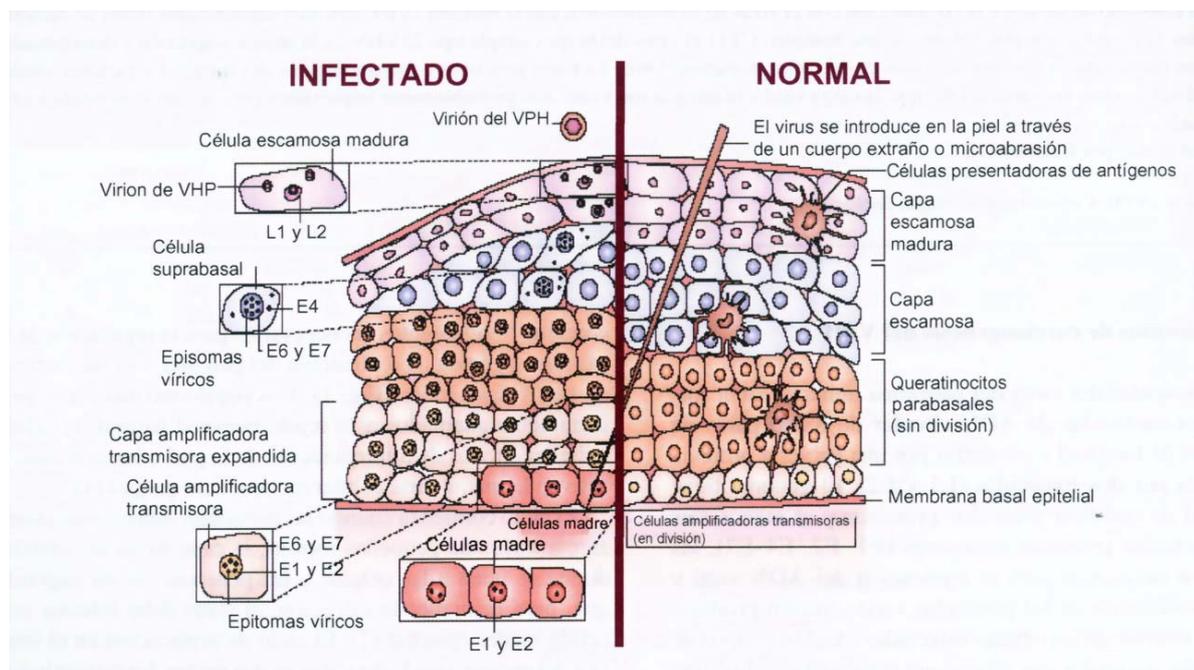


Figura 7: Localización en el epitelio escamoso de las principales etapas del ciclo vital del VPH: En el epitelio escamoso normal, las células hijas de las células madre epiteliales se dividen a lo largo de la membrana basal y luego maduran verticalmente a través del epitelio sin volver a dividirse. Después de la introducción del VPH en las células madre en la capa basal del epitelio, se produce la expresión de las proteínas virales no estructurales. Bajo la regulación de estas proteínas, la población de células en división se expande verticalmente, se retrasa la diferenciación de las células epiteliales y es menos completa. Las proteínas se expresan secuencialmente con la diferenciación y se producen viriones maduros sólo en las capas más superficiales del epitelio. El número de células presentadoras de antígenos (APCs) intraepiteliales se reduce en el epitelio infectado por el VPH. Vaccine 2006 24 (3) S3/2.

En segundo lugar, una vez las células basales han sido impelidas al compartimento suprabasal, pierden la capacidad de dividirse y, en su lugar, ponen en marcha el programa de diferenciación terminal. Los papilomavirus se replican en este compartimento y, para su liberación al entorno, aprovechan la desintegración de las células epiteliales que se produce como consecuencia de su recambio natural en las capas superficiales (212).

Una de las características del cáncer cervical es la pérdida de la expresión de la proteína viral E2. Se cree que en las células basales del epitelio neoplásico, esta proteína E2, pierde su expresión y en consecuencia produce una pequeña cantidad de E2-ORF, que como producto de fusión es capaz de reprimir la replicación del ADN y su expresión y por lo tanto mantendría el virus en fase latente en las células basales.

E1 corresponde a una proteína multimérica con actividad ATPasa y helicasa, en sitios específicos del ADN viral, llamadas regiones de origen de replicación (ori), formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas (principalmente E), kinasas (CKD) dependientes de ciclinas a su vez inhibidoras de CKD y ADN polimerasa α , en la región p68, participando además proteínas de la célula huésped (213).

Las proteínas E1 y E2 se van a unir a secuencias específicas del ADN, de tal modo que E1 es la proteína iniciadora de la replicación, para lo cual las secuencias únicas de E1 en adenina-timina van a estar flanqueadas por dos o tres sitios de unión con la proteína E2, con alta afinidad para las secuencias de adenina-timina.

E2 corresponde a una proteína dimérica que forma un complejo proteico con E1 antes mencionado. En este proceso, E2 es fosforilado por kinasas en los residuos aminoacídicos de serina 298 y 301, regulando su unión con E1 (214). Además, E2 reprime al promotor P97 (VPH 16) o P105 (VPH 18), ubicado próximo al gen TATA box, encargado de la transcripción de las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas proteínas (figura 8). Por lo tanto de esta manera es un regulador de la proliferación celular y de la capacidad de transformación de las células infectadas. También se ha demostrado que E2 activa directamente la síntesis de la proteína P53 lo que produciría finalmente la detención del ciclo celular en G1 y apoptosis (215).

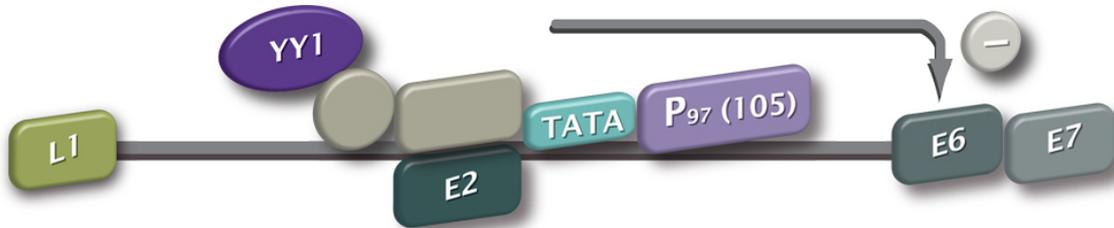


Figura 8: ADN viral no integrado. La unión de E2 y la proteína Ying-Yang 1 (YY1), en sus respectivos sitios de unión, reprimen la expresión de E6 y E7. En caso de integración del genoma viral existe pérdida de E2 y activación de E6-E7 vía factor de transcripción.

La proteína E1-E4 es la mayoritariamente expresada en epitelios infectados por VPH (aproximadamente el 30% del contenido proteico celular), se expresa en estadios tardíos de la infección cuando se están ensamblando los viriones. Se sintetiza como proteína mixta, involucrando regiones génicas E1 (primeros cuatro aminoácidos) y E4 (216). Forma complejos hexaméricos, capaces de unirse a la red de citoqueratina de la célula, a través de su región N-terminal produciendo su desestabilización. También produce alteración en el potencial de membrana mitocondrial. La región C-terminal permite su unión a la proteína del gen DEAD-box, alterando su función tipo helicasa, ATPasa, recambio RNA y estabilización de ribosomas (217). Su región intermedia (aminoácidos 17 a 45) detiene el ciclo celular en G2, a través de la unión a ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas y por bloqueo de E7. Por estos mecanismos, la célula pierde soporte estructural por la alteración de su estructura, produciendo daño mitocondrial y del metabolismo energético, además de apoptosis (218). Es posible que durante esta etapa de amplificación del genoma viral, la inhibición de las oncoproteínas E6 y E7, la alteración de su estructura, el trastorno mitocondrial-energético y la apoptosis permitirían una mayor diseminación de la progenie viral, siempre que las proteínas de la cápside viral (L1 y L2) hayan sido sintetizadas, formando con el ADN viral nuevos viriones infectantes.

Un proceso importante y crucial para la transformación hacia la malignidad de las células infectadas, es la integración del genoma del virus junto al de la célula huésped. Este proceso tiene lugar en el estrato espinoso y destaca en importancia el ADN de los VPH de alto riesgo oncogénico. Durante este proceso se altera la región de lectura abierta ORF-E2, perdiéndose el efecto inhibitorio sobre el promotor P97 o P105, que mantenía

bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7, por lo que ahora serán sintetizadas sin restricción vía factores de transcripción (219).

En la etapa no productiva episomal, las células basales del epitelio llegan a formar hasta 200 copias con gran amplificación del genoma. Posteriormente se transcribirá el ARNm y se codificarán las proteínas L1 y L2 de la cápside, ocurriendo únicamente en las capas superficiales del epitelio, que es donde se pueden empezar a ver partículas virales con el microscopio electrónico. La infección persiste en las células basales, ya que ellas no sufren cambios, no hay coilocitosis, no hay lisis celular y no son productivas. Las proteínas que codifican los genes E6 y E7 son las que tienen relación con la capacidad transformadora y son sin duda las más importantes en sus propiedades oncogénicas. Las proteínas sintetizadas por estos genes interactúan con las citoqueratinas de las células basales del círculo escamoso-columnar y las alteran, por lo tanto son las que mantienen el ambiente celular para que el genoma viral pueda mantenerse extracromosómico. Las proteínas transformadoras, u oncoproteínas pE6 y pE7 del VPH, interactúan con las proteínas reguladoras del normal funcionamiento del ciclo celular, como son las proteínas p53, p21, p27 y pRB (proteína retinoblastoma), de manera que la pE6 interactúa con la p53, y la pE7 lo hace con pRB, bloqueando su función biológica. Cuando se produce la integración del ADN viral en el genoma del huésped, la capacidad de regulación represora de E1 y E2 sobre E6 y E7 se pierde, por lo que pE6 y pE7 se sobreexpresan de forma continuada, lo cual es necesario para los procesos de proliferación-inmortalización celular. E6 es una proteína de 150 aminoácidos que liga Zinc; gran parte de sus funciones biológicas dependen de la integridad de 4 residuos de cisterna (220). Forma un complejo con p53 y la enzima ubiquitina ligasa, produciendo su degradación (221). El gen p53 se localiza en el cromosoma 17; la proteína p53 en condiciones basales, permite detener el ciclo celular en fase G1, efecto mediado por la proteína p21cip1/WAF1, que inhibe a las quinasas dependiente de ciclinas o activar el mecanismo de apoptosis, mediante la activación del gen bax, procesos desencadenados frente a una carga viral elevada o ante mutaciones del ADN celular. De este modo, su función protectora del genoma celular es alterada por la proteína E6. Otras funciones corresponden a la amplificación de la actividad telomerasa, inducir síntesis de ADN mutado y aumentar la integración del ADN viral al de la célula huésped (220).

El sistema proteína quinasa activada por mitógeno (MAP quinasa), vinculado a la proliferación celular, ha sido relacionado a la acción de oncoproteínas de VPH de alto

riesgo. Entre sus componentes, Fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), fosfatidilinositol bi y trifosfato (PIP2-PIP3), Rap-1, kinasa S6 y Akt, corresponden a sitios específicos de control.

Se ha descrito una proteína llamada tuberina, de 200 Kda, generada a partir de un gen supresor de tumores conocido como complejo de la esclerosis tuberosa (TSC tipo 2). Esta proteína (tuberina) controla la proliferación celular a través de la inhibición de la proteína kinasa S 6 (222). E6 se une a tuberina, inhibiendo su función; la interacción de E6 con Rap-1 permite activar el sistema kinasa MAP. También se ha descrito la interacción de E6 con proteínas de membrana conocidas como homólogos de guanilato ciclasa (MAGI 2 y 3). Estas proteínas en condiciones normales estimulan a PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) el cual, en condiciones basales, controla el crecimiento celular inhibiendo el sistema, vía bloqueo de Akt y transformando PIP3 a PIP2 (222) (figura 9). Al degradarse MAGI 2 y 3 por acción de E6 se perdería el efecto regulador del crecimiento celular.

E7 corresponde a una proteína de 100 aminoácidos, ligante de Zinc, que experimenta fosforilación, permitiéndole unirse a través de su extremo N-terminal (aminoácidos 20 a 30), a la proteína del retinoblastoma (pRB), alterando su función. PRB se origina del gen localizado en el cromosoma 13; interacciona con el factor de transcripción celular E2F en la fase G1 del ciclo celular, inhibiendo la expresión de genes relacionados a la replicación del ADN y proliferación celular (220). De esta forma, la unión de E7 con pRB, a través de la fosforilación de esta última, permite la expresión de timidina kinasa, c-myc, polimerasa α , PCNA, Ki-67, proteína de mantenimiento de minicromosomas (MCM), p16, ciclina A y E.

También se conoce su efecto mutagénico, productor de aneuploidía y favorecedor de la integración del genoma viral al de la célula huésped (220). De este modo, las oncoproteínas E6 y E7 favorecen la proliferación e immortalización de células con una mayor carga de ADN mutado.

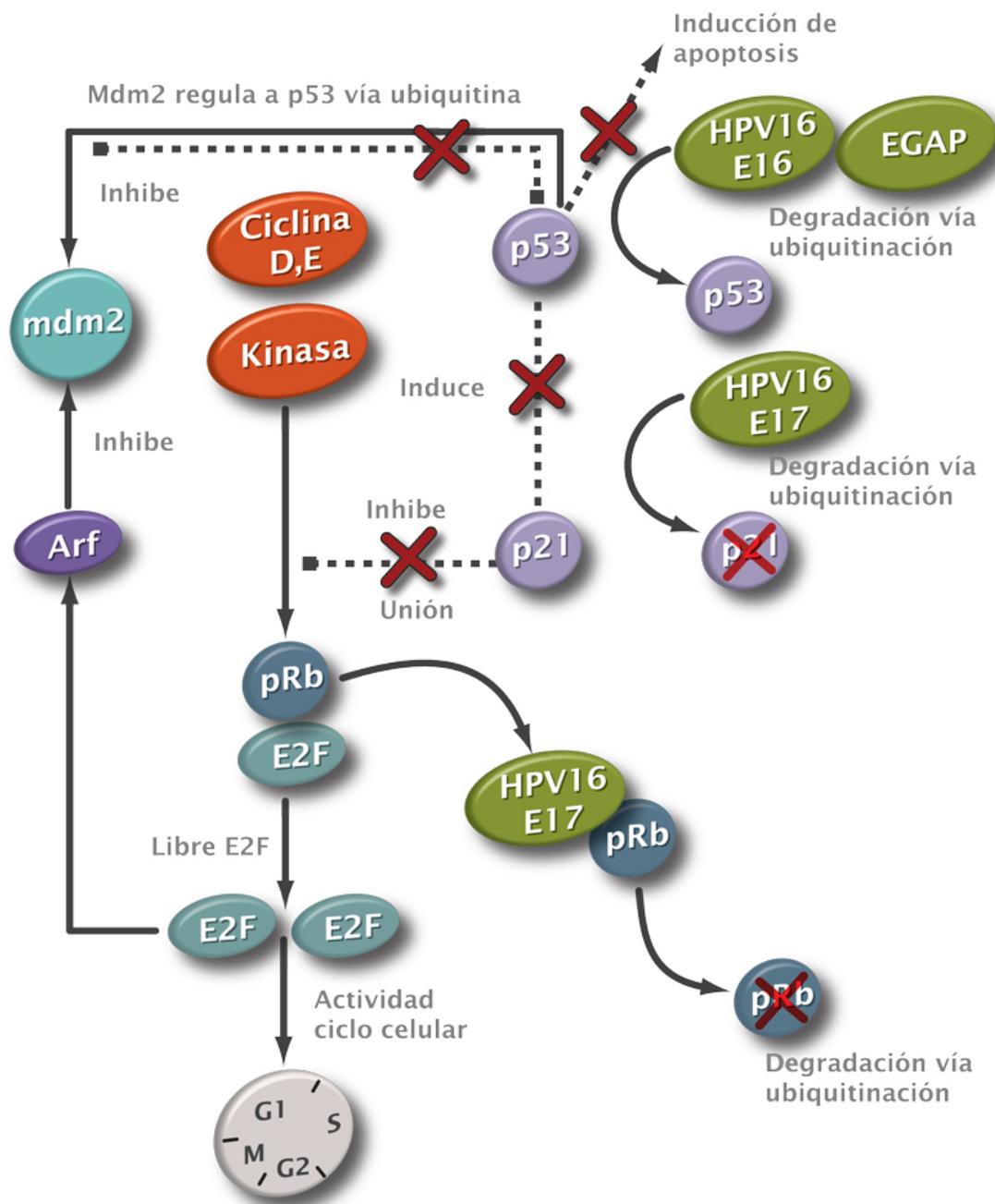


Figura 9: Célula infectada por VPH. E7 estimula la función de ciclinas D-E/KDC, llevando a la proliferación celular no controlada, efecto compartido por E5. La disminución de p53 y la inactivación de la proteína BAK, interfiere la capacidad para reparar el ADN dañado e inhibe la apoptosis.(Munger 2002) (223).

E5 es una proteína sintetizada en el genoma viral localizándose principalmente en la membrana plasmática celular, interactuando con algunos factores como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor p 185-neu y factor estimulante de colonias (224); de este modo podría estimular la acción de estos diferentes factores vinculados a la proliferación celular. Otro mecanismo atribuido a E5 sería la de activar la vía kinasa MAP, asociado a proliferación celular y diferenciación (224).

La integración del genoma viral al de la célula huésped no ocurre en todos los casos de cáncer cervical, pudiendo explicarse por mutaciones en zonas represoras como la región Ying- Yang (YYI), que mantendría la expresión continua de E6 y E7 o por la producción de ARN "quiméricos", más estables, permitiendo mayor síntesis de estas oncoproteínas (219).

Los procesos previamente descritos permiten la proliferación celular no controlada con una mayor carga de mutaciones. Para la transformación maligna se requiere además, la expresión de un conjunto de genes alterados o encargados de permitir el desprendimiento de las células neoplásicas, la invasión a los tejidos vecinos, facilitar la angiogénesis, eludir la respuesta inmune del huésped, producir metástasis a distancia, entre otras acciones (220). En este sentido, existe evidencia de la participación de mutaciones en la región 3p14.2 (gen histidina frágil), inducida en parte por la integración del genoma viral (VPH 16), además de aquellas en las regiones cromosómicas 3p22.2, 11q22.1 y 11q23.3 que se han asociado a persistencia de lesiones intraepiteliales y/o progresión a cáncer cervical (225).

Las propiedades bioquímicas de pE6 y pE7 son distintas en los virus de alto y bajo riesgo. Así, pE7 se une en menor cuantía a pRB y en un lugar diferente cuando está producida por virus de bajo riesgo oncogénico. La capacidad de pE7 para inducir la proliferación celular es mucho mayor que la de pE6, por lo que, de forma aislada, la función de pE6 sería de menor importancia, aunque se ha comprobado que potencia la acción de pE7 (226).

La persistencia de la infección, así como determinadas circunstancias de permisividad inmunológica, hace que las partículas del ADN viral se integren en el genoma celular, con la aparición de una serie de acontecimientos que originan la transformación y la proliferación celular alterada; se produce así un desequilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular. Además, la sobreexpresión de pE6/pE7 no es suficiente para inducir la

transformación celular; una célula infectada por VPH tiene disminuidas las capacidades de control de ciclo celular, la respuesta a estímulos de diferenciación celular, los estímulos de crecimiento tisular o de vigilancia inmunológica, así como la reparación de mutaciones y alteraciones cromosómicas, por lo que hacen a la célula más vulnerable a que actúen cofactores que colaboren y ocasionen la transformación celular.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se considera que la neoplasia cervical intraepitelial de bajo grado (CIN 1 histológico, LSIL citológico), corresponde a infecciones productivas del VPH que promueven cambios morfológicos en las células. Aproximadamente el 85% de los CIN 1/ LSIL son causados por virus de alto riesgo oncogénico y sólo un 15% contienen VPH de bajo riesgo. Casi el 100% de los CIN 2-3 y carcinomas cervicales están causados por una infección persistente de uno de entre los 15 genotipos de virus papiloma humanos de alto riesgo oncogénico. Sin embargo, una gran mayoría de las lesiones CIN1/LSIL, incluso aquellas causadas por VPH de alto riesgo regresarán espontáneamente, por lo que la conducta a seguir sería expectante, sin la necesidad de realizar un tratamiento (208).

En los resultados citológicos compatibles con ASCUS, la realización de un cribado con un test de VPH ha demostrado una mayor sensibilidad que volver a repetir la citología (150). Pero ya que la mayoría de los LSIL, presentan una infección por VPH de alto riesgo subyacente, independientemente de si regresará o no, el test de VPH no se ha demostrado que sea efectivo en esta indicación (162, 227).

Existen cuatro pasos importantes en el desarrollo del cáncer cervical: 1) infección del epitelio escamoso en la zona de transformación cervical (Infección productiva); 2) persistencia viral; 3) progresión de la lesión epitelial con infección persistente hacia una lesión de alto grado y 4) invasión a través de la membrana basal del epitelio. La infección viral es extremadamente común en las mujeres jóvenes durante la primera década de actividad sexual. Las infecciones persistentes y las lesiones intraepiteliales se establecen, típicamente entre los 5 y los 10 años de infección sin aclaramiento (rango 2-20 años), y ocurre en menos del 10% de las infecciones nuevas.

El cáncer cervical tiene lugar a lo largo de varios años, e incluso décadas, en una minoría de mujeres que inician una displasia o lesión intraepitelial, y la franja de edad de mayor riesgo se sitúa entre los 35 y los 55 años (116). Existe un amplio conocimiento acerca de la relación causal del cáncer de cérvix con el VPH. Además es conocido que cada genotipo viral del VPH actúa como una infección independiente, con unión entre diversos factores carcinogénicos de riesgo y especies virales diferentes o evolucionadas.

En la infección transitoria, el VPH se localiza en el núcleo de forma episómica, es decir sin integrarse el ADN viral en el ADN del huésped. Para iniciar y mantener la transformación neoplásica, el VPH necesita de la acción de dos proteínas virales denominadas E6 y E7 pertenecientes a los serotipos virales de alto riesgo oncogénico. Las propiedades bioquímicas de E6 y E7 son distintas en los virus de alto y bajo riesgo. Estas oncoproteínas se unen e inician la degradación de las proteínas, producto de los genes supresores tumorales, p53 y proteína de retinoblastoma (pRb) respectivamente. La supresión de la acción de p53 induce a la célula a no chequear el buen estado de su ADN así como impide que la misma active mecanismos de apoptosis. La supresión de la acción de pRb induce a la célula a dividirse continuamente y a su vez aumentar la expresión de p16 para intentar activar la acción de pRb. La ausencia de pRb no induce la transcripción del factor E2F, llevando a la transcripción de los genes que promueven la proliferación celular. Estas dos acciones llevan por un lado a inmortalización de la célula infectada y por otro lado a una acumulación de defectos en el ADN de la misma. Asimismo el virus aprovecha los mecanismos de división celular para dividirse él mismo, lo cual favorece la replicación viral y la generación de viriones maduros en las zonas más superficiales del epitelio. Los errores genéticos acumulados en las células infectadas, con una posible inestabilidad cromosómica pueden conducir en un momento determinado, al inicio de la carcinogénesis y a una transformación maligna (113).

En una infección crónica por VPH de alto riesgo oncogénico, la integración del ADN viral junto al ADN de la célula huésped, se produce siempre rompiendo una región del genoma viral, la región E2. La proteína E2 es la que regula la expresión de E6 y E7. La integración implica ruptura de la región E2, defecto de síntesis de la proteína E2 y desregulación de la producción de las proteínas E6 y E7. Dichas proteínas E6 y E7 son necesarias para la conversión y progresión de la transformación neoplásica (114). En resumen la adquisición del "hábito neoplásico" es el resultado de la acción de E6 y E7, ya sea a partir de virus episomales productores de estas proteínas, ya sea a través de virus integrados cuyas células huésped producen también E6 y E7. Por lo tanto el hábito neoplásico no implica necesariamente integración del virus en el genoma de la célula.

En una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL - CIN1), se produce una lesión viral productiva, con una expresión de las oncoproteínas E6 y E7 en las células maduras que son estables genéticamente. La mayoría de estas lesiones regresan en el plazo de dos años, y muchas son sobre-diagnosticadas y sobre-tratadas. Si persisten más de dos años, podrían estar altamente relacionadas con cáncer.

Las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL-CIN 2-3) son infecciones no productivas, genéticamente inestables, con tendencia a persistir y progresar, pero que ocasionalmente podrían regresar.

Independientemente del tipo de lesión citológica y del genotipo viral, sólo en las infecciones por VPH que han iniciado un proceso oncogénico, es donde se encuentran niveles elevados de la proteína E7 en la replicación de las células competentes basales y parabasales. La proteína E7 sería la mediadora, que al bloquear pRB, lleva a una sobreexpresión de p16^{INK4a}, inhibidora de las quinasas ciclina-dependientes. En condiciones normales, la proteína E7 se expresa únicamente en la capa de células superficiales bien diferenciadas del epitelio cervical.

2.2 HIPÓTESIS

La infección por el VPH presenta unas características epidemiológicas muy conocidas, en la que aún se desconocen muchos aspectos y quedan muchas lagunas, ya que la virología molecular subyacente a la persistencia, progresión e invasión no está todavía bien entendida, y no están del todo claro los mecanismos de cómo se consigue un estado no regulado de la expresión de los genes virales, aunque sí se conoce que este patrón de expresión no regulada, requiere cambios específicos en la célula huésped que afecta al control transcripcional del genoma viral en la capa de células basales.

La detección del VPH-de alto riesgo se ha mostrado, a nivel de screening cervical más sensible para la detección de lesiones de alto grado, que la citología. En la actualidad se habla incluso del riesgo potencial del desarrollo de HSIL en pacientes con citología negativa y detección de HPV-HR positivo. Sin embargo, no existen, ni se han desarrollado guías clínicas validadas para el uso de un test de detección de VPH en el seguimiento de una lesión de bajo grado, para poder utilizarlo en la práctica clínica habitual y que a su vez este procedimiento sea realmente útil y fiable.

Desafortunadamente, los actuales instrumentos o test diagnósticos, no nos permiten identificar aquellos casos de CIN1/LSIL que en el momento de su diagnóstico presentan un potencial riesgo de desarrollar un CIN 2-3 y tampoco se puede predecir aquellas lesiones intraepiteliales de bajo grado que van a regresar.

Además existe un problema sobreañadido: la correlación entre la citología con lesión de alto grado H-SIL, y la histopatología correspondiente, no siempre son coincidentes, y oscilan alrededor del 45-50% según series (228).

La detección de la presencia de VPH en una muestra con diagnóstico de LSIL, no nos da suficiente información como para poder predecir la evolución de la lesión. Distintos métodos informan del tipo de virus y también de la carga viral, ya sea total aproximada, por célula, episomal e integrada. Ninguno de estos métodos se ha mostrado como eficiente para la predicción de la evolución de un LSIL, y además técnicamente son muy complicados de modo que solamente son desarrollables en laboratorios altamente tecnificados

Por lo tanto, para conseguir un test que tenga una elevada especificidad y sensibilidad a nivel clínico, con una eficacia real, éste debería detectar únicamente aquellos casos de LSIL, VPH de alto riesgo, positivos que además en un futuro evolucionarán a un grado CIN 2 -3 o mayor.

Si se revisa la literatura, se han escrito más de 1.500 artículos referentes a marcadores moleculares para cáncer de cérvix. Algunos son muy específicos como detectores de lesiones intra-epiteliales (P16, Survivin, ERK-1, VEGF-C, nm 23-H1), pero no existe ningún marcador específico para los diferentes grados de CIN.

Se podrían encontrar nuevos marcadores que diferenciasen claramente entre CIN 2 y CIN 3, pero no existen marcadores que diferencien entre CIN 1 y CIN 2.

Sin embargo, diversidad de estudios han mostrado que existen discrepancias y limitaciones en los métodos diagnósticos habituales o convencionales como son la citología, la colposcopia y la biopsia dirigida.

Pero es difícil encontrar un único criterio a seguir durante el seguimiento de una paciente diagnosticada de lesión intra-epitelial de bajo grado (LSIL-CIN 1). Además debido al reducido número de pacientes que requieren tratamiento escisional, que sería aproximadamente un 11% (10-15 %) ya que aproximadamente un 60% regresan, obtenemos una información muy confusa y un acentuado desconocimiento acerca de cual es la pauta más adecuada a seguir en estos casos.

También existe unanimidad en la no necesidad de detectar el virus VPH en las menores de 21-22 años con LSIL y sólo estaría indicado detectarlo si la lesión intraepitelial de bajo grado CIN1, persiste más de dos años, o si existe una progresión hacia una lesión de alto grado. En el resto de edades no existe acuerdo de si estaría justificado un cribado automático de virus en todos los LSIL-CIN 1, ya que la positividad al VPH en estos casos es muy elevada y conociendo el riesgo “a priori” de que la probabilidad de un cáncer cervical asociado a una lesión de bajo grado es muy baja, aproximadamente de 1 / 2695 (0,00037%) y de que el riesgo es nulo si el VPH es negativo, entra en duda si el cribado del virus estaría justificado (229).

Por otro lado, los test de detección del DNA del VPH y la tipificación viral, alcanzan una elevada sensibilidad y se ha demostrado que no sólo detectan precozmente un mayor número de lesiones de alto grado, sino que también han permitido que el intervalo de tiempo durante el screening se pueda alargar de manera más segura. Sin embargo el precio de este beneficio es una menor especificidad, especialmente en mujeres jóvenes, y la obligación o la necesidad de aplicar pruebas o analíticas adicionales para orientar un mejor seguimiento a las mujeres que presentan un test positivo para el VPH.

Es por ello que la aplicación de los diferentes test moleculares disponibles, entre ellos la medida del ARNm, el uso del p16^{INK4a} y otros marcadores del ciclo celular, ofrecen futuras perspectivas y no sólo alcanzando una alta sensibilidad, sino también manteniendo una elevada especificidad (230).

Si los procesos diagnósticos tuvieran en cuenta estos marcadores moleculares, se alcanzaría una mayor fiabilidad y una considerable certeza diagnóstica precoz del cáncer cervical y del CIN, en especial en aquellas pacientes que presentan lesiones muy incipientes. Este es un hecho que debería ser técnicamente factible en un futuro próximo, evitando así visitas innecesarias, costes adicionales y tratamientos no adecuados.

La justificación de utilizar técnicas de detección de ARNm viral, en lugar de las de detección de ADN viral, es:

- Los ensayos de los test de ADN del VPH que se encuentran disponibles comercialmente detectan la región estructural de L1 del HPV, la cual claramente no está implicada en el mecanismo oncogénico.
- En el caso de pérdida de la región L1 debido a la integración viral dentro del genoma humano, los tests ADN definirán incorrectamente la muestra como negativa.
- El ARN mensajero de las oncoproteínas está directamente relacionado con la actividad de las mismas y por tanto la detección del ARN mensajero de las oncoproteínas constituye un marcador fiable de la actividad oncogénica del VPH.

La finalidad de detectar de las oncoproteínas E6- E7, es la siguiente:

- No sería necesario tipificar el virus previamente ya que se supone que si hay E6 y E7 es porque corresponde al grupo de virus de alto riesgo.

- No discrimina qué tipo de virus de alto riesgo, pero tampoco es importante porque sería una información no necesaria, y además, en ocasiones cuando se solicita tipificación del virus, pero el resultado es no concluyente, se genera todavía más incertidumbre en el momento de decidir una estrategia terapéutica.

En el presente estudio, durante el seguimiento de las pacientes con diagnóstico de lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL, CIN-1) en citología líquida (Thin-Prep), a partir de un primer resultado, las determinaciones que se han realizado son las siguientes:

- 1) Medición del ARN mensajero E6-E7, mediante inmunofluorescencia ultrasensitiva por hibridación in situ.

Es el único ensayo clínico, a diferencia de los otros, que cuantifica la cantidad de mRNA de E6 y E7 que se encuentra en la célula. Además cuantifica el porcentaje de células que sobreexpresan ARNm de las oncoproteínas E6/E7, que es un dato determinante de severidad de enfermedad y de progresión.

Esta es una prueba simple y automática que no requiere la extracción de ácido nucleico, es relativamente rápida y no necesita tecnología específica.

- 2) Detección de la proteína p16^{INK4a} inhibidora de las quinasas ciclina-dependientes.

En el inicio de su utilización y en la aplicación clínica, la detección inmunohistoquímica de p16^{INK4a}, mejoró el diagnóstico histopatológico de las biopsias de las diferentes etapas de la neoplasia cervical intraepitelial y del carcinoma cervical (231). Posteriormente se incrementó su uso aplicándose a la citología. Se utilizaba para la identificación de células anormales (184, 189, 232, 233), aunque su uso quedaba dificultado por el hecho de que existían algunos casos equívocos de células no displásicas (metaplásicas, endocervicales y endometriales normales), que también expresaban p16^{INK4}. Es por ello que se estableció una puntuación morfológica en las células p16^{INK4a} positivas basado en el grado de anormalidad nuclear, con el objetivo de identificar las pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL), y que fuese aplicable a nivel de una citología de screening de base (234).

Con el objetivo de mejorar la eficacia y la especificidad de este test, proponemos una modificación de esta puntuación en base a la morfología del núcleo de la célula alterada, basándonos en que en una lesión intraepitelial de bajo grado, la proporción núcleo-citoplasma no es mayor al 50%.

Por lo tanto:

- La infección por VPH está asociada con cambios en los niveles de expresión de los marcadores moleculares y/o en la función de los genes del huésped.
- La detección de estos cambios a nivel molecular mejora la objetividad, reproductibilidad y fiabilidad . A su vez podría ser capaz de predecir la evolución clínica.
- Los marcadores moleculares jugarían un papel muy importante después de un screening primario por VPH.
- Con el test de ADN del virus se detectan demasiados falsos positivos, especialmente en pacientes jóvenes.
- El cribado de estos casos falsos positivos se debería efectuar antes de comunicar el resultado a la paciente y de decidir una conducta terapéutica a seguir, en la misma toma de muestra de citología líquida, sin la obligación de volver a citar a la paciente, y de esta forma cuando se programa la siguiente visita, se ofrece a la paciente una información más completa y con menos incertidumbres.
- Quedaría en duda si sería adecuado o no determinar el tipo de virus, ó cuantificando el nivel de E6, E7, o identificando p16^{INK4a} ya sería suficiente.
- En la práctica clínica habitual no sería necesaria la detección del virus, ya que el conocimiento por parte de la paciente de la positividad al VPH y el desconocimiento de su evolución, crearía más inquietud y angustia.
- La información que se obtiene con estos marcadores de progresión viral, sería suficiente para predecir el porcentaje de pacientes que serían candidatas a tratamiento escisional, ayudando a unificar criterios y a simplificar el número de visitas y pruebas diagnósticas adicionales.
- Sin embargo a nivel global y de estudio poblacional, el tipaje viral si que podría ayudar a resolver una parte del problema, que sería: la persistencia de un tipo específico de virus versus una nueva infección y el control después de la vacunación, para conocer los tipos no cubiertos por la vacuna y poder proseguir con estudios epidemiológicos.

OBJETIVOS

- Identificar las lesiones intraepiteliales de alto grado que se esconden o que pasan desapercibidas, bajo el diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de bajo grado. **(Relacionar p16 en citología, en resultados de biopsias y con citologías durante el seguimiento)**
- Debido a que la mayoría de LSIL regresan espontáneamente, determinar aquellas pacientes que no necesitan controles adicionales, así conseguir disminuir e incluso eliminar visitas sucesivas que incrementan el tiempo asistencial y el coste. Investigar si existen factores capaces de predecir qué pacientes con diagnóstico citológico LSIL, CIN-1, van a presentar una persistencia o progresión. **(Relacionar oncoproteínas con datos de seguimiento)**
- Determinar con exactitud las pacientes que requieren un tratamiento escisional, evitando tratamientos agresivos e innecesarios. **(Relacionar oncoproteínas con datos de seguimiento)**
- Conocer la eficacia de la citología, de la cuantificación de las oncoproteínas E6-E7 y de la detección de la proteína p16^{INK4a}, aisladas o en combinación, para identificar una lesión de alto grado (HSIL) presente, o un riesgo próximo de progresión hacia lesión de alto grado (HSIL) o cáncer. **(Relacionar oncoproteínas y p16 con datos de seguimiento)**
- Determinar si la medición de p16^{INK4a} junto a la modificación de la puntuación de la morfología nuclear celular, aumenta la exactitud en el diagnóstico y mejora la detección de una lesión de alto grado o cáncer, bien actual o en vías de progresión. **(Comparar ambos métodos de lectura de p16)**
- Investigar si es necesario o no conocer el genotipo viral y/o la determinación de la carga viral en lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL-CIN1). **(Comparar tipos de virus con p16 y oncoproteínas)**

- Tratar de establecer un único criterio clínico eficaz, en el seguimiento las pacientes que presentan LSIL- CIN 1, con elevada sensibilidad y especificidad.
- Analizar si el nuevo algoritmo de screening en que se propone un test del VPH en las mujeres entre 25 y 62 años como prueba inicial en el cribado primario (como test único o asociado a la citología cervical), se beneficiaría al añadir como pruebas complementarias la detección de marcadores moleculares, o bien ambas serían eliminativas, y con sólo cuantificar las oncoproteínas o detectar p16^{INK4a}, no sería necesario realizar el test del VPH. O bien aplicarlos únicamente cuando existen alteraciones celulares, como predictores de la progresión de una lesión.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo observando de manera consecutiva la evolución en lesiones escamosas de bajo grado de cérvix uterino, diagnosticadas por estudio citológico obtenidas de muestras en citología líquida y según la clasificación citológica de Bethesda 2001.

El estudio se ha realizado en el Hospital Universitario del Mar de Barcelona, la inclusión de las pacientes en el periodo comprendido entre el 15 de diciembre de 2004 y el 15 de octubre de 2005, y el seguimiento ha sido durante mínimo dos años.

Se comparan las siguientes determinaciones en una primera muestra de citología líquida con diagnóstico de SIL bajo grado (LSIL):

- Se tipifica el virus mediante PCR en todas las muestras
- Se estudia la sobreexpresión del ARNm de las oncoproteínas E6 y E7, medidas de forma cuantitativa mediante citometría de flujo.
- Se realiza el análisis inmunocitoquímico de p16^{INK4a}.
- Se procede al análisis de las biopsias, en aquellas en que se ha practicado, incluyendo el estudio inmunohistoquímico de p16^{INK4a}.

Se estima una predicción de la evolución de la lesión citológica y se comparan los resultados.

Las muestras de citología líquida se han obtenido del Servicio de Anatomía Patológica y las pacientes observadas del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario del Mar de Barcelona y en concreto de la Unidad de Patología Cervical y prevención del cáncer de cuello uterino.

Todos los diagnósticos citológicos se han obtenido mediante citología líquida (ThinPrep Pap Test, HologicCytoc. Cytoc Corporation Boxbourg, Maryland) Una vez seleccionadas las pacientes, se recupera la primera citología líquida practicada con un

primer resultado compatible con lesión intraepitelial de bajo grado (SIL bajo grado, L-SIL) y se inicia un estudio prospectivo con la idea de realizar un seguimiento de estas pacientes y conocer su evolución, según el protocolo del Hospital del Mar.

En el proceso diagnóstico se realiza una prueba de detección de VPH mediante PCR usando kits comerciales (Genómica, Madrid, España) .

Con el material restante se procede del siguiente modo: Conservación del mismo a temperatura ambiente durante 2 meses, posteriormente centrifugación y congelación del pellet a – 80°C. Para realizar el estudio de ARNm de E6 y E7, las muestras fueron descongeladas y resuspendidas en 30 ml. de Preserv-Cyt.

Para llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico de p16^{INK4a}, se procedió a desteñir las muestras que habían sido utilizadas para el diagnóstico de L-SIL, y aplicar en ellas la técnica de inmunohistoquímica correspondiente.

Las biopsias cervicales y las conizaciones, en su estudio histológico final se completa con el estudio inmunohistoquímica p16^{INK4a}.

La evolución de las citologías de las pacientes en cuanto a las variables regresión, mantenimiento y progresión, no se ha dado a conocer durante todo el tiempo que ha durado el proceso de investigación, hasta el final del mismo.

Las pacientes en las que se ha hecho seguimiento durante este periodo de tiempo, un mínimo de dos años, han sido estudiadas prospectivamente. Y ha sido al final de este periodo cuando se ha establecido un punto de corte en el tiempo para determinar la evolución de cada paciente.

Los datos clínicos y antecedentes que se han incluido se han recogido de forma retrospectiva.

4.2 CITOLOGIA LIQUIDA

Todos los diagnósticos citológicos se han obtenido mediante citología líquida (ThinPrep, Pap Test, Hologic Cytoc. Cytoc Corporation Boxbourg, Maryland). Ésta es una citología en capa fina que respecto a la citología convencional pretende facilitar la lectura al eliminar sangre, u otros artefactos, con el consiguiente aumento de muestras satisfactorias para su valoración y mejorar la capacidad de detección de lesiones intraepiteliales. La técnica consiste en la toma la muestra de la zona de transición mediante cepillo especial (Cytobrush) y el material se disuelve en un frasco que

contiene 30 cc. medio líquido fijador, PreservCyt (Cytoc, Hologic). Estas citologías líquidas se procesan en un aparato automático Thin Prep 3000. La obtención de las preparaciones se basa en tres fases: dispersión de la muestra, recolección de ésta en un filtro y transferencia a un portaobjetos. Se utilizan filtros de policarbonato que disgregan los grupos de células y disuelven el moco, y un sistema de *vacum* a través de filtros que captan las células bajo control por ordenador. La recogida de células se controla para proporcionar el número adecuado de células, y la transferencia de las células captadas a la preparación se realiza por expulsión de aire ayudado con una carga electrostática. El resultado final es un círculo de 20 mm de diámetro con células distribuidas al azar, en monocapa y bien conservadas. Las preparaciones obtenidas son teñidas con el método de Papanicolau y posteriormente se interpretan por los citotécnicos, bajo microscopio de luz convencional. Estas citologías son revisadas por el citopatólogo según las normas de la Academia Internacional de Citología. (El citólogo debe revisar todos los casos positivos, todas las dudas de los citotécnicos y uno de cada 10 casos normales) (235).

4.3 TIPIFICACION DEL VPH.

En todas las muestras se determina la tipificación del VPH mediante la técnica Clart[®]-HPV2 (genómica, Madrid. España). Clinical array technology, es una prueba de detección, mediante amplificación genómica, de hasta 35 genotipos de papillomavirus, clasificados como “alto riesgo”: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 85 y 89, y “bajo riesgo”: 6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83 y 84, en un sólo análisis, a través de una plataforma de arrays de baja densidad para diagnóstico in vitro, y también identifica todas las coinfecciones presentes. Se realiza la hibridación de forma específica en cada sonda del array, por lo que la sensibilidad y especificidad es muy elevada. Se realizan tres controles: un control del ADN genómico, un control interno de amplificación y todas las sondas están triplicadas en el Array Tube[®], para cada tipo de VPH y los controles para evitar alteraciones locales sobre los puntos que pudieran interferir en los resultados finales.



El sistema de detección con Clart[®] Papillomavirus Humano 2 se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas.

Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del microarray, tras lo que se incuban con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-Dianisidina que precipita sobre las zonas del microarray en las que ocurre la hibridación.

La lectura de los resultados es automática. Para evitar interpretaciones subjetivas, los resultados del análisis son procesados por un lector con un software específico que automáticamente detecta e interpreta los genotipos presentes, obteniendo un informe de cada una de las pruebas.

4.4 DETECCIÓN DE ARN MENSAJERO DE LAS ONCOPROTEINAS E6 Y E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Se recogieron muestras de citología en base líquida con líquido preservante PreservCyt (Cytoc, Marlborough, MA) y fueron enviadas para su análisis citológico. Una alícuota de dichas muestras fue congelada en PreservCyt a -80°C hasta su posterior análisis para la detección del ARN mensajero (ARNm) de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH (HPV Oncotect^R, Invirion Diagnostics, Oak Brook IL). El análisis de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Virología de Stanford, California, USA. Esta técnica emplea la hibridación in situ mediante fluorescencia para detectar el ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, basándose en el hecho de que los tipos oncogénicos del virus expresan de forma excesiva el ARNm de E6 y E7, como consecuencia de la persistencia e integración del VPH en el ADN genómico. La detección de dicho ARNm es un marcador de expresión de estas oncoproteínas virales y permite identificar las células neoplásicas, en las que siempre están presentes. Esta prueba consiste en una técnica de hibridación in-situ del ARNm de las regiones E6 y E7 del genoma de todos los tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, para su posterior análisis mediante citometría de flujo, proporcionando información directa y cuantitativa sobre la actividad oncogénica en las células del exocérvix. El procedimiento de esta técnica no destruye la célula durante el proceso de detección, de modo que la célula permanece intacta. Esta prueba se compone de seis etapas:

1. Toma de muestra y condiciones de almacenamiento apropiadas.
2. Fijación celular y permeabilización.

3. Lavados pre-hibridación.
4. Hibridación.
5. Lavados post-hibridación.
6. Adquisición y análisis de datos.

Tras procedimientos opcionales de manipulación celular pre-hibridación (ej. Marcaje antigénico de superficie), las células se fijan y permeabilizan mediante una reacción de una sola etapa, se lavan dos veces con el fin de ser preparadas para la hibridación, posteriormente se hibridan con una mezcla de sondas oligonucleotídicas, se lavan con la finalidad de eliminar la sonda no unida o unida parcialmente y finalmente se analizan mediante citometría de flujo.

El equipo HPV Oncotect^R contiene siete reactivos en cantidad suficiente para la realización de 100 pruebas. Para llevar a cabo la técnica se necesitan una serie de materiales y reactivos:

- Productos químicos: formamida, agua esterilizada o sin nucleasa, solución salina tamponada con fosfato (PBS, a pH=7.4), suero bovino fetal (SBF).
- Consumibles y aparataje: tubos de 1,5 ml para microcentrifugación de polipropileno (dependiendo del instrumento utilizado, puede que las muestras necesiten ser transferidas para su lectura en el citómetro a tubos de polipropileno de 12 x 75 mm), pipetas Pipetman o equivalente, agitador vorticial, centrífuga que pueda ser ajustada de manera precisa a 1000xg, aspiradora de vacío o pipetas desechables, baño de agua de temperatura controlada, que pueda ser ajustado a 43°C ± 1°C, citómetro de flujo convencional o citómetro capilar.

Existen unas normas establecidas en cuanto al mantenimiento, conservación y aplicación de los reactivos .

El procedimiento técnico es el siguiente:

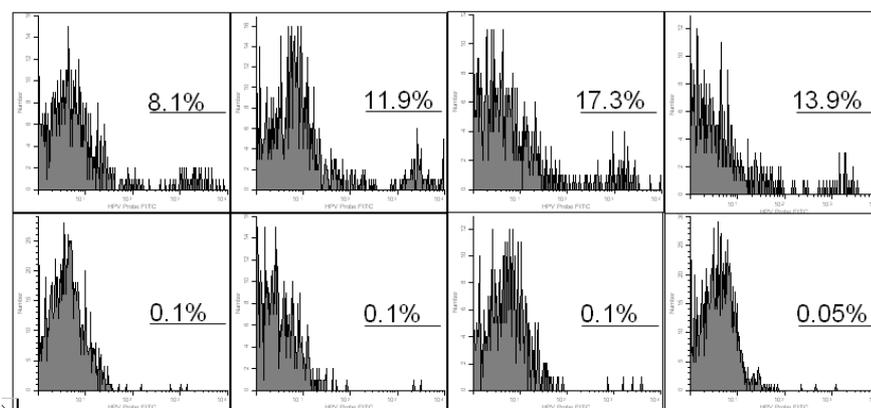
4.4.1 Inmunofenotipificación / Hibridación in situ con fluorescencia ultrasensible simultáneas y citometría de flujo.

A partir de la muestra de citología cervical líquida, una vez descongelada, se retira una cantidad de 1 mL. Se sedimentan las células por centrifugación a 400 x g y se lavan en solución salina tamponada de fosfato (PBS), a pH 7,4. Se resuspenden las células en 100 µL de PBS, a pH 7,4 y se tiñen con una dilución 1:10 de ficoeritrina (PE) conjugada con anti-CAM 5.2 y con PE/cianina 5 conjugada con anti-CD16 (BDPharmingen, San Diego, California). Posteriormente las células se incuban en la

oscuridad a 4°C durante 20 minutos. Tras la incubación las células se fijan y se permeabilizan a temperatura ambiente en PermiFlow (Invirion, Frankfort, Michigan) durante 1 hora. Después de la fijación y de la permeabilización, las células se lavan una vez en PBS a pH 7,4 con suero bovino al 2%, se sedimentan por centrifugación a 1000 x g, se lavan nuevamente con citrato salino estándar (SSC, de sus siglas en inglés) 2x, y se sedimentan por centrifugación. El paso de hibridación in situ (FISH de sus siglas en inglés) se lleva a cabo mediante la resuspensión de las células en una mezcla de hibridación que consta de SSC 5X, formamida al 30%, y 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y un cóctel de sondas de oligonucleótidos marcadas en 5' y en 3' (HPV OncoTect, Invirion). La hibridación se lleva a cabo a 43°C durante 30 minutos, seguida de un lavado de 5 minutos en SSC 2X y 0,1% Triton X 100 (Kit reactivo de hibridación ViroTest, Invirion) y un lavado de 15 minutos a 43°C en SSC al 0,1% y Triton X-100 al 0,1%. Las células se resuspenden en PBS a pH de 7,4 con suero bovino fetal al 2% para el análisis mediante citometría de flujo.

4.4.2 Citometría.

La citometría de flujo se lleva a cabo mediante el análisis con tres colores en un citómetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El análisis se delimita a células exocervicales, definidas por las características de dispersión de la luz y por la ausencia de expresión de la citoqueratina CAM 5.2 de bajo peso molecular. Los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs, de sus siglas en inglés) se excluyen del análisis mediante el acotamiento de células positivas para el marcador CD16 de los PMN. Una vez realizado el acotamiento de las regiones a estudio siguiendo estos pasos, las muestras son procesadas únicamente con los reactivos que constituyen el equipo HPV OncoTect. Se eligen sólo las células exocervicales:



4.4.3 Análisis estadístico.

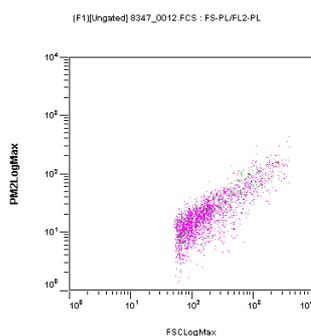
El análisis estadístico de los datos se llevo a cabo mediante el programa informático específico Sigma Stat.

4.4.4 Obtención de Resultados.

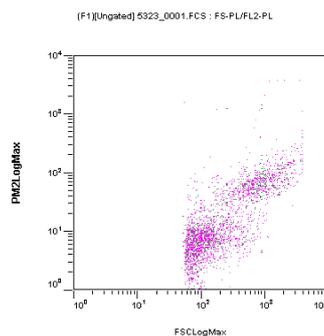
El resultado del análisis por citometría de flujo se expresa como el porcentaje de células exocervicales que presentan sobreexpresión del ARNm de las oncoproteínas E6 y E7. Si el porcentaje está por encima del punto de corte clínico, el resultado de HPV Oncotect^R es positivo, si es menor el resultado es negativo. Para las muestras procesadas se estableció un punto de corte clínico del 2%, considerándose como positivas aquellas muestras que resultaron con dicho porcentaje o superior.

Para que el resultado sea válido es necesario que se adquieran 5000 eventos (“Total Count”) aunque a partir de 3000 el resultado es significativo. De los 5000 eventos al menos 1000 deben corresponder a células exocervicales (“Gated Events”). Dependiendo del fabricante del citómetro de flujo, en ocasiones se establece una concentración máxima de celularidad en la muestra.

La población acotada debe tener la apariencia apropiada, se aportan gráficas a modo de ejemplo.



MALA DISPERSIÓN



BUENA DISPERSIÓN

4.5 P16^{INK4a}- CITOLOGIA LIQUIDA

La sobreexpresión de la proteína p16^{INK4a}, se detecta mediante una técnica de inmunocitoquímica (Cintec^R p16), que se consigue usando un anticuerpo monoclonal ante el p16^{INK4a} con un anticuerpo de ratón, como segundo anticuerpo y es detectado por BAD cromógeno.

La detección bioquímica de p16^{INK4a} se basa en un “enzyme-linked immunosorbent assay “ ELISA , o “lateral flow assays”.

El procedimiento del Cintec^R p16 en citología en Ventana Benchmarck, es el siguiente:

- 1) Recuperación antigénica: Programa CC1, suave.
- 2) Bloqueo de la peroxidasa; Utilizar el Inhibitor of ultraView™ Universal DAB Detection Kit.
- 3) Utilizar el anticuerpo primario para p16 proporcionado por el Kit Cintec Cytology. Incubar durante 44 minutos a 37°C.
- 4) Utilizar el Use ultraView™ Universal HRP Multimer para la visualización (30 minutos a 37°C), Como alternativa al ultraView™ Universal HRP Multimer, se puede utilizar el reactivo de visualización (Vial 3) proporcionado por el Kit Cintec^R de Citología.
- 5) Contrastar con hematoxilina durante 4 minutos.
- 6) Aplicar el “bluying reagent” durante 4 minutos.

4.5.1 Valoración morfológica nuclear de P16^{INK4a}

Los criterios morfológicos de las células están bien definidos, y las células que se tiñen con p16^{INK4a}, están categorizadas de acuerdo a una puntuación morfológica simple y altamente reproducible (234), en función de las características del nucleo celular:

Wentzesten (WEN) Puntuación

0.- Negativos para P16 0

1.- Células normales p16 +..... 1

2. Cualquiera de las siguientes características:

- a) Células con relación núcleo/citoplasma > 50%.
- b) Hiperchromasia.
- c) Anisonucleosis.
- d) Irregularidad de membrana nuclear.

La interpretación de esta puntuación es :

- Cualquiera a) ó b) ó c) ó d) es una puntuación de 2.
- Cualquiera b) ó c) ó d) + a) > 50% relación núcleo / citoplasma es una puntuación de 3.
- b) y/o c) y/o d), es decir más de un criterio de a) ó b) ó c) + a) 50% relación núcleo/citoplasma es una puntuación de 4.

Tabla 7: PUNTUACION nuclear según Wentzensen (P16INK4a)

	0	1	2	3	4
		P16 INK4a positivo	P16 INK4a positivo	P16 INK4a positivo	P16 INK4a positivo
P16INK4a negativo	células normales	Aumento Nucleo-citoplasma >50% ó cromatina alterada (hipercromasia) ó irregularidad membrana nuclear ó anisonucleosis	Aumento Nucleo-citoplasma>50% y cromatina alterada(hipercromasia) ó irregularidad membrana nuclear ó anisonucleosis	Aumento Nucleo-citoplasma>50% y más de uno de los siguientes criterios: cromatina alterada (hipercromasia) y/o irregularidad membrana nuclear y/o anisonucleosis	

Debido a que uno de los criterios de Wenztesten es que la relación N/C sea superior y este criterio no siempre se cumple en LSIL, se ha introducido otra evaluación, en la que se evalúan los distintos criterios como positivo (0), o negativo (1), y efectuando una suma.

Puntuación > 2 : alta sensibilidad para H-SIL.

Wentzensen modificado (WEN MOD) Puntuación

0- Negativos para p16.....0

1.- Células normales p16 +.....1

- a) Células LSIL (relación nucleo/citoplasma < 50%).
- b) Hiperromasia.
- c) Anisonucleosis.
- d) Irregularidad de membrana nuclear

Uno de los 4 criterios (a, b, c, d) es una puntuación de 2.

Dos de los 4 criterios (a, b, c, d) es una puntuación de 3.

Tres de los 4 criterios (a, b, c, d) es una puntuación de 4.

Esta diferente puntuación se basa en que las células LSIL no tienen relación nucleo/citoplasma > 50 %. En el actual estudio, se propone comparar ambas puntuaciones, con el objetivo de mejorar la detección de una lesión de alto grado o cáncer, bien actual o en vías de progresión y de esta forma mejorar la exactitud del diagnóstico.

Las muestras son revisadas por 2 citólogos.

4.6 P16 INK4a- HISTOPATOLOGIA

El estudio de inmunohistoquímica p16^{INK4a} en histología, realizado en las biopsias cervicales practicadas y en las conizaciones, se ha hecho según el siguiente procedimiento:

El estudio inmunohistoquímico se realiza mediante un kit cuyo nombre comercial es Cintec^R Histology Kit (MTM lab, Heidelberg, Germany).

Las muestras proceden de biopsias de cuello uterino fijadas en formol e incluidas en parafina.

Para la detección del antígeno p16^{INK4a} se emplea el anticuerpo primario de ratón monoclonal, clon E6H4TM frente a la proteína p16^{INK4a}.

El reactivo de visualización está compuesto por un polímero conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante y fragmentos de anticuerpos Fab de cabra anti-ratón.

La reacción del cromógeno DAB con la intervención de la peroxidasa de rábano se basa en la formación de un producto de reacción visible en el lugar del antígeno.

Después se realiza la contratinción con hematoxilina .

Montaje de las preparaciones con DPX.

Se evalúan los resultados mediante microscopio.

- El **procedimiento** es el siguiente:

-Las muestras de las biopsias deben ser manipuladas con los métodos estándar.

-Los tejidos preservados en formol tamponado se incluyen en parafina.

-Se realizan los cortes entre 3-5 micras sobre portas con cargas positivas o silanizados.

-Se estufan un mínimo de 1 h en estufa a 65-68°C.

-Se realiza el proceso de desparafinación en xiloles e hidratación del tejido con alcoholes decrecientes hasta agua destilada. (Batería de desparafinar).

-Recuperación antigénica:

-Se diluye el tampón de desenmascaramiento al 1:10 con agua destilada.

-Se sumerge el copling con la solución tapada en el Baño María y se calienta hasta 95-99°C.

-Se sumergen las muestras cuando se ha alcanzado dicha temperatura y se dejan durante 10 minutos.

- Se retiran del Baño María los recipientes con los portas y se dejan enfriar durante 20 min a temperatura ambiente.

- Se lavan los portas un mínimo de 5 min con el tampón de lavado que se ha preparado previamente a la dilución 1:10 con agua destilada.

Se puede guardar este tampón preparado en nevera entre 2-8°C aproximadamente un mes.

El procedimiento del Autostainer es el siguiente:

- Se rellenan los tubitos autostainer graduados con los reactivos del kit necesarios para la realización de la técnica. Se usa el mapa generado por Autostainer del autoprograma p16 biopsias, con el volumen de los reactivos
- Se colocan los tubitos de los reactivos Autostainer en la gradilla para reactivos .
- Se cargan los portas en el Autostainer siguiendo las indicaciones del mapa de los portas.
- Anticuerpo primario Anti-human p16^{INK4a} Volumen final 200 ul por muestra.
- Se programa la selección y se inicia la técnica de p16 para biopsias.

La técnica consiste en :

- Lavados
- 200ul reactivo bloqueante de la peroxidasa 5 min
- Lavados
- 200ul Ac primario proteina anti-p16 30 min
- Lavados
- 200ul reactivo de visualización 30 min
- Lavados
- 200ul solución substrato-cromógeno (DAB) 10 min. Se prepara 1 ml del tampón substrato y se añade 1 gota (25-30ul) de cromógeno DAB y se mezcla cuidadosamente.
- Lavados
- 200ul hematoxilina de Mayer 2-5 min
- Lavados con agua destilada.

- Montaje:

Se recomienda un medio de montaje permanente

Se sumergen las preparaciones en la batería de deshidratación hasta xilol y se procede a montar las láminas con DPX.

4.7 COLPOSCOPIA

A todas las pacientes se les practica colposcopia, con el colposcopio Carl Zeiss f 170, bajo visión directa, tras la aplicación de ácido acético al 5% y lugol.

Los signos colposcópicos menores que sugerirían una lesión de bajo grado serían: superficie lisa, ligera acidofilia que aparece lentamente y desaparece rápidamente, yodonegatividad ligera, irregular y parcial con imágenes de punteado y mosaico finas y regulares.

Se realiza biopsia dirigida en los casos en que se observan características colposcópicas sugestivas de lesión de alto grado (cambios mayores) tanto a nivel de características morfológicas como de área lesional. También en los hallazgos anormales como epitelio acetoblanco, punteado, mosaico, negatividad al yodo o vasos atípicos. También en casos de colposcopia insatisfactoria, infección durante más de dos años por VPH de alto riesgo, o en mujeres mayores de 40 años con infección persistente durante más de dos años.

Las lesiones que han progresado por presentar una alteración citológica de alto grado en el seguimiento, se les realiza biopsia, pero si ocurre al inicio del seguimiento, estas pacientes quedan excluidas del estudio.

Si el estudio histológico de la biopsia cervical confirma lesión de alto grado, ó si informa una lesión de bajo grado persistente durante más de dos años por VPH de alto riesgo oncogénico, se practica conización.

- En todos los casos que la conización ha confirmado un alto grado, se ha informado como casos que han progresado.
- Si en la conización se confirma un bajo grado, se contabiliza como no progresiva o mantenimiento.
- Si el estudio anatomopatológico del cono es negativo para células malignas, se considera resolución espontánea.

Todas las muestras citológicas se han estudiado a ciegas, ya que se ha escogido la primera citología alterada y sin conocer la evolución posterior de las pacientes.

4.8 PACIENTES

Todas las pacientes seleccionadas son diagnosticadas de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado para células escamosas (L-SIL, CIN 1) según la clasificación de Bethesda 2001, en muestras de citología líquida, en el Hospital Universitario del Mar de Barcelona con fecha de inicio de la primera citología estudiada entre enero y noviembre del año 2005.

Los **criterios de inclusión** son:

- Todas las pacientes presentan un primer diagnóstico con citología líquida de lesión intraepitelial de bajo grado. Primera citología con diagnóstico LSIL.
- Presencia de VPH H-R, de alto riesgo, determinada por PCR.
- Segunda citología líquida con diagnóstico de LSIL
- Se repite citología periódica entre 6 y 12 meses aleatoriamente en función de las necesidades de cada paciente y de cada consultorio.
- Seguimiento mínimo de 24 meses.
- No se haya practicado biopsia de cérvix durante el primer año de seguimiento. A partir del primer año, sólo si hay cambios en la citología hacia progresión o se observan cambios mayores en la colposcopia.
- Si después de dos años de seguimiento, persiste la lesión intraepitelial de bajo grado por citología, se practica biopsia cervical bajo control colposcópico, si el estudio histopatológico de la biopsia confirma LSIL, se siguen controles, o bien en función del caso, se practica conización cervical.

Los **criterios de exclusión** son:

- Antecedentes de lesión cervical intraepitelial o alteraciones nucleares sugestivas de infección por papilomavirus en los últimos dos años.
- Biopsia cervical previa en los dos últimos años previos, anteriores al diagnóstico de L-SIL
- Biopsia cervical durante el primer año de seguimiento.

- Infección por VIH.
- Otras causas de inmunosupresión (trasplante renal).
- Edad menor de 22 años.
- Seguimiento de la paciente mediante citologías cervicales durante un período de tiempo menor a un año.
- No tener mínimo dos citologías de células cervicales con resultado LSIL, de seguimiento, o presentar ASCUS persistente.
- La pacientes que progresaron inmediatamente a SIL alto grado (H-SIL).
- Progresión hacia un carcinoma in situ o mayor.
- Gestación actual o durante el seguimiento.
- Todas las pacientes que no se pudieron encontrar sus antecedentes, datos personales y todas las que no acudieron a los controles o si se perdió el seguimiento.

La exclusión de las pacientes en las que se ha practicado biopsia cervical durante el primer año de seguimiento, es por dos motivos:

- Si se ha realizado biopsia porque la citología ha evolucionado a una lesión de alto grado, o porque se han observado cambios mayores en la colposcopia. Este caso podría ser un HSIL enmascarado previamente y que se manifiesta enseguida y entonces no lo podemos incluir porque ya es una lesión de alto grado (HSIL) y no una lesión de bajo grado (LSIL).
- Si la biopsia se practica por ansiedad de la paciente, o por tranquilidad del médico, en el caso de una lesión mínima, el hecho de realizar una biopsia podría eliminar la lesión y entonces sería curativa.

Se excluyen las pacientes de edad igual o menor a 22 años , según las guías clínicas de la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), cuando la paciente es menor de 21 años y entraría en duda en las menores de 25 años, no es necesario aplicar ningún test de tipificación o cualquier prueba de detección viral, por lo que el seguimiento debe ser únicamente citológico (236).

4.9 VARIABLES OBJETO DE ESTUDIO

Se analizaron las siguientes variables:

4.9.1 Variables epidemiológicas:

- Datos personales de las pacientes, donde se incluyen filiación, edad, número de historia clínica y número de citología. El número de citología sirve como de número de identificación.
- Antecedentes familiares generales y en concreto de algún tipo de càncer.
- Se estudia la asociación de cofactores que podrían favorecer la progresión de una lesión cervical hacia la malignidad tras la infección del virus como: edad actual, edad de inicio de las relaciones sexuales, número total de parejas sexuales, parejas de riesgo, paridad, antecedentes de interrupción voluntaria de embarazo, anticoncepción hormonal (años de duración, situación actual), menopausia, otras lesiones asociadas a VPH, infecciones de transmisión sexual, tabaco (años, número de cigarrillos al día, si el hábito tabáquico es antiguo y no es actual, se tienen en cuenta los años previos de consumo de tabaco), consumo o adicción a drogas, raza y país de origen.

4.9.2 Determinaciones virales y técnicas de detección de lesión celular.

-Se detecta en todas las muestras líquidas de citología cervical con diagnóstico de lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL), la presencia virus mediante la técnica de tipificación PCR, Clart^R-HPV 2.

-En las mismas muestras se cuantifica el ARN mensajero de las oncoproteínas E6 y E7 utilizando una técnica de hibridación in situ fluorescente y un posterior análisis mediante citometría de flujo (HPV Oncotect^R) (197). Se considera positivo un resultado de sobreexpresión > o igual a 2 %.

-Tinción con p16^{INK4a} de las muestras citológicas y determinación de las células positivas a la tinción. Se aplica el criterio de puntuación nuclear de Wentzensen (WEN) y se compara con otro criterio de puntuación, denominado Wentzensen modificado (WEN MOD) (237).

Una puntuación > o igual a 2 se considera positivo.

-En las biopsias cervicales y en las conizaciones practicadas también se incluye la tinción inmunohistoquímica p16^{INK4a}.

En los casos que se practica conización cervical, se incluye el tipo histológico, el grado histológico según la clasificación de OMS y el estado de afectación de los márgenes.

Se establecen los criterios de riesgo de la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) para la realización de una conización o una escisión de la zona de transformación mediante asa diatérmica: colposcopia insatisfactoria, lesiones amplias o legrado endocervical positivo, lesiones persistentes durante al menos dos años, o mujeres mayores de 40 años .

En este estudio, las lesiones persistentes con imágenes colposcópicas normales y satisfactorias, no se practica conización, aunque hayan pasado más de dos años.

4.9.3 Variables principales objeto de estudio (evolución de la L-SIL):

Se obtienen tres grupos según la evolución de la lesión:

- persistencia de la misma lesión en dos o más citologías líquidas sucesivas
- regresión de la lesión en dos o más citologías líquidas sucesivas y consiguiente curación.
- progresión hacia una lesión intraepitelial de alto grado (SIL alto grado, H-SIL), en este caso con confirmación histológica.

Las variables epidemiológicas de las pacientes se han obtenido de la base de datos Microsoft Acces 2007, “ Aplicación para la gestión de la patología intraepitelial del tracto genital inferior”, cuyos datos se han recogido de manera prospectiva, de manera que luego pudo ser analizada con el paquete estadístico SPSS V 15.0.

4.10 ANALISIS ESTADISTICO

Las variables categóricas se describen mediante frecuencias y porcentajes y las variables cuantitativas mediante media y desviación estándar en caso de variables con distribución normal o con mediana y percentiles y rango en caso contrario.

La variable principal objeto de estudio es la evolución (regresión, persistencia o progresión) de las lesiones intraepiteliales de bajo grado (L-SIL).

Se incluyen como variables independientes a relacionar con la evolución de la L-SIL, la cuantificación de la expresión de E6/E7 y la puntuación mediante los dos sistemas (WEN y WEN MOD) de la positividad de la p16^{INK4a}.

Otras variables de interés son la presencia viral de virus de alto riesgo (presencia/ausencia), así como variables clínico-epidemiológicas, edad, comportamiento sexual, hábito tabáquico, anticoncepción hormonal, edad de inicio de relaciones sexuales, enfermedades de transmisión sexual y otros datos demográficos.

Se realiza la estadística descriptiva de todas las variables objeto de estudio tal y como se ha mencionado anteriormente.

Posteriormente, se procede a realizar el análisis bivariado de los datos, comparando cada una de las variables de interés con la variable evolución de L-SIL, categorizada de la siguiente forma: Persistencia-Progresión vs. Mantenimiento.

Para comprobar si existe asociación entre la variable evolución de L-SIL y las variables de interés categóricas se utiliza test de Chi cuadrado (o prueba exacta de Fisher si no se cumplen criterios de aplicación para Chi cuadrado). Para las variables cuantitativas (cuantificación de la expresión de E6/E7, WEN y WEN MOD) se utiliza el test no paramétrico de U de Mann-Whitney, realizándose además la curva de rendimiento diagnóstico (ROC-receiver operating characteristic) con el fin de obtener el punto de corte de mayor discriminación respecto la variable evolución L-SIL. Una vez obtenido, se calcula la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para los puntos de corte de cada una de las variables.

En el análisis de los datos obtenidos, se aplica la regresión logística. Esta técnica permite estimar la probabilidad de que un paciente presente una determinada patología en función de los resultados de diversas pruebas. En nuestro caso, se trata de cuantificar la probabilidad de que las lesiones constatadas remitan a partir de los análisis efectuados, que comprenden desde la determinación de Oncotech hasta la realización de ciertos exámenes citológicos, cuantificados por medio de variables categóricas o semicuantitativas descritas como cambios morfológicos celulares, hasta

diversas variables relacionadas con el historial del paciente, como la edad, tabaco, paridad, edad inicio relaciones sexuales, número de parejas, consumo de drogas, etc. Se han ensayado diversos modelos de regresión logística, efectuando diversas combinaciones de variables. A continuación describiremos sólo aquellos que han mostrado ser estadísticamente relevantes. Recordemos además que al disponer de una muestra bastante reducida nos hemos visto obligados a buscar modelos sencillos, que no contemplaban el uso simultáneo de muchas variables. Todos los cálculos de regresión logística se han realizado usando Statgraphics Plus para Windows versión 5.1.

Finalmente se ha intentado realizar un modelo de regresión logística binaria con las variables que han resultado ser significativas o marginalmente significativas en el análisis bivariado.

En todos los análisis se ha considerado asociación estadísticamente significativa cuando se obtienen valores de p menores de 0.05. Para el estudio estadístico se ha utilizado el paquete estadístico SPSS v.15.0.

4.11 PLAN DE TRABAJO

4.11.1 Inclusión de las pacientes en el estudio.

- Se han recogido un total de 16022 de citologías cervico-vaginales , en el Hospital Universitario del Mar durante el periodo de tiempo comprendido entre el 15 de diciembre del 2004 hasta el 15 de octubre del 2005.
- Entre éstas, se diagnosticaron 277 casos de lesión de bajo grado de células escamosas de cérvix uterino (1,73%), utilizando citología líquida ThinPrep^R.
- Al inicio del estudio se seleccionaron las siguientes pacientes siguiendo los criterios de exclusión :
- Todas las pacientes con PCR negativo para el VPH: 54 CASOS (19,49%).
- Una vez excluidas todos los casos con PCR negativo para el VPH, se continua con los siguientes criterios de exclusión de las restantes 223 pacientes con PCR positivo:

- Pacientes con PCR positivo para VPH de bajo riesgo oncogénico o no concluyente: 61 casos.

(27,35 % , respecto a 223 pacientes L-SIL, VPH positivas)

(22,02%, respecto a 277 pacientes L-SIL)

- VPH 6 16 casos 7,18 %/223
- VPH 54..... 19 casos..... 8,52%/223
- VPH 44..... 12 casos.....5,38 % / 223
- VPH 61 6 casos..... 2,69 % / 223
- No concluyente..6 casos..... 2,69%/223
- VPH 71,81..... 2 casos.....0,89 %/223

TOTAL : 61 casos

-Una vez excluidas estas 61 pacientes con VPH positivo de bajo riesgo oncogénico (VPH 6, 54,44, 61, 70, 81) y los resultados no concluyentes, el total son 162 pacientes que presentan VPH positivo de alto riesgo oncogénico,

(72,64 % , respecto a 223 pacientes L-SIL, VPH positivas)

(58,48 % , respecto a 277 pacientes L-SIL)

Sobre estas 162 pacientes se aplican los siguientes **criterios de exclusión**:

Por sus **antecedentes** se excluyen:

- 9 pacientes (3,24%) con antecedentes de lesión cervical intraepitelial o alteraciones nucleares sugestivas de infección por papilomavirus en los últimos dos años.
- 12 pacientes (4,33%) con biopsia cervical o cirugía cervical previa en los dos últimos años.

- 17 pacientes (6,14%) con infección por VIH.
- 6 pacientes (2,16%) con otras causas de inmunosupresión, en estos casos todas eran por trasplante renal.
- 7 pacientes (2,53%) con edad menor de 22 años

Durante el **seguimiento** se excluyen:

A partir del primer año, sólo se practica biopsia si hay cambios en la citología hacia progresión o se observan cambios mayores en la colposcopia.

- 5 pacientes (1,81%) se les practica biopsia cervical durante el primer año de seguimiento.
- 18 pacientes (6,50%) no tenían un mínimo de dos citologías sucesivas de células cervicales con resultado LSIL, o en caso de ASCUS persistente, o negativización citológica inmediata.
- 4 pacientes (1,45%) progresaron inmediatamente a SIL alto grado (H-SIL).
- 1 paciente (0,36 %) progresó en la siguiente citología hacia un Ca in situ.
- 4 pacientes (1,45%) se quedaron embarazadas durante el seguimiento.
- 23 pacientes (8,3%) no acudieron a los controles o se perdió el seguimiento.

Una vez aplicados los criterios de exclusión, se han seleccionado 56 pacientes (20,22 %), para el presente estudio.

4.11.2 Seguimiento de las pacientes.

Se han necesitado 3 años después de la etapa de inclusión de las pacientes para establecer un periodo de seguimiento mínimo que permitiera diferenciar e identificar las diferencias o los casos que se mantenían estables, que regresaban con resolución espontánea, y los que progresaban a un grado superior.

4.11.3 Análisis de los datos y redacción del trabajo.

El análisis de todos los datos y resultados definitivos, con el estudio estadístico y la redacción de las conclusiones se han realizado una vez finalizado el periodo de seguimiento, y se ha iniciado en los últimos meses del periodo de estudio. La duración total del estudio, desde su inicio hasta la redacción de los resultados ha sido de 3 años

Tabla 8: cuadro resumen de los casos excluidos

Exclusión por VPH negativo	PCR negativo	N: 54 (19,49 %)
Exclusión por VPH de bajo grado	PCR VPH de bajo grado	N: 61 (22,02%)
Exclusión por antecedentes	-Lesión cervical intraepitelial - Biopsia o cirugía cervical -Infección VIH - Transplante renal -Menor de 22 años	N: 9 (3,24%) N:12 (4,33%) N:17 (6,14%) N:6 (2,16%) N:7 (2,53%)
Exclusión durante el seguimiento	-Biopsia cervical primer año - No tener dos citologías consecutivas L-SIL. -Progresión inmediata H-SIL. -Progresión Carcinoma in situ. -Gestación. -Pérdida seguimiento	N:5 (1,81%) N:18 (6,50%) N:4 (1,45 %) N:1 (0,36%) N:4 (1,45%) N:23 (8,3%)

PACIENTES INCLUIDAS : N:56 (20,22%)

TOTAL PACIENTES LSIL: N:277 (100%)

RESULTADOS

5.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Al hacer el análisis que ha motivado la realización de este estudio prospectivo para la predicción de la evolución de lesiones epiteliales escamosas de bajo grado, de un total de 16022 citologías cérvico-vaginales, se han seleccionado 277 pacientes (1,73 %) , diagnosticadas de lesión de bajo grado de células escamosas de cérvix uterino, según la clasificación citológica de Bethesda 2001 , utilizando citología líquida ThinPrep, en el periodo comprendido entre el 15 de diciembre de 2004 y el 15 de octubre de 2005, en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario del Mar.

Entre estas 277 pacientes, se aplican unos estrictos criterios de exclusión, con la finalidad de homogeneizar el grupo y evitar sesgos de selección:

1) En el inicio se excluyen :

54 pacientes (19,49 %) con PCR negativa para el VPH.

61 pacientes (22,02%) con PCR positivo para VPH de bajo riesgo oncogénico.

2) Por sus antecedentes se excluyen :

9 pacientes (3,24%) con antecedentes de lesión cervical intraepitelial o alteraciones nucleares sugestivas de infección por papilomavirus en los últimos dos años.

12 pacientes (4,33 %) con antecedentes de biopsia cervical o cirugía cervical previa en los dos últimos años.

17 pacientes (6,14 %) con infección por VIH.

6 pacientes (2,14%) con otras causas de inmunosupresión, en estos casos era por trasplante renal.

7 pacientes (2,53%) con edad menor de 22 años.

3) Durante el seguimiento se excluyen :

5 pacientes (1,81%) se les practica biopsia cervical durante el primer año de seguimiento.

18 pacientes (6,50%) no tienen un mínimo de dos citologías de células cervicales sucesivas con resultado LSIL, o en caso de ASCUS persistente, o negativización citológica inmediata.

4 pacientes (1,45 %) progresaron inmediatamente a SIL alto grado (H-SIL).

1 paciente progresó en la siguiente citología hacia un Ca in situ.

4 pacientes (1,45%) se quedaron embarazadas durante el seguimiento.

23 pacientes (8,3%) no acudieron a los controles o se perdió el seguimiento.

Por lo tanto, entre las 277 pacientes diagnosticadas durante el periodo referido, sólo se seleccionaron 56 (20,22%) para este análisis. Todas presentan un primer diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de bajo grado (L-SIL) en citología líquida, se ha podido realizar un seguimiento y se han aplicado las técnicas moleculares de detección VPH.

5.2 VARIABLES PRINCIPALES OBJETO DE ESTUDIO.

Se obtienen tres grupos según la evolución de la lesión:

Tabla 9. Población de estudio

	REGRESION	PERSISTENCIA	PROGRESION
N	27	24	5
%	48,21%	42,86%	8,93%

- Se considera persistencia de la misma lesión en dos o más citologías líquidas sucesivas , hasta el final del periodo de seguimiento.

N = 24 pacientes (42,86 %).

- Regresión de la lesión en dos o más citologías líquidas y consiguiente curación o resolución espontánea:

N = 27 pacientes (48,21 %).

- Progresión hacia una lesión intraepitelial de alto grado (SIL alto grado, H-SIL), N = 5 casos (8,93 %). Pero es siempre después de mínimo dos citologías sucesivas con diagnóstico de lesión de bajo grado, L-SIL.

Se trabaja una muestra randomizada y homogénea.

El periodo mínimo de seguimiento es de 3 años.

Todos los datos se han estudiado de forma prospectiva, excepto los antecedentes.

5.3 VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS DE LA MUESTRA

Las variables epidemiológicas de las pacientes se han obtenido de la base de datos Microsoft Acces 2007, mediante formularios especialmente confeccionados para patología cervical, "Aplicación para la gestión de la patología intraepitelial del tracto genital inferior", cuyos datos se han recogido de manera prospectiva, después son analizados mediante el estudio estadístico informatizado en el programa Statistics Process Social Sciences, en su versión SPSS V 15.0., en un procesador IBM-PC. En todos los análisis se excluye de manera automática, aquellos sujetos con valor desconocido (missing).

Las variables a estudiar no asimilan la normalidad en el test de Kolmogorov-Smirnov, ni la homogeneidad al test de Cochran, por lo que se utilizan pruebas no paramétricas en el estudio estadístico.

La edad media de las pacientes incluidas en el estudio es de 44,5 años (SD 10,6; rango 22-67 años).

La edad media de menopausia es de 48,5 años (SD 4,1; rango 45-52), en las 13 pacientes (23,21%) identificadas.

La paridad media fue de 2,5 (rango 0-5).

Otros datos epidemiológicos de interés recogidos son: tabaco actual, cantidad de cigarrillos, años previos de consumo de tabaco, anticoncepción hormonal actual y años previos de la misma, tratamientos hormonales, antecedentes de interrupción

voluntaria de embarazo, consumo de drogas, enfermedades de transmisión sexual, raza, país de procedencia.

No existían antecedentes familiares de interés.

Las pacientes postmenopáusicas no se encontraban bajo tratamiento hormonal sustitutivo.

Las pacientes no presentaban sintomatología en el momento del diagnóstico.

5.3.1 Estudio de la homogeneidad de la población según el tabaco

Los resultados de las variables epidemiológicas en relación al tabaco :

Tabla 10. Tabaco actual y riesgo de progresión hacia HSIL

	REGRESION N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA N= 24 (42,86%)	PROGRESION N= 5 (8,93%)	P.VALOR
NO TABACO ACTUAL	10 (17,86%)	12 (21,43%)	2 (3,57%)	0,268
SI TABACO ACTUAL	17 (30,35%)	12 (21,43%)	3 (5,36%)	

El número total de pacientes fumadoras es 32 (57,14 %)

La progresión de la lesión y el hábito tabáquico no muestran diferencias significativas, contribuyendo en la homegeneidad de la muestra. Por lo tanto, el

factor tabaco no influye en la incidencia de progresión, y por tanto no influye en los resultados finales.

-Tabla 11. Cantidad de tabaco y riesgo de progresión hacia HSIL

CANTIDAD TABACO	REGRESION N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA N= 24 (42,86%)	PROGRESION N= 5 (8,93%)	P.VALOR
< 5 cig / día	9 (16,07%)	14 (25 %)	1 (1,79%)	0,667
5-20 cig/ día	11 (19,64%)	7 (12,5%)	2 (3,57%)	
20-40 cig/ día	7 (12,5%)	3 (5,36 %)	2 (3,57%)	

No se observa relación significativa entre la cantidad de tabaco y el riesgo de progresión hacia una lesión de alto grado o mayor.

Tabla 12. Años previos de tabaco y riesgo de progresión hacia HSIL

Distribución de años de tabaco entre las 5 pacientes (8.93%), que presentaron una progresión hacia una lesión de alto grado y una persistencia de la lesión en 24 pacientes (42,86%) y las 27 pacientes (48,21%) en que la lesión ha desaparecido.

	REGRESIÓN N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA + PROGRESION N=29 (51,79%)	P. VALOR
AÑOS PREVIOS DE TABACO	10 (0-40)	5 (0-27)	0,238

Los años de consumo de tabaco, no muestra diferencias significativas respecto al riesgo de evolución de la lesión intraepitelial hacia un alto grado.

5.3.2 Estudio de anticoncepción oral y riesgo de progresión hacia HSIL

-Tabla 13. Anticoncepción actual y riesgo de progresión hacia HSIL

	REGRESION N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA N= 24 (42,86%)	PROGRESION N= 5 (8,93%)	P. VALOR
NO A.O ACTUAL	13 (23,21%)	17 (30,35%)	3 (5,36%)	0,097
SI A.O ACTUAL	14 (25%)	7 (12,51%)	2 (3,57%)	

La diferencia es no significativa, aunque en los diferentes estudios no existen pruebas concluyentes de su asociación.

5.3.3 Estudio de otras variables y riesgo de progresión hacia HSIL

Tabla 14. Valor mediana-máximo-mínimo de años de anticoncepción oral, paridad, edad de inicio de relaciones sexuales y número total de parejas en cuanto a regresión y progresión de la lesión

	REGRESIÓN N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA + PROGRESION N= 2 9 (51,79%)	P. VALOR
AÑOS DE A.O	2 (0-15)	2 (0-8)	0,408
PARIDAD	1 (0-5)	1 (0-2)	0,746
EDAD INICIO R.S	18 (15-27)	17 (15-25)	0,558
Nº PAREJAS	5 (1-25)	3 (1-25)	0,384

A.O : anticoncepción oral . R.S: relaciones sexual

No existe diferencia estadísticamente significativa entre años de anticoncepción previa y riesgo de progresión hacia una lesión de alto grado.

La diferencia no es estadísticamente significativa entre antecedentes de número de partos y riesgo de progresión.

No existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a riesgo de progresión, con la edad de inicio de relaciones sexuales.

No se encuentra relación estadísticamente significativa con el número de parejas sexuales. Si que podría asociarse a un aumento de riesgo de adquirir la infección por el VPH y a que ésta sea causada por diferentes genotipos.

Tabla 15. Antecedentes de interrupción legal de embarazo (I.L.E)

Nº PACIENTES I.L.E	REGRESION N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA N= 24 (42,86%)	PROGRESION N= 5 (8,93%)
8 (14,29%)	2 (3,57%)	5 (8,93 %)	1 (1,79 %)

- Antecedentes de enfermedades de transmisión sexual

Un caso de Hepatitis C, que se presenta en una paciente en la que la lesión intraepitelial de bajo grado progresa a una lesión de alto grado.

El resto de casos no presentan antecedentes de enfermedades de transmisión sexual.

- Consumo de drogas.

Entre el consumo de drogas, sólo se presenta un caso de hachis. En este caso la lesión intraepitelial de bajo grado regresa espontáneamente, se trata de una mujer de 22 años.

Tabla 16. País de origen y raza.

	REGRESION N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA N= 24 (42,86%)	PROGRESION N= 5 (8,93%)	TOTAL
España	21 (37,49%)	14 (25%)	5 (8,93%)	40 (71,42%)
Europa, raza blanca		3 (5,36%)		3 (5,36%)
Sudamérica, raza india	5 (8,93%)	5 (8,93%)		10 (17,86%)
Sudamérica, raza blanca	1 (1,79%)	2 (3,57%)		3 (5,36%)

Tabla 17. Pacientes en periodo postmenopausia.

Nº PACIENTES POSTMENOPAUSICAS	REGRESION N = 27 (48,21%)	PERSISTENCIA N= 24 (42,86%)	PROGRESION N= 5 (8,93%)
13 (12,21%)	7 (12,5%)	5 (8,93 %)	1 (1,79 %)

- Las cinco pacientes que progresan son de las siguientes edades: 22, 31, 40, 46 y 49 años.

Entre las pacientes que progresan, podemos observar que la edad de las pacientes es muy variable y además son pocos casos, por lo que no se puede establecer una relación entre la edad y factor de riesgo.

Cuando se dividió el IMC (Índice de masa corporal) en diferentes categorías, según el resultado del mismo, se obtuvo que 40 pacientes (71,43 %) tenían un índice inferior a 25, que se denominaron pacientes con normopeso; 14 pacientes (25 %) tenían un IMC entre 25 y 30, que eran casos con sobrepeso y 2 pacientes (3,57%) tenían un IMC superior A IMC, las llamadas pacientes con obesidad. Sin encontrar ninguna asociación entre el peso de la paciente y el riesgo de progresión.

Por lo que se refiere al análisis de los factores morfológicos, que determinan la evolución de la lesión, se valora el tipo histológico de las biopsias cervicales y de las conizaciones, ya que contribuyen al resultado final.

Se practican 11 conizaciones, entre las cuales 6 casos corresponden a CIN1-displasia leve y 5 casos a CIN2-3, displasia moderada-severa.

5.4 VARIABLES CUANTIFICABLES. DETERMINACIONES VIRALES

En la determinación del tipo de virus , mediante PCR (Clart^R- HPV2), todas la tipificaciones correspondían a virus de alto riesgo, para poder cumplir los criterios de inclusión. Las determinaciones han sido las siguientes:

Entre las 106 pacientes que cumplían el criterio de inclusión positivas para VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), pero que han sido excluidas una vez aplicados los criterios de exclusión, correspondían a los siguientes genotipos:

Tabla -18-19-20-21: Distribución de genotipos VPH-AR en el total de pacientes

Tabla18: pacientes excluidas
con VPH-AR positivo

PACIENTES EXCLUIDAS CON VPH-AR		
VPH	N:106	%
16	28	26,4
31	15	14,16
53	11	10,38
58	10	9,44
35	8	7,55
33	7	6,6
59	7	6,6
45	6	5,66
18	5	4,72
56	5	4,72
52	4	3,77

Tabla 19: pacientes incluidas
con VPH-AR positivo

REGRESIÓN ESPONTANEA: 27 CASOS(48,21 %)		
VPH	N:27	%
52	6	10,7
31	4	7,14
58	3	5,35
35	3	5,35
39	3	5,35
51	2	3,57
16	1	1,79
18	1	1,79
45	1	1,79
33	1	1,79
16,70	1	1,79
16,53	1	1,79

Tabla 20: pacientes incluidas
con VPH-AR positivo

VPH TIPO N:24 CASOS 42,86%		
PERSISTENCIA DE L-SIL		
VPH	N: 24	%
16	5	8,95
31	2	3,57
33	2	3,57
52	2	3,57
45	2	3,57
51	2	3,57
58	2	3,57
70,16	3	5,36
39	1	1,79
59	1	1,79
13,33	1	1,79
6,33	1	1,79

Tabla 21: pacientes incluidas
con VPH-AR positivo

PROGRESION: 5 CASOS		
(8,93 %)		
VPH	N: 5	%
16	3	5,35
45	1	1,79
51	1	1,79

La siguiente tabla muestra los porcentajes de distribución de los genotipos de VPH y la asociación con el seguimiento de las lesiones cervicales intraepiteliales, y observamos que se correlacionan con los revisados en la bibliografía.

Tabla 22: VPH-AR y asociación con el seguimiento LSIL

GENOTIPO	REGRESIÓN	MANTENIMIENTO	PROGRESIÓN	TOTAL	
				N:61	%
16	1+2	5+1	3	12	19,67%
52	6	2		8	13,12%
31	4	2	-	6	9,84%
33	1	2+2	-	5	8,20%
51	2	2	1	5	8,20%
58	3	2	-	5	8,20%
45	1	2	1	4	6,55%
39	3	1	-	4	6,55%
70	1	3	-	4	6,55%
35	3	-	-	3	4,92%
59	-	1	-	1	1,64%
66	-	1	-	1	1,64%
18	1	-	-	1	1,64%
53	1	-	-	1	1,64%
6	-	1	-	1	1,64%

Se ha intentado aplicar un programa estadístico para relacionar los genotipos virales y el riesgo de progresión , pero debido al pequeño tamaño de la muestra y a la variedad de serotipos no se han podido correlacionar ni encontrar un modelo que permita extraer resultados concluyentes.

Por ejemplo el genotipo 6 que es de bajo riesgo, se encuentra asociado a un genotipo 33 de VPH de alto riesgo (VPH-AR), y este caso corresponde a una persistencia. El genotipo 18 corresponde a una paciente de 22 años, éste fue un caso de regresión espontánea, y es la única paciente de esta edad. En esta franja de edad, la mayoría de tasas positivas a VPH desaparecen, por lo que si se aplicara como prueba única en screening primario, éste sería muy sensible, pero con una especificidad muy baja.

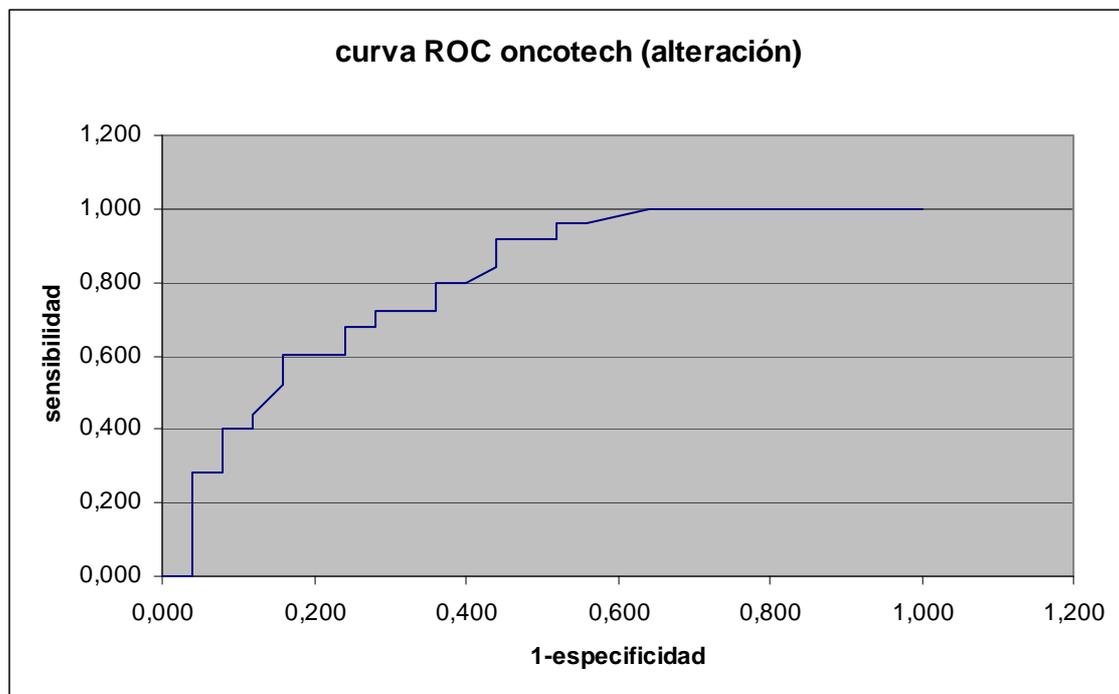
5.5 CUANTIFICACIÓN DE ONCOPROTEINAS Y ASOCIACIÓN CON UNA FUTURA PROGRESION DE LA LESION INTRAEPITELIAL DE BAJO GRADO. L-SIL.

Considerando positivo un resultado de sobreexpresión de oncoproteinas $\geq 2,00\%$.

Tras aplicar el **test de Chi cuadrado**, se obtiene una sig. asintótica bilateral de **p= 0,002**, por lo que se considera significativa.

En el siguiente gráfico, se observa la **curva ROC**, (roc - receiver operating characteristic) con el fin de obtener el punto de corte de mayor discriminación respecto a la variable evolución LSIL.

Curva ROC: Cuantificación de oncoproteinas- progresión hacia HSIL



El área bajo la curva es:

Area bajo la curva de Oncotech para predecir persistencia-progresión	IC 95 %	
	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0,794	0,669	0,920

Si consideramos positivo, la determinación de oncoproteínas > o igual al 2%, se obtiene:

Una sensibilidad de 80 %

Una especificidad de 64 %

Con un V.P.P de 69% y V.P.N de 76,2%.

Tabla 23: Sensibilidades y especificidades para los diferentes puntos de corte.

PUNTO DE CORTE ONCOTECH	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	1- ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD
1,00	0,960	0,480	0,520	0,960
1,10	0,920	0,480	0,520	0,920
1,20	0,920	0,520	0,480	0,920
1,30	0,920	0,560	0,440	0,920
1,40	0,880	0,560	0,440	0,880
1,50	0,840	0,560	0,440	0,840
1,60	0,840	0,560	0,440	0,840
1,70	0,840	0,560	0,440	0,840
1,85	0,800	0,600	0,400	0,800
1,95	0,800	0,640	0,360	0,800
2,50	0,760	0,640	0,360	0,760

- Regresión logística con la variable Oncotech para el pronóstico

Este es el modelo más simple considerado. En este modelo de regresión logística, tratamos de estimar la probabilidad de que la alteración permanezca en función del valor de una transformación de la variable Oncotech exclusivamente. Si llamamos X a la variable Oncotech, hemos utilizado como variable continua independiente en la regresión logística al logaritmo natural de la misma más uno, i.e. $Y = \ln(X + 1)$, ya que esta transformación permite mejorar los resultados de la regresión logística si los comparamos con los obtenidos al usar la variable Oncotech sin transformar. Si llamamos p a la probabilidad de que la alteración observada en un paciente permanezca, el modelo consiste en expresar la función logit de dicha probabilidad como una función lineal de la variable Y , i.e. (238).

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Y$$

La expresión que nos da la probabilidad de que la alteración permanezca, en función de los valores de Y , es:

$$p = \frac{e^{\alpha + \beta Y}}{1 + e^{\alpha + \beta Y}}$$

donde los parámetros α y β son estimados por máxima-verosimilitud a partir de la muestra controlada obtenida. Observamos que, una vez estimados estos parámetros, para un nuevo paciente al que hayamos determinado Oncotech, a partir de la fórmula anterior, podemos estimar la probabilidad de que la alteración de dicho paciente permanezca.

Se ha realizado un test de la bondad de ajuste para validar el modelo, obteniendo un p-valor igual a 0,504462, compatible con las hipótesis introducidas en la regresión logística, pudiendo considerarse que el modelo es adecuado.

El resumen de dicho test puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 24: Test de Bondad de ajuste Chi-cuadrado

Clase	Logit Intervalo	n	VERDADERO		FALSO	
			Observado	Esperado	Observado	Esperado
1	menor que -1,16568	12	1,0	2,16001	11,0	9,83999
2	-1,16568 a -0,305647	9	4,0	3,14929	5,0	5,85071
3	-0,305647 a 0,437255	10	5,0	5,13661	5,0	4,86339
4	0,437255 o mayor	13	10,0	9,1825	3,0	3,8175
Total		44	20,0		24,0	

Chi-cuadrado = 1,36853 con 2 g.l. p-valor = 0,504462

Posteriormente, se ha efectuado un test de la razón de verosimilitud, para determinar si la dependencia entre la probabilidad p y la variable Y es significativa (equivalente a testar si $\beta = 0$ frente a $\beta \neq 0$ en base a la muestra controlada obtenida).

El resumen de este test puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 25: Tests de la Razón de Verosimilitud

Factores	Chi-Cuadrado	G.l.	P-Valor
ln(oncotech+1)	13,4146	1	0,0002

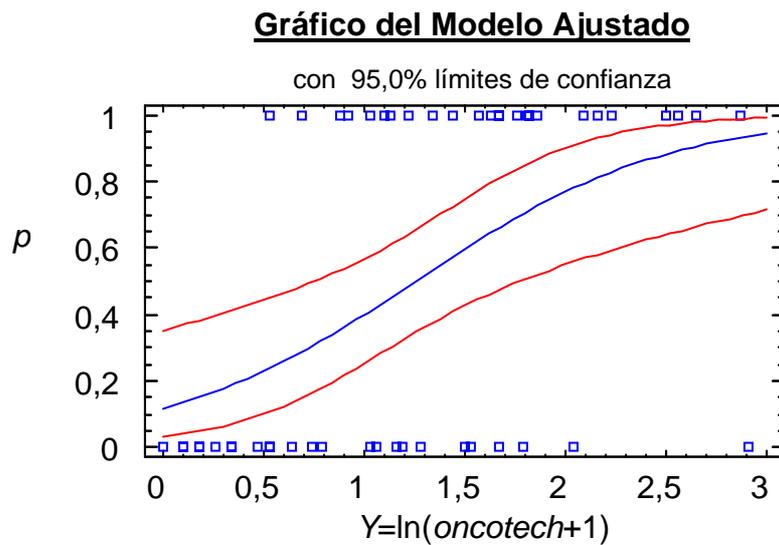
Por lo tanto obtenemos una p-valor igual a **0,0002**. Este resultado nos conduce a rechazar, si trabajamos con un nivel de significación tan pequeño incluso como el 1/1000, a la hipótesis de que la variable Y no influye en la probabilidad p . En otras palabras, rechazamos la hipótesis $\beta = 0$ y aceptamos pues que $\beta \neq 0$: hay una relación estadísticamente significativa entre Y (y por consiguiente la variable Oncotech, X) y p al 99,9% de nivel de confianza. Por tanto la variable Y (o X) influye en el valor de p y la podemos usar para estimar el valor de ésta última.

La estimación máximo-verosímil de los parámetros α y β , así como sus intervalos de confianza, podemos verlos en la siguiente tabla:

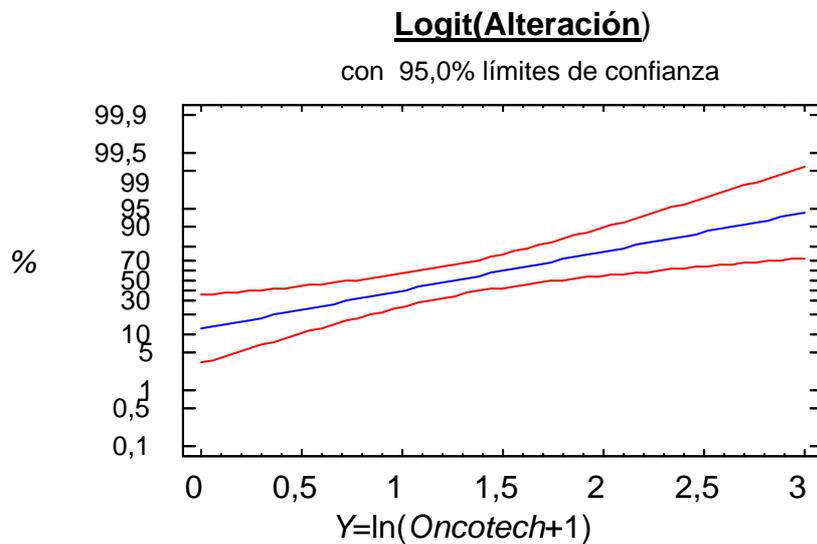
Tabla 26: 95,0% intervalos de confianza para los coeficientes estimados

Parámetro	Estimado	ErrorEstándar	Límite Inferior	Límite Superior
α	-2,02014	0,717779	-3,46334	-0,576949
β	1,61029	0,517223	0,570346	2,65024

La siguiente gráfica expresa la dependencia de p con Y y pueden ser usada para obtener de forma aproximada los valores de p , es decir la probabilidad que una lesión no remita, a partir del valor de Y , calculando dicho valor a partir del valor obtenido de Oncotech. La gráfica permite obtener también un intervalo de confianza al 95% para el valor de p :



De forma parecida, la siguiente gráfica expresa la misma dependencia que la gráfica anterior, pero escalando los valores de las ordenada mediante la función logit de p , $\ln\left(\frac{p}{1-p}\right)$, y etiquetando el eje de ordenadas con los % de la probabilidad de alteración, todo ello en función de Y . La gráfica permite obtener también un intervalo de confianza al 95% para el valor de p :



La siguiente tabla muestra un resumen de la capacidad de predicción del modelo ajustado.

Tabla 27: Rendimiento de la predicción - Porcentaje Correcto

Punto de corte	"Lesión persiste"	"Lesión remite"	Total
0,0	100,00	0,00	50,00
0,05	100,00	0,00	50,00
0,1	100,00	0,00	50,00
0,15	100,00	12,00	56,00
0,2	100,00	32,00	66,00
0,25	96,00	44,00	70,00
0,3	92,00	48,00	70,00
0,35	92,00	56,00	74,00
0,4	84,00	56,00	70,00
0,45	76,00	64,00	70,00
0,5	68,00	72,00	70,00
0,55	64,00	76,00	70,00
0,6	60,00	80,00	70,00
0,65	52,00	84,00	68,00
0,7	40,00	88,00	64,00
0,75	28,00	92,00	60,00
0,8	24,00	96,00	60,00
0,85	16,00	96,00	56,00
0,9	8,00	96,00	52,00
0,95	0,00	100,00	50,00
1,0	0,00	100,00	50,00

En primer lugar, el modelo se utiliza para predecir la respuesta de cada individuo (persistencia de la alteración o su desaparición) utilizando la información de su valor de Oncotech. Si el valor estimado de la probabilidad de persistencia de la lesión es mayor que el punto de corte, se predice que la lesión persistirá (“lesión persiste”) Si en cambio el valor estimado es inferior a o igual al punto de corte, se predice que la lesión remitirá (“lesión remite”). La tabla 27, muestra el porcentaje de datos observados que se han predicho correctamente para diferentes valores del punto de corte. Por ejemplo, utilizando un punto de corte igual a 0,35, el 92,0% de todos los casos en que la lesión persistió se predijeron correctamente (sensibilidad), mientras 56,0% de todas los casos en que la lesión no persistió (remitió) se predijeron correctamente (especificidad), y un porcentaje global de predicción correcta del 74,0%. Por lo tanto, la decisión sobre el valor más adecuado para el punto de corte depende de la sensibilidad y especificidad que deseemos.

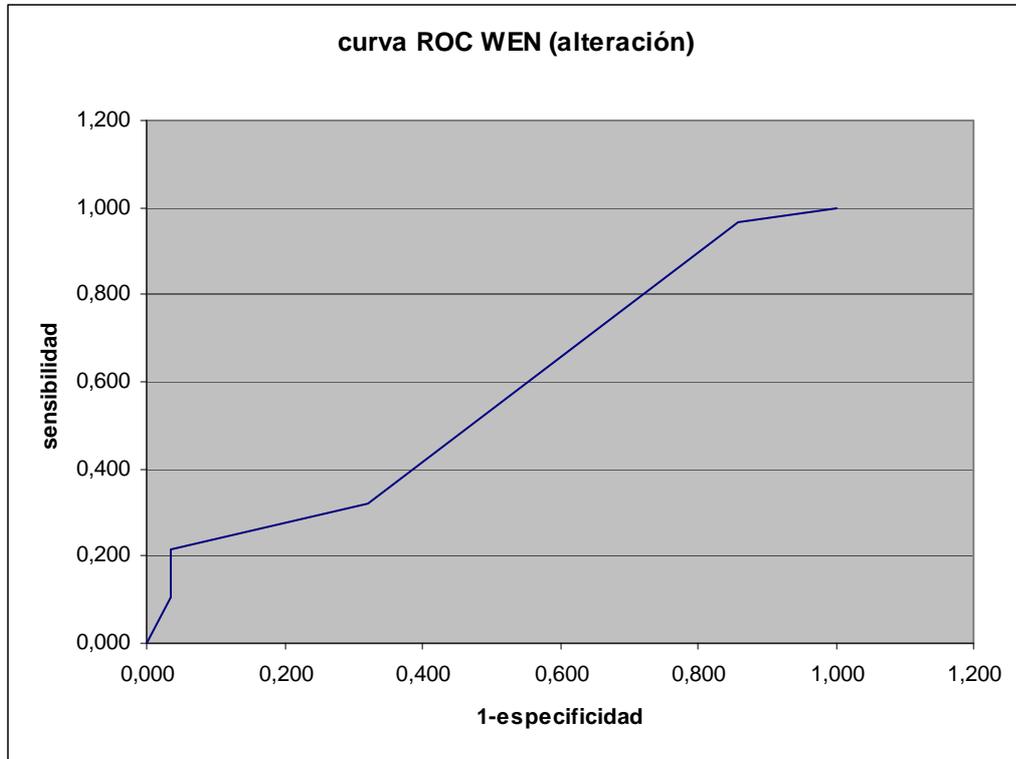
5.6 TINCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA CON P16 INK4a

Vamos a comparar ambas puntuaciones en cuanto a tinción inmunocitoquímica y a morfología nuclear. Primero cada una por separado mediante las curvas ROC y después estableceremos un regresión logística combinando Oncotech y p16 con puntuación de Wentzensen (WEN) y la combinación de Oncotech y Wentztzenen modificado (WEN MOD).

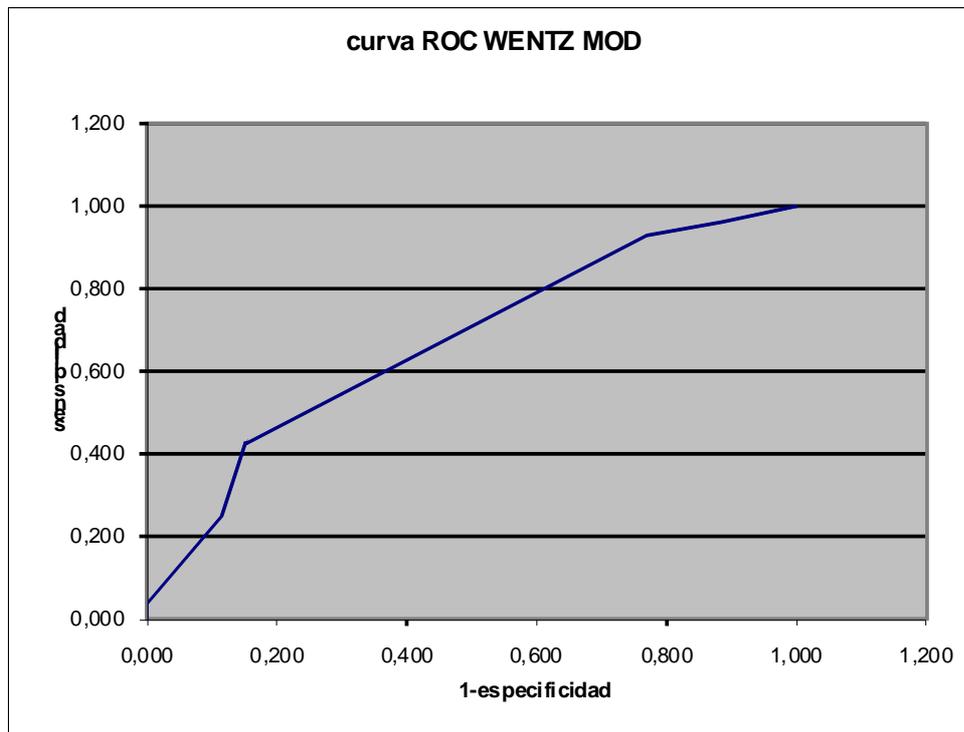
Se tienen en cuenta estas dos clasificaciones, la de “Wentzesten” y la de “Wentztzenen modificada”, en las que se aplican diferentes puntuaciones en cuanto a tinción y a morfología nuclear.

Se considera una Puntuación > 2, como de alta sensibilidad para la detección y/o predicción de H-SIL.

PUNTUACION DE WENTZENSEN .



Tras aplicar el test exacto de Fischer, con la puntuación de Wentzensen, se obtiene una sig. asintótica bilateral de **p= 0,101**, por lo que no se considera estadísticamente significativa.



El test Chi-cuadrado , **la p= 0,041** es estadísticamente significativo. Con la puntuación de “Wentzensen modificada”, si el resultado es >2 se considera positiva, y es cuando la sensibilidad para la detección de H-SIL es más elevada.

Punto corte WEN MOD <	Sensibilidad	Especificidad
-1,00	1,000	0
,50	0,964	0,115
1,50	0,929	0,231
2,50	0,429	0,846
3,50	0,250	0,885
4,50	0,036	1,000
6,00	0,000	1,000

Punto corte WEN <	Sensibilidad	Especificidad
-1,00	1,000	0,000
,50	0,964	0,143
1,50	0,321	0,679
2,50	0,214	0,964
3,50	0,107	0,964
5,00	0,000	1,000

Para un punto de corte >2: **WEN MOD:** sensibilidad 42,9%

especificidad 84,6%

WEN: sensibilidad 21,4%

especificidad 96,4%

La mayor exactitud diagnóstica de una prueba se traduce en un desplazamiento "hacia arriba y a la izquierda" de la curva ROC. Esto sugiere que el área bajo la curva ROC se puede emplear como un índice conveniente de la exactitud global de la prueba: la exactitud máxima correspondería a un valor del área de 1 y la mínima a uno de 0.5 (si fuera menor de 0.5 debería invertirse el criterio de positividad de la prueba).

		INTERVALO DE CONFIANZA ASINTOTICO AL 95 %	
	AREA	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
WEN	0,557	0,402	0,712
WENMOD	0,670	0,525	0,814

Las extensiones citológicas, con las correspondientes tinciones con p16INK4a, que se han obtenido, corresponden a las siguientes imágenes:



Imagen 1: Citología líquida. (ThinPrep) p16. Célula normal p16 + 10 x

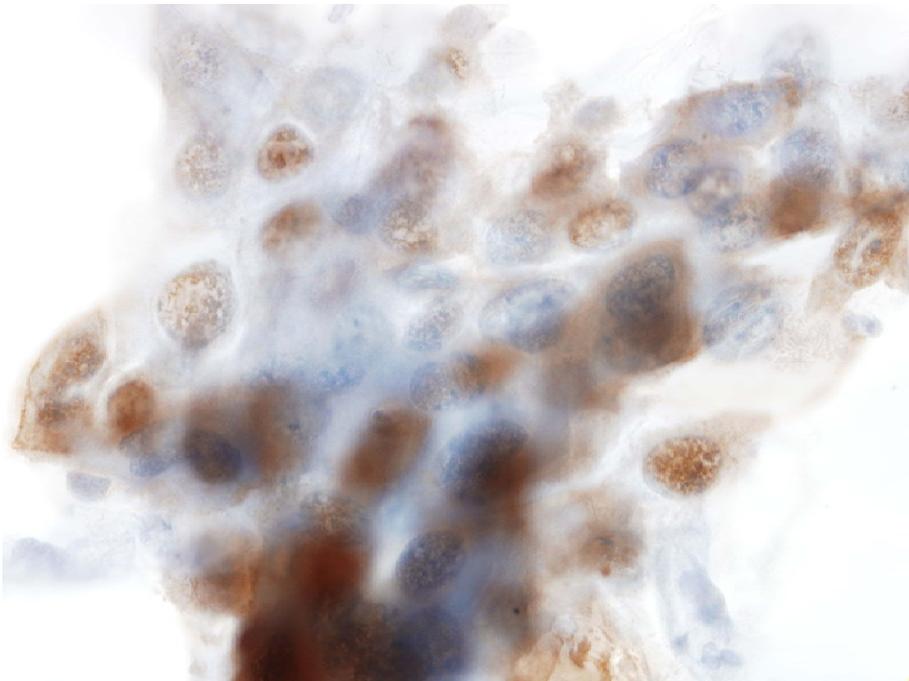


Imagen 2: Citología líquida (ThinPrep). p16: Células atípicas 20 x (Score WEN:3; relación núcleo/citoplasma aumentada; hiperchromasia)

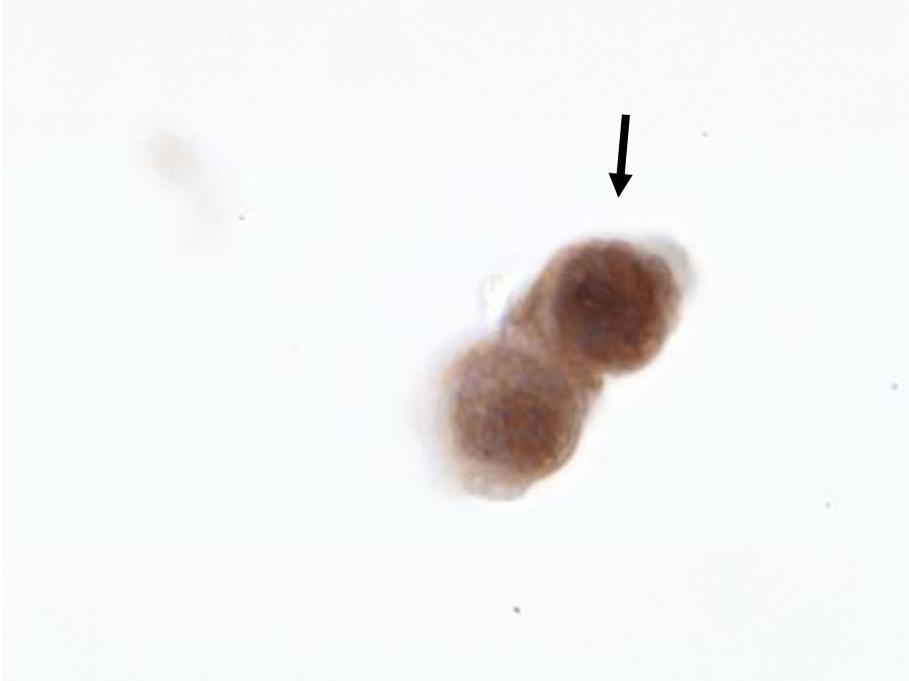


Imagen 3: Citología líquida (ThinPrep). P16: Células atípicas. 20 x (Score WEN: 3; Irregularidad de membrana y relación núcleo/citoplasma aumentada)



Imagen 4: Citología líquida (ThinPrep). P16: Células atípicas. 20 x (Score WEN 4: Irregularidad, hiperchromasia y aumento de la relación núcleo/citoplasma)

5.7 REGRESIÓN LOGÍSTICA CON LAS VARIABLES ONCOPROTEINAS Y P16INK4A CON AMBOS SISTEMAS DE PUNTUACIÓN NUCLEAR.

5.7.1 Regresión logística con las variables Oncotech y Wentzensen.

En este modelo de regresión logística, tratamos de estimar la probabilidad de que la alteración permanezca en función del valor de una transformación de la variable Oncotech, que como en el caso anterior designaremos por Y , y de la variable Wentzensen, a la que designaremos por W . Si llamamos p a la probabilidad de que la alteración observada en un paciente permanezca, el modelo consiste en expresar la función logit de dicha probabilidad como una función lineal de la variable Y , i.e.

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Y + \gamma_i \quad \text{en caso de que } W = i$$

Donde a los parámetros γ_i se les impone la restricción, de carácter técnico, $\sum_i \gamma_i = 0$.

La expresión que nos da la probabilidad de que la alteración permanezca en función de los valores de Y y de W , si $W = i$, es:

$$p = \frac{e^{\alpha + \beta Y + \gamma_i}}{1 + e^{\alpha + \beta Y + \gamma_i}}$$

donde los parámetros α y β son estimados por máxima-verosimilitud a partir de la muestra controlada obtenida. Nótese que, una vez estimados estos parámetros, para un nuevo paciente al que hayamos determinado Oncotech y Wentzensen, a partir de la fórmula anterior, podemos estimar la probabilidad de que la alteración de dicho paciente permanezca.

Se ha realizado un test de la bondad de ajuste para validar el modelo, obteniendo un p-valor igual a 0,260774, compatible con las hipótesis introducidas en la regresión logística, pudiendo considerarse que el modelo es adecuado.

El resumen de dicho test puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 28: Test de Bondad de ajuste Chi-cuadrado

Clase	Logit Intervalo	n	VERDADERO		FALSO	
			Observado	Esperado	Observado	Esperado
1	menor que -1,70686	11	0,0	0,722368	11,0	10,2776
2	-1,70686 a -0,481369	10	3,0	2,53901	7,0	7,46099
3	-0,481369 a 0,652453	10	7,0	5,52249	3,0	4,47751
4	0,652453 o mayor	13	9,0	10,3861	4,0	2,61389
Total		44	19,0		25,0	

Chi-cuadrado = 2,6882 con 2 g.l. p-valor = 0,260774

Posteriormente, se ha efectuado un test de la razón de verosimilitud, para determinar si la dependencia entre la probabilidad p y las variable Y y W son significativas (equivalente a testar si $\beta = 0$ frente a $\beta \neq 0$ y $\gamma_i = 0$ (para todo valor i) frente a $\gamma_i \neq 0$ (para algún valor i) en base a la muestra controlada obtenida). El resumen de este test puede verse en la siguiente tabla

Tabla 29: Tests de la Razón de Verosimilitud

Factores	Chi-Cuadrado	G.l.	P-Valor
ln(oncotech+1)	14,2004	1	0,0002
WEN	12,4832	4	0,0141

Al ser el p-valor obtenido para Oncotech igual a 0,0002, nos conduce a rechazar, si trabajamos con un nivel de significación tan pequeño incluso como el 1/1000, a la hipótesis de que la variable Y no influye en la probabilidad p . En otras palabras, rechazamos la hipótesis $\beta = 0$ y aceptamos pues que $\beta \neq 0$: hay una relación estadísticamente significativa entre Y (y por consiguiente la variable Oncotech, X) y p al 99,9% de nivel de confianza. Por tanto la variable Y (o X) influye en el valor de p y la podemos usar para estimar el valor de ésta última.

Por otra parte, el p-valor obtenido para WEN igual a **0,0141**. Aunque es un valor menos bajo que el p-valor correspondiente a Oncotech, nos conduce a rechazar, si

trabajamos con un nivel de significación del orden del 2/100 ó 5/100, a la hipótesis de que la variable W no influye en la probabilidad p . En otras palabras, rechazamos la hipótesis $\gamma_i = 0$ (para todo valor i) y aceptamos pues que $\gamma_i \neq 0$ (para algún valor i): hay una relación estadísticamente significativa entre W y p al 98% de nivel de confianza. Por tanto la variable Z influye en el valor de p y la podemos usar para estimar el valor de ésta última.

Observamos pues que las dos variables son importantes en la predicción de la probabilidad de que la alteración permanezca.

La estimación máximo-verosímil de los parámetros α , β y γ_i , así como sus intervalos de confianza, podemos verlos en la siguiente tabla:

Tabla 30: 95,0% intervalos de confianza para los coeficientes estimados

Parámetro	Estimado	Error		
		Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
α	-2,18652	1,63639	-5,48662	1,11357
β	2,04988	0,66445	0,709875	3,38987
γ_0	-2,40302	1,90225	-6,23928	1,43324
γ_1	0,284291	1,40417	-2,54749	3,11607
γ_2	-2,67618	1,65953	-6,02296	0,670594
γ_3	14,4202	792,102	-1583,01	1611,85

Se puede observar la relativa imprecisión de las estimaciones, debido al reducido tamaño muestral.

La siguiente tabla muestra un resumen de la capacidad de predicción del modelo ajustado.

Tabla 31: Rendimiento de la predicción - Porcentaje Correcto

Punto de corte	"Lesión persiste"	"Lesión remite"	Total
0,0	100,00	0,00	50,00
0,05	100,00	24,00	62,00
0,1	100,00	28,00	64,00
0,15	100,00	40,00	70,00
0,2	96,00	52,00	74,00
0,25	96,00	64,00	80,00
0,3	96,00	68,00	82,00
0,35	92,00	68,00	80,00
0,4	88,00	72,00	80,00
0,45	84,00	76,00	80,00
0,5	80,00	76,00	78,00
0,55	80,00	76,00	78,00
0,6	68,00	80,00	74,00
0,65	64,00	84,00	74,00
0,7	56,00	88,00	72,00
0,75	52,00	88,00	70,00
0,8	48,00	92,00	70,00
0,85	36,00	96,00	66,00
0,9	20,00	100,00	60,00
0,95	20,00	100,00	60,00
1,0	0,00	100,00	50,00

En primer lugar, el modelo se utiliza para predecir la respuesta de cada individuo (persistencia de la alteración o su desaparición) utilizando la información de su valor de Oncotech y de Wentzensen. Si el valor estimado de la probabilidad de persistencia de la lesión es mayor que el punto de corte, se predice que la lesión persistirá ("lesión persiste") Si en cambio el valor estimado es inferior a o igual al punto de corte, se predice que la lesión remitirá ("lesión remite"). La tabla muestra el porcentaje de datos observados predichos correctamente para diferentes valores del punto de corte. Por ejemplo, utilizando un punto de corte igual a 0,3, el 96,0% de todos los casos en que la lesión persistió se predijeron correctamente (sensibilidad), mientras 68,0% de todas los casos en que la lesión no persistió (remitió) se predijeron correctamente (especificidad), y un porcentaje global de predicción correcta del 82,0%. La decisión sobre el valor más adecuado para el punto de corte depende de la sensibilidad y especificidad que se desee obtener.

5.7.2 Regresión logística con las variables Oncotech y Wentzensen modificado.

En este modelo de regresión logística, tratamos de estimar la probabilidad de que la alteración permanezca en función del valor de una transformación de la variable “Oncotech” , que como en el caso anterior designaremos por Y , y de la variable Wentzensen modificado (Wen Mod) recodificada, considerando tres resultados posibles: valores de Wen Mod iguales a 0 ó 1 (Wen Mod recodificado igual a 0), valores de Wen Mod iguales a 2 (Wen Mod recodificado igual a 1) y valores de ALA mayores que 2 (Wen Mod recodificado igual a 2) a la que designaremos por Z . Si llamamos p a la probabilidad de que la alteración observada en un paciente permanezca, el modelo consiste en expresar la función logit de dicha probabilidad como una función lineal de la variable Y , i.e.

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Y + \gamma_i \quad \text{en caso de que } Z = i$$

Donde a los parámetros γ_i se les impone la restricción, de carácter técnico, $\sum_i \gamma_i = 0$.

La expresión que nos da la probabilidad de que la alteración permanezca en función de los valores de Y y de Z , si $Z = i$, es:

$$p = \frac{e^{\alpha + \beta Y + \gamma_i}}{1 + e^{\alpha + \beta Y + \gamma_i}}$$

donde los parámetros α y β son estimados por máxima-verosimilitud a partir de la muestra controlada obtenida. Nótese que, una vez estimados estos parámetros, para un nuevo paciente al que hayamos determinado Oncotech y Wen Mod recodificada, a partir de la formula anterior, podemos estimar la probabilidad de que la alteración de dicho paciente permanezca.

Se ha realizado un test de la bondad de ajuste para validar el modelo, obteniendo un p-valor igual a 0,197765, compatible con las hipótesis introducidas en la regresión logística, pudiendo considerarse que el modelo es adecuado.

El resumen de dicho test puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 32: Test de Bondad de ajuste Chi-cuadrado

Clase	Logit Intervalo	n	VERDADERO		FALSO	
			Observado	Esperado	Observado	Esperado
1	menor que -1,46652	12	0,0	1,16698	12,0	10,833
2	-1,46652 a -0,116492	10	4,0	3,67916	6,0	6,32084
3	-0,116492 a 0,55227	9	7,0	5,06761	2,0	3,93239
4	0,55227 o mayor	13	9,0	9,73034	4,0	3,26966
Total		44	20,0		24,0	

Chi-cuadrado = 3,24135 con 2 g.l. p-valor = 0,197765

Posteriormente, se ha efectuado un test de la razón de verosimilitud, para determinar si la dependencia entre la probabilidad p y las variable Y y Z son significativas (equivalente a testar si $\beta = 0$ frente a $\beta \neq 0$ y $\gamma_i = 0$ (para todo valor i) frente a $\gamma_i \neq 0$ (para algún valor i) en base a la muestra controlada obtenida). El resumen de este test puede verse en la siguiente tabla

Tabla 33: Tests de la Razón de Verosimilitud

Factores	Chi-Cuadrado	G.l.	P-Valor
ln(oncotech+1)	7,57314	1	0,0059
WEN MOD recod	5,34401	2	0,0691

Al ser el p-valor obtenido para Oncotech igual a 0,0059, nos conduce a rechazar, si trabajamos con un nivel de significación más pequeño incluso que el 1/100, a la hipótesis de que la variable Y no influye en la probabilidad p . En otras palabras, rechazamos la hipótesis $\beta = 0$ y aceptamos pues que $\beta \neq 0$: hay una relación estadísticamente significativa entre Y (y por consiguiente la variable Oncotech, X) y p al 99% de nivel de confianza. Por tanto la variable Y (o X) influye en el valor de p y la podemos usar para estimar el valor de ésta última.

Por otra parte, el p-valor obtenido para Wen Mod recodificado igual a 0,0691. Es un valor que está en el límite de significación, si trabajamos con un nivel de significación del orden del 10/100, rechazaremos la hipótesis de que la variable Z no influye en la probabilidad p . En otras palabras, rechazaremos la hipótesis $\gamma_i = 0$ (para todo valor i)

y aceptamos pues que $\gamma_i \neq 0$ (para algún valor i): hay una relación estadísticamente significativa entre Z y p al 90% de nivel de confianza. Por tanto la variable Z influye en el valor de p y la podemos usar para estimar el valor de ésta última.

Observamos pues que las dos variables son importantes, aunque de forma desigual, en la predicción de la probabilidad de que la alteración permanezca.

La estimación máximo-verosímil de los parámetros α , β y γ_i , así como sus intervalos de confianza, podemos verlos en la siguiente tabla:

Tabla 34: 95,0% intervalos de confianza para los coeficientes estimados

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
α	-1,21602	1,06605	-3,36592	0,933875
β	1,44495	0,587802	0,259531	2,63037
γ_0	-2,64559	1,32832	-5,3244	0,033227
γ_1	-0,388216	0,79498	-1,99145	1,21502

La siguiente tabla muestra un resumen de la capacidad de predicción del modelo ajustado.

Tabla 35: Rendimiento de la predicción - Porcentaje Correcto

Punto de corte	"Lesión persiste"	"Lesión remite"	Total
0,0	100,00	0,00	50,00
0,05	100,00	24,00	62,00
0,1	100,00	24,00	62,00
0,15	100,00	28,00	64,00
0,2	100,00	48,00	74,00
0,25	100,00	52,00	76,00
0,3	100,00	56,00	78,00
0,35	96,00	60,00	78,00
0,4	92,00	68,00	80,00
0,45	92,00	68,00	80,00
0,5	80,00	72,00	76,00
0,55	72,00	76,00	74,00
0,6	68,00	80,00	74,00
0,65	56,00	80,00	68,00
0,7	48,00	88,00	68,00
0,75	40,00	92,00	66,00
0,8	28,00	92,00	60,00
0,85	24,00	96,00	60,00
0,9	8,00	96,00	52,00
0,95	0,00	96,00	48,00
1,0	0,00	100,00	50,00

En primer lugar, el modelo se utiliza para predecir la respuesta de cada individuo (persistencia de la alteración o su desaparición) utilizando la información de su valor de Oncotech y de Wen Mod recodificado. Si el valor estimado de la probabilidad de persistencia de la lesión es mayor que el punto de corte, se predice que la lesión persistirá ("lesión persiste") Si en cambio el valor estimado es inferior a o igual al punto de corte, se predice que la lesión remitirá ("lesión remite"). La tabla muestra el porcentaje de datos observados predichos correctamente para diferentes valores del punto de corte. Por ejemplo, utilizando un punto de corte igual a 0,4, el 92,0% de todos los casos en que la lesión persistió se predijeron correctamente (sensibilidad), mientras 68,0% de todas los casos en que la lesión no persistió (remitió) se predijeron correctamente (especificidad), y un porcentaje global de predicción correcta del 80,0%.

Observaciones de los análisis de regresión logística.

El primer modelo ensayado de regresión logística con la variable Oncotech únicamente, es el más simple y debido al limitado tamaño muestral, proporciona unas estimaciones de los parámetros más precisas. En cuanto a su capacidad predictiva es ligeramente inferior al segundo modelo ensayado. Este segundo modelo, que combina Oncotech con WEN resulta prometedor, teniendo en cuenta los aciertos en la predicción, pero por el contrario la estimación de los parámetros es bastante imprecisa y requiere futuros estudios donde se amplíe la muestra y, tal vez se revise la escala de codificación. El tercer modelo tiene una significación ligeramente peor, si bien su comportamiento global predictivo es bueno. En resumen, a falta de un estudio con un tamaño muestral mayor, es razonable el uso de Oncotech para cuantificar el riesgo de persistencia de las lesiones, tanto usando Oncotech como única variable independiente como combinado su uso con otras variables categóricas como Wen y Wen Mod recodificada.

5.8 BIOPSIAS CERVICALES Y CONIZACIÓN CERVICAL. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA P16^{INK4a}

Se realiza biopsia dirigida, bajo visión colposcópica, en los casos en que se observan características colposcópicas sugestivas de lesión de alto grado (cambios mayores) tanto a nivel de características morfológicas como de área lesional. En los hallazgos anormales como epitelio acetoblanco, punteado, mosaico, negatividad al yodo o vasos atípicos. También en casos de colposcopia insatisfactoria, infección durante más de dos años por VPH de alto riesgo, o en mujeres mayores de 40 años con infección persistente durante más de dos años.

También se realiza biopsia cervical en las lesiones que han progresado por presentar una alteración citológica de alto grado en el seguimiento. Se practica tinción inmunohistoquímica p16^{INK4a} en la primera biopsia cervical.

Entre las 56 pacientes seleccionadas, el total de biopsias cervicales realizadas es de 26, los resultados anatomopatológicos son los siguientes:

-15 displasias leves, de las cuales en el seguimiento posterior:

- 8 .pacientes han confirmado persistencia y se han continuado clasificando como lesión persistente. Entre éstas, se practican 5 conizaciones, que confirman displasia leve-L-SIL: **2 p16 + , 6 p16 -**.
- 7 pacientes en los controles posteriores, la lesión ha desaparecido y se han catalogado como regresión espontanea : **1 p16 + , 6 p16 -**
- 6 pacientes con biopsias negativas: **no se practica P16**.
 - Un caso el seguimiento posterior fue H-SIL y el cono posterior confirmó H-SIL
 - 2 casos con seguimiento posterior de persistencia y entre éstos, un caso confirmado mediante conización como displasia leve o L-SIL
 - 3 casos con resolución espontanea.

Tabla 36: resumen resultado histopatología-p16INK4a

Resultado biopsia N=26 (46,42%)	P16 biopsia	Seguimiento posterior citológico	Conización	Resultado histopatológico conización	P16 conización
N=6 Negativas	No se practica	N=3 regresión	0		
		N=2 persistencia	1 cono	Displasia leve	p16 –
		N=1 progresión	1 cono	Displasia moderada-severa	p16 +
N= 15 Displasia leve	N=3 p16 +	N=1 regresión			
		N=2 persistencia	2 conos	Displasia leve	P16 -
	N=12 p16 -	N=6 regresión			
		N=6 persistencia	2 conos	Displasia leve	P16 -
N= 5 Displasia moderada-severa	N=5 p16+		5 conos	1 Displasia leve 4 Displasia moderada-severa	5 p16 +

- 5 pacientes con biopsia de displasia severa, se practica conización en las cinco:

P16 + en las 5.

- un caso informa displasia leve. L-SIL, se considera como persistencia
- 4 casos confirman displasia moderada-severa, H-SIL.

Si el estudio histológico de la biopsia cervical confirma lesión de alto grado, ó si informa una lesión de bajo grado persistente durante más de dos años por VPH de alto riesgo oncogénico, en edad > 40 años y /o por visualizar cambios menores multifocales o alteraciones mayores a través del colposcopio y/o alteración citológica, se practica conización.

-CONIZACIONES totales practicadas:

11 pacientes: 7 displasia leve- LSIL

5 displasia moderada-severa. H-SIL.

- Se realizó el estudio de p16 en los **conos** practicados:

P16 positivo en los cinco de alto grado o CIN II-III.

P16 positivo y en un solo caso de conización con resultado anatomopatológico displasia leve o CIN 1, es el caso que la biopsia cervical informaba de displasia moderada-severa y tambien la biopsia cervical era p16 positiva.

Restos de conos L-SIL (5 conos) **p16 negativo.**

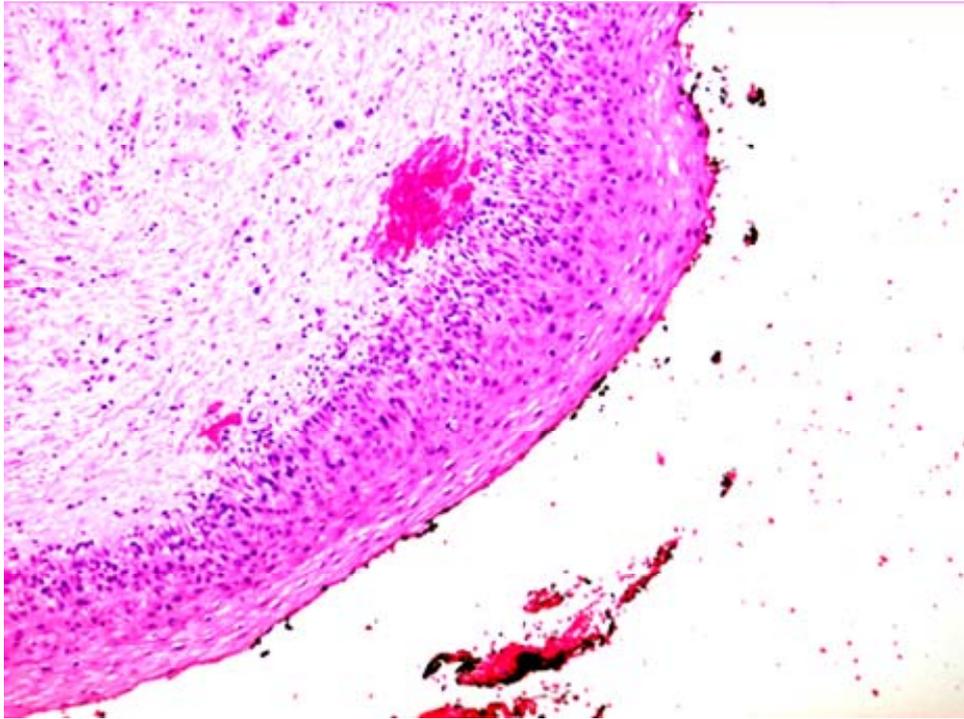


Imagen 5: Displasia leve. Biopsia. HE 10 x

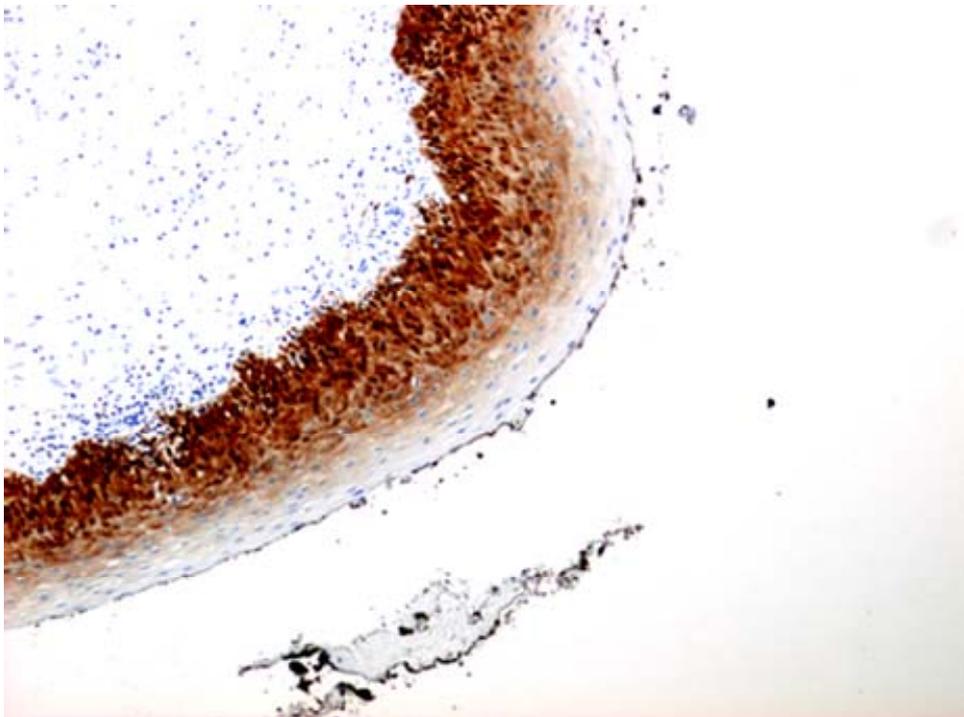


Imagen 6: Displasia leve p16. 10 x

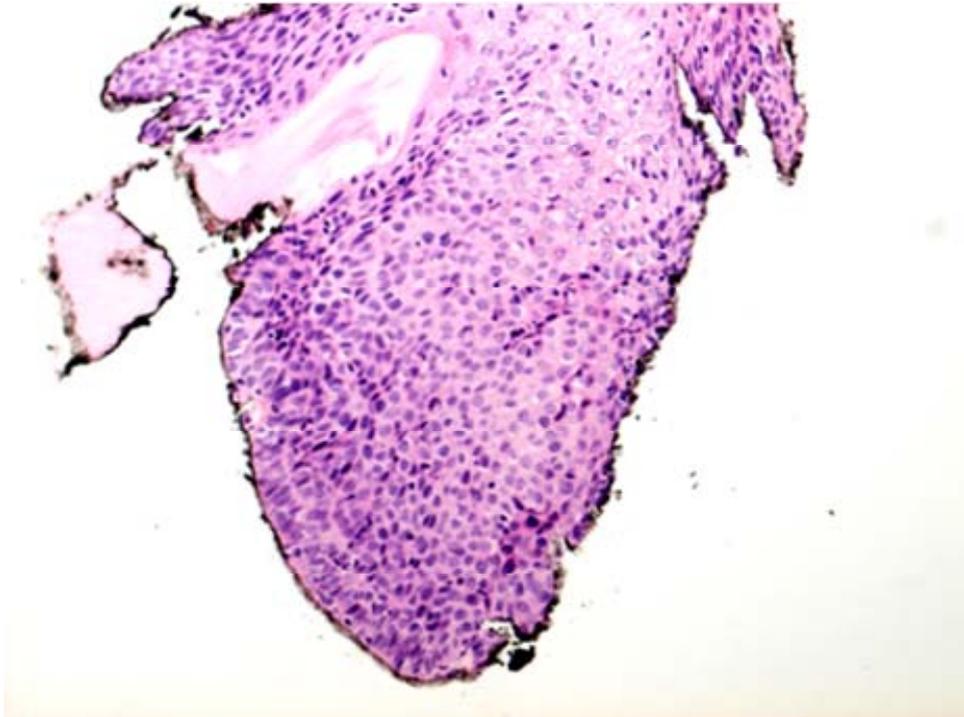


Imagen 7. Displasia severa. HE 20 x

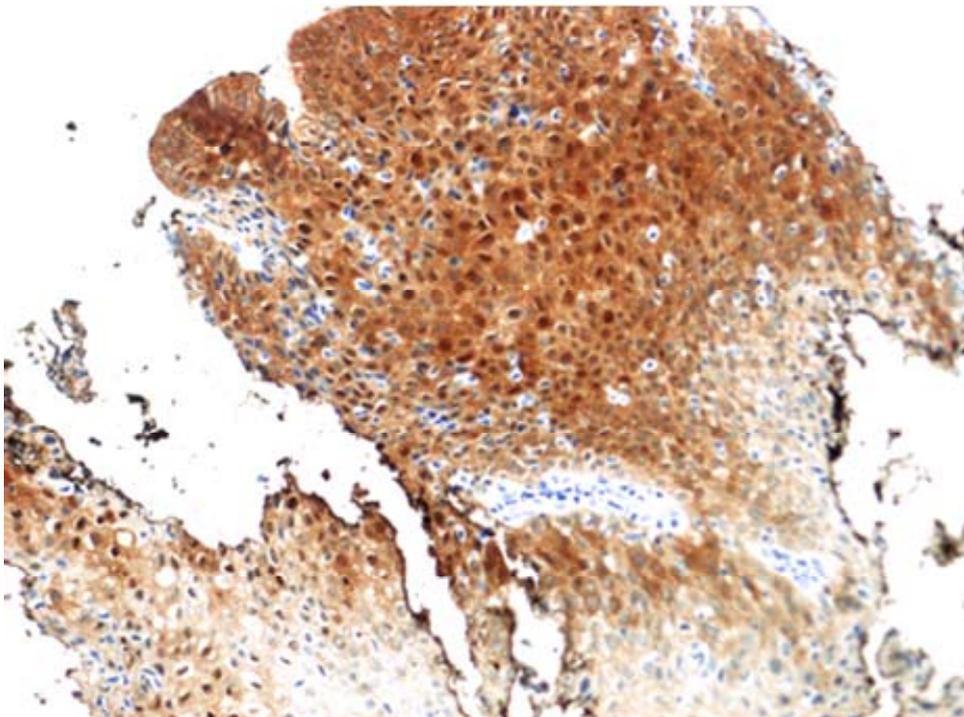


Imagen 8: Displasia severa. P16. 20x

5.9 CORRELACION BIOPSIA CERVICAL, CONIZACION Y CITOLOGIA CON ONCOPROTEINAS, WENTZENSEN MODIFICADO Y VPH.

Se intenta establecer una correlación entre los resultados de las biopsias cervicales, con la citología líquida, la conización cervical en los casos practicados y las determinaciones virales, cuantificación de oncoproteínas y puntuación nuclear de P16^{INK4a}.

1. En los casos con resultados de biopsia cervical **displasia moderada severa**:

- 6 casos : 5 conizaciones con resultado displasia moderada-severa (CIN 2-3)

1 biopsia cervical , que el cono posterior fue displasia leve (CIN 1).

En estos 6 casos el P16^{INK4a} es positivo en todas.

WEN MOD: superior a 2 en 4 casos, igual a 2 en 2 casos.

Oncotech: varía entre 4,8 a 13,2 (media: 8,5).

Tipo de VPH: 51, 52, 16 (3 casos), 45.

La conización que informa displasia leve corresponde al VPH 52.

2. Biopsias cervicales que informan **displasia leve**: 15 casos: 12 P16 negativo.

3 P16 positivo.

WEN MOD: - Cuando P16 es positivo en biopsia:

en citología es 3.

- Cuando P16 es negativo en biopsia:

en citología es 3 en 6 casos.

en citología es menor de 3 en 6 casos..

Oncotech: varía entre 0,7 a 8,3 (media: 3,4)

superior a 2 en 9 casos.

inferior a 2 en 6 casos.

Tipo de VPH: 31 (2 casos), 16 (5 casos), 52 (2 casos), 51 (2 casos),

45 (2 casos), 33 (2 casos).

Es una serie pequeña, pero sin embargo podemos observar que Oncotech y WEN MOD correlacionan mejor en el grupo de displasia moderada severa.

DISCUSION

La historia natural de la infección por VPH, incluido el modelo de transmisión del virus, el desarrollo de la infección persistente, el aclaramiento del virus y la interacción con el sistema inmune está sólo parcialmente conocido. Actualmente, no existe una definición establecida de cuando una infección por el VPH se considera persistente.

El hecho de poder o pretender establecer la predicción de la evolución de una enfermedad, y en concreto de la infección por el VPH, es un importante reto en la medicina actual. Es evidente y sabemos que tanto en las lesiones intraepiteliales cervicales asociadas al VPH, como en el cáncer de cérvix, las cuestiones más importantes están relacionadas con las conductas clínicas de seguimiento y de tratamiento.

La duración media de la infección por VPH es variable según los diferentes estudios, puede oscilar entre 6-12 meses y 2 años. Está claro que es de más larga duración en los VPH de alto riesgo que en los de bajo riesgo (98). También se encuentran diferencias marcadas entre el VPH 16 y el VPH 18 y el resto de genotipos virales. La duración de la infección es difícil de determinar ya que varía según se considere la infección incidente (de adquisición reciente) o la prevalente (la que se desconoce el momento de la adquisición) y además se deben añadir las posibles re-infecciones. Además cuando aparece una alteración en la citología cervical, no sabemos si la infección viral precedía en mucho tiempo a la misma, ya que es un dato casi imposible de conocer, al poder existir virus sin lesión aparente y que éste desaparezca espontáneamente.

Es mucho más frecuente el aclaramiento de la infección que su persistencia. No existe un acuerdo general sobre el tiempo que debe transcurrir para considerar una infección como persistente. En la práctica, se define una persistencia como la detección del mismo tipo viral en dos o más determinaciones realizadas en un periodo de tiempo de uno a dos años. Se conoce que la persistencia de la infección durante más de seis meses, ocurre en menos del 50% de las mujeres infectadas por VPH con citología normal, y sólo persistirá la infección en el 7% de las mismas después de 5 años (69).

Las lesiones pre-neoplásicas se identifican aproximadamente en un 4% de las mujeres sometidas a una revisión citológica periódica. La mayoría de estas lesiones se

agrupan en dos categorías: las lesiones intraepiteliales de bajo grado (L-SIL) y las anomalías escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS, según el sistema Bethesda). Los diagnósticos ASCUS o L-SIL se normalizan espontáneamente en más del 80% de los casos, pero pueden ser la única imagen visible de una lesión más evolucionada y que esté mal representada en la muestra de la citología. En estos casos la determinación de VPH puede ser de ayuda al seleccionar las mujeres en que el VPH está presente. Diversos estudios muestran que aproximadamente el 50% de las lesiones ASCUS tienen asociada una prueba positiva para el VPH. En el caso del L-SIL, la proporción de VPH suele ser muy alta, aproximadamente un 80%, por lo que su detección no nos dará mucha más información.

Las lesiones de displasia severa ó de alto grado (H-SIL), son menos frecuentes y la frecuencia de regresión es probablemente menor al 20%. Se consideraba que un tercio de los diagnósticos de H-SIL tenían una citología previa de ASCUS, pero después de la introducción de la prueba de detección del VPH en el seguimiento de las lesiones ASCUS, estos resultados se están modificando sobretodo después de los resultados de diversos estudios randomizados (121, 150, 239). Pero no ocurre lo mismo con las lesiones de bajo grado, L-SIL.

Cuando ya existe un primer diagnóstico de L-SIL, son pocos los estudios que indiquen cual es la mejor conducta de seguimiento y terapéutica a seguir, El manejo es problemático, principalmente por la falta de estudios aleatorizados que permitan establecer guías de conducta basadas en la evidencia. Son pocas las lesiones intraepiteliales de bajo grado que progresarán hacia un carcinoma microinvasivo y a un carcinoma cervical invasivo. Existe un desconocimiento de las pacientes con mayor riesgo de progresión hacia una lesión de alto grado y además no se puede diferenciar si se trata de una progresión biológica o de una lesión "oculta" en la citología inicial. Una lesión de bajo grado (LSIL, CIN 1) regresa sobretodo en mujeres jóvenes y adolescentes: a los doce meses han regresado el 61 % (IC 95%: 53-70) y a los 36 meses el 91 % (IC 95%: 84-99) (116). No se encuentran estas cifras en los diferentes estudios publicados en mujeres de mayor edad, en las que la probabilidad de regresión es menor.

Una conocida y clásica revisión de la literatura sobre la historia natural de CIN , concluía que las lesiones CIN I regresaban espontáneamente en el 60%, persistían en el 30%, progresaban a CIN 3 en el 10% y a cáncer invasor en el 1% (117).

Posteriormente se han realizado muchos estudios, observando que el riesgo de desarrollar una lesión de mayor grado, CIN 2-3 o cáncer a partir de lesiones de CIN1 sin tratamiento y confirmadas por biopsia es aproximadamente del 9 al 16% (240).

También es conocida la tasa de falsos positivos de H-SIL en diagnósticos citológicos que es entre el 8% y el 12%, que contribuye al número de pacientes con un resultado anatomopatológico final de CIN 1 o inferior (241), éste es un factor que no se puede evitar, pero se debe tener en cuenta al practicar una escisión para resolver cuando hay discrepancias entre el diagnóstico citológico y la biopsia cervical.

Un último meta-análisis que recoge los ensayos controlados randomizados en el seguimiento de las lesiones L-SIL, (242), en que discrimina entre repetir citología o practicar una colposcopia, a pesar de las limitaciones revela que la pauta general es referir a las mujeres con estas anomalías citológicas a la práctica de una colposcopia inmediata. Una excepción sería el seguimiento de las mujeres con diagnóstico citológico de ASCUS en los países en que el test de ADN viral está disponible y es accesible económicamente, el cual se conoce que es más sensitivo, específico y más coste-efectivo en el cribado, que volver a repetir la citología, pero en los casos de L-SIL no se ha podido probar (150, 161), aunque podría ser posible únicamente y probablemente en mujeres mayores. Por lo tanto sí que existe una necesidad de investigar si la introducción de nuevos marcadores, o modelos matemáticos con la combinación de los que ya existen o la introducción de otros nuevos, incluso con sistemas de puntuación más eficientes, podrían potencialmente mejorar la exactitud diagnóstica en cuanto a sensibilidad y especificidad. Pero hasta que no se desarrollen estos nuevos marcadores, hasta el momento actual la mejor opción de seguimiento ha sido y es la práctica de una colposcopia y si ésta es negativa la conducta terapéutica sería conservadora, se practicaría biopsia cervical en el caso de que las anomalías cervicales leves persistieran después de dos años de seguimiento. La finalidad es identificar los casos con posibles lesiones de alto grado subyacentes, para que no pasen desapercibidas y a su vez minimizar los riesgos de aplicar sobretratamientos innecesarios.

Es por este motivo que nos decidimos a iniciar este estudio prospectivo de observación y seguimiento de las pacientes con diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de bajo grado, L-SIL, dado que no existe un test viral con evidencia probada que nos determine o que pueda predecir aquellas lesiones que progresarían, de esta forma poder unificar los criterios de seguimiento de estas pacientes.

6.1 DIFICULTADES Y PROCESOS DIAGNOSTICOS

6.1.1 Selección de las pacientes

Se presentaron una serie de dificultades en el momento del inicio de este trabajo, especialmente en el proceso de selección de las pacientes.

Se trata de un estudio prospectivo en el que se seleccionaron todos los casos diagnosticados por citología líquida de lesión intraepitelial del total de 16.022 citologías cérvico-vaginales realizadas en Hospital Universitario del Mar durante el periodo de tiempo comprendido entre el 15 de diciembre del 2004 hasta el 15 de octubre del 2005.

Entre este número total de citologías, 277 casos (1,73 %) son diagnosticados de lesión intraepitelial de bajo grado. Si miramos la bibliografía, refleja aproximadamente una tasa global de alteraciones de bajo grado, incluyendo ASCUS y L-SIL de aproximadamente un 4% del total de citologías cervicales practicadas en revisiones periódicas. Se acepta que una buena tasa de ASCUS en un laboratorio de citología con controles de calidad, es un máximo de 2,4%, con lo que la tasa de L-SIL debería situarse alrededor del 1,5%

A partir de este primer diagnóstico en citología líquida, se inició un estudio prospectivo, en el que la idea era realizar un seguimiento de estas pacientes y de esta forma conocer su evolución.

Independientemente a partir de la primera citología líquida, se realizó técnica PCR en todas ellas. Primero se excluyeron todos los casos con VPH negativo (19,4%). Estos datos coinciden con los publicados, en que se detecta VPH positivo en el 80% de los L-SIL. Este es un dato extraído del estudio ALTS, realizado mediante sondas para virus de alto riesgo y con técnica de captura de híbridos. Se conoce en la actualidad que esta técnica, utilizando sondas para virus de alto riesgo, tiene un tanto por ciento de falsos positivos (reacciones cruzadas), que oscila entre un 6 y un 15% (164, 165).

También se eliminaron todas las que el VPH era de bajo riesgo oncogénico junto al VPH de riesgo alto potencial. Se consideró en que no formaran parte del estudio, ya que se conoce que la mayoría de lesiones de bajo grado que regresan son las secundarias a estos grupos de VPH. Además si el objetivo es cuantificar el ARNm de las oncoproteínas E6-E7 y detectar la sobreexpresión de p16^{INK4a}, si sólo los virus de alto riesgo liberan oncoproteínas, será en estos en los que podremos interpretar los resultados de estos marcadores.

Estas pacientes excluidas, son un 22,02 % respecto al total de pacientes con L-SIL y un 27,35 % respecto a las pacientes L-SIL VPH positivas.

Las pacientes positivas a VPH de alto riesgo oncogénico, son 58,48% respecto al total de pacientes con L-SIL y un 72,64% de todas las pacientes L-SIL VPH positivas.

En el inicio del estudio se establecieron unos estrictos criterios de selección, que contribuyeron a que la muestra se redujera y a obtener una población que podríamos considerar no real, ya que la población habitual que nos encontraremos en el día a día, es decir en la práctica clínica habitual, son pacientes en las que no se habrán aplicado estos criterios y por lo tanto quedaría en duda si los resultados obtenidos son extrapolables a una población normal con sus antecedentes de lesiones cervicales y su historia clínica previa. Este sería un tema que no se puede llegar a conocer, pero sí que está claro que si se han escogido estos casos es para no tener interferencias de lesiones ya preexistentes que podrían alterar los resultados.

Se excluyeron 9 pacientes (3,24%) por antecedentes de lesión intraepitelial o alteraciones nucleares sugestivas de infección por VPH en los dos años previos, también 12 pacientes (4,33 %) con biopsia cervical o cirugía cervical previa en los dos últimos años, debido a que se supone que estas pacientes presentan un riesgo de recidiva o de enfermedad residual (243).

Otros criterios de exclusión fueron 7 pacientes menores de 22 años (2,52%) en las que existe una mayor probabilidad de que la lesión se resuelva espontáneamente (Holowaty 1999). Una lesión de bajo grado (LSIL, CIN 1) regresa sobretodo en mujeres jóvenes y adolescentes, ya se ha comentado que, a los doce meses han regresado el 61 % (IC 95%: 53-70) y a los 36 meses el 91 % (IC 95%: 84-99) (116). En los diferentes estudios publicados de mujeres de mayor edad, la probabilidad de regresión de la lesión es menor. Además, según las guías clínicas de la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), cuando la paciente es menor de 21 años y entraría en duda en las menores de 25 años, no es necesario aplicar ningún test de tipificación o cualquier prueba de detección viral, por lo que el seguimiento debe ser únicamente citológico (ASCCP).

También se excluyen aquellas con inmunidad alterada: 6 casos con antecedentes de trasplante renal (2,16 %) y en tratamiento con inmunosupresores y 17 casos de infección por VIH (6,13%). Se observa una alta frecuencia de la infección por VPH en pacientes inmunodeprimidas post-trasplantes y en infectadas por VIH. Se considera que las pacientes inmunodeprimidas tienen un riesgo relativo 17 veces mayor de infección por VPH y nueve veces mayor para desarrollar cáncer cervical, así como aumento de la neoplasia intraepitelial anal y cáncer de ano (60). En ellas se ha comprobado a nivel cervical la disminución de los linfocitos CD4 y la inversión del cociente CD4/CD8, así como la disminución de los linfocitos natural killer. Esta alteración de la inmunidad local facilitaría la integración del ADN viral del VPH, con la

consecuente progresión. Además, sí que se ha demostrado en pacientes VIH positivas, un aumento en la prevalencia y persistencia del VPH y una disminución en el aclaramiento del mismo en función del número de CD4+ células T y de la carga viral del VIH, y se ha observado en todos los tipos de VPH, pero no así para el VPH 16 que es el más persistente y más altamente oncogénico. Los individuos infectados por VIH generalmente se infectan por más de un serotipo del VPH que los individuos sanos, por lo tanto habrá diferencias en el tipo de VPH y en el éxito de la respuesta inmune (62). En cuanto a la relación entre el tratamiento antirretroviral y el riesgo de progresión a carcinoma, probablemente es confusa porque las mujeres infectadas por el VIH bajo tratamiento antirretroviral viven más años y permiten al cérvix una más larga exposición al VPH carcinogénico en el contexto de una relativa inmunosupresión. En definitiva, las mujeres infectadas por el VIH, contraen más fácilmente la infección por los diferentes tipos VPH altamente oncogénicos y tienen un riesgo aumentado de lesiones intraepiteliales y cáncer, especialmente aquellas pacientes que no responden al tratamiento antirretroviral (63, 244). Una serie que examina la prevalencia de cáncer anal, neoplasia anal intraepitelial e infección anal por VPH en pacientes después de un trasplante, observan un riesgo relativo de 10 de desarrollar un cáncer anal, indicando que la inmunosupresión asociada al trasplante es un factor de riesgo significativo (64).

6.1.2 Seguimiento de las pacientes.

Durante el proceso de seguimiento de las pacientes, las exclusiones fueron las siguientes:

Entre estas 277 pacientes con L-SIL hubo 4 casos (1,44 %) con una progresión inmediata a lesión intraepitelial de alto grado H-SIL, y un caso (0,36 %) en la citología siguiente fue un Ca microinvasivo, por lo que se excluyeron del estudio, se debe tener en cuenta que éstos casos serían los que si no se controlan, pensando que una lesión de bajo grado es leve y no tiene más repercusión, hubieran pasado desapercibidos por haber sido indetectables en la primera citología.

De manera paralela y sin conocer la evolución, se parte de la base inicial de un primer diagnóstico de citología líquida, estas muestras se congelaban, y posteriormente se realizaba el seguimiento de las pacientes. Y a medida que avanzaba el estudio se iban excluyendo más pacientes, como por ejemplo si la siguiente citología de los 6 meses o a la de los 12 meses se practicaba biopsia cervical, por el motivo que fuese, bien por cambios en la colposcopia o por cambios en la citología hacia una lesión de mayor grado, que ocurrió en 5 casos (1,80%). Aunque persista la lesión de bajo grado, el motivo de excluirla es que con la biopsia podemos eliminar la lesión y/o enmascarar

los resultados. Otro criterio de exclusión era si había una negatividad inmediata o un ASCUS persistente que ocurrió en 18 casos (6,49%).

También se excluyeron las 4 gestantes (1,44%), bien en el momento inicial o que durante el seguimiento se quedaron embarazadas. Y todas las que no acudieron a los controles o pérdida de seguimiento, que ocurrió en 23 casos (8,3%).

El **seguimiento** fue el siguiente:

- Se repite la citología a los 6 y a los 12 meses. Si las citologías son negativas se considera como una regresión espontánea y las pacientes se derivan a protocolo de mujeres sin patología.

- Junto a la primera citología de seguimiento, se realiza una valoración colposcópica. Si ésta es positiva se hará biopsia y se adecuará el tratamiento quirúrgico médico según el resultado, pero ya he comentado que en estos casos al ser un cambio a mayor grado observable por colposcopia y al realizar biopsia en este primer seguimiento, estos casos quedarían excluidos de la serie a estudiar. En caso de tener una colposcopia negativa, se continuarán realizando citologías y no se considerará resolución o curación hasta que no se tengan dos citologías cervicales seguidas negativas.

- Si la lesión cervical de bajo grado persiste en el seguimiento más de dos años, es cuando se practicará biopsia o también en caso de progresión de la lesión.

Las ocasiones especiales en que podría ser adecuado practicar escisión del tejido cervical, sería en el caso de ansiedad de la paciente o bien en mujeres con riesgo de pérdida de seguimiento, pero estas dos opciones no han ocurrido con las pacientes seleccionadas en este estudio. Otro criterio en el que se podría también proponer escisión sería en el caso de colposcopias insatisfactorias pero con re-comprobación citológica previa y biopsia cervical. Sí que está indicado el tratamiento escisional en caso de en casos de colposcopia insatisfactoria, legrado endocervical positivo, infección por VPH de alto riesgo durante más de dos años con persistencia de LSIL, lesión amplia, o en las mujeres mayores de 40 años siempre que exista infección por VPH-AR.

Pérdida de seguimiento.

Ha existido la pérdida de control o seguimiento en 23 pacientes, uno de los motivos es debido a una población muy heterogénea de diversas poblaciones y procedencia, sin domicilio fijo con mínimas posibilidades de localización, además algunas se visitaban en consultas externas y no todas acudieron a los controles.

En estos casos, de falta de asistencia a las visitas, se llamaba al número de teléfono, obtenido de los datos de filiación y la mayoría de veces habían cambiado de domicilio, o no se podía contactar con ellas a pesar de dejar un mensaje en el contestador.

Las pacientes visitadas en consultas externas sólo eran derivadas al hospital cuando la lesión cervical de bajo grado persistía durante más de dos años, caso en el que se practicaría biopsia, o cuando existía una progresión de la lesión.

6.1.3 Citología líquida

Las muestras citológicas son procesadas en citología líquida. Para evitar alteraciones inter-observacionales, todas las muestras son revisadas por dos citólogos

Con esta técnica, la muestra citológica que se obtiene de la zona de transformación del cérvix, es la misma que la que se obtiene para un estudio de citología convencional (CC, Papanicolau), sin embargo tiene la ventaja que la muestra líquida, al ser procesada mediante centrifugación y filtro, se eliminan la sangre, moco cervical, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y otros artefactos de la suspensión, obteniendo las células en una sola capa con la morfología celular preservada y ausencia de aire, sangre, crecimiento celular y células deterioradas o de difícil interpretación (128). Son múltiples los estudios y meta-análisis publicados comparando ambas citologías, que ya se han comentado y comparado en el apartado de introducción, la mayoría de autores demuestran en la citología líquida un valor predictivo positivo, sensibilidad y especificidad mayor que con la citología convencional (128, 134, 135) aunque otros defienden similares valores predictivos positivos para lesiones malignas con ambas técnicas (136). Y también se encuentran estudios que obtienen peores resultados con TPPT que con CC, y concluyen que el TPPT es menos válido y más susceptible de obtener falsos positivos y falsos negativos que la CC (137, 245).

Una ventaja importante de la citología líquida es la posibilidad de efectuar distintas pruebas añadidas o técnicas complementarias al diagnóstico citológico, ya que se pueden obtener más de un porta del mismo vial entre ellas Captura de Híbridos, Hibridación in situ mediante inmunocitoquímica, análisis de ADN, citogenética, PCR, P16^{INK4a}, ARNm E6 E7, u otras (140), aprovechando la misma muestra de la paciente y así no tendría que repetirse la prueba con las molestias que supone, junto a la pérdida de tiempo, acumulación de visitas, gasto adicional por lo que ayudaría a reducir la presión asistencial en los consultorios de patología cervical y a disminuir la ansiedad de las pacientes. Las células se conservan bien preservadas en el vial, durante 4-6 semanas en medio ambiente, y al menos 1 año en frigorífico y mínimo 5 años si las muestras son congeladas a -70°C-80°C, pudiéndose descongelar para

poder aplicar las técnicas o pruebas complementarias que se crean convenientes (141).

6.1.4 .Posibles variaciones en la realización de la colposcopia

Se realiza una colposcopia en el primer seguimiento, que tiene lugar a los seis meses. Debido que las pacientes siguen sus controles habituales en su mismo consultorio, sea en el hospital o bien el control ambulatorio en consultas externas, esta prueba diagnóstica es practicada por diferentes profesionales. En principio no tiene porque suponer ningún sesgo, porque la interpretación de las imágenes es evidente y no presta a confusión entre colposcopistas experimentados como es en este caso.

Cuando se considera si la colposcopia se utilizaría como screening primario junto a la colposcopia, en la mayoría de estudios no se acepta ya que se supone que la mayoría de falsos negativos por citología serían detectados con la repetición de la citología, dentro de un programa de cribado bien organizado, debido al largo periodo de historia natural de carcinogénesis cervical de aproximadamente 10 años (246), incluso en los casos de un intervalo de 3 años hasta la siguiente citología. Las desventajas de usarla como screening primario serían el tiempo que requiere, su coste, el proceso previo de un buen aprendizaje y el crear innecesaria morbilidad psicológica en la mujer ante determinados casos.

En cuanto a la efectividad o exactitud de la colposcopia, en un amplio estudio de 84.244 mujeres, concluían que su uso sí que anticipaba la severidad de la lesión. Sin embargo en los casos de impresión diagnóstica de HSIL o cáncer, la correlación histológica fue en 85% de los casos, mientras que el resto 15% la histología revelaba una lesión benigna o de bajo grado (247). Entre los casos catalogados colposcópicamente benignos se detectaban histológicamente un 9% de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y un 3% de casos de cáncer invasivo.

Está claro que la colposcopia es una excelente arma diagnóstica en las pacientes con diagnóstico citológico de lesión de bajo grado, y es conocido su rol en estimar el área lesional, su localización y extensión susceptible para la práctica de biopsia dirigida, mejorando así la exactitud de la histología y poder planificar un tratamiento adecuado y efectivo. Debido a que el test de ADN viral tiene su papel en el cribado de las mujeres con ASCUS, pero no en las L-SIL, la puesta en marcha de la combinación de citología, colposcopia y los marcadores moleculares propuestos y aplicados en este estudio podrían ser incorporados en las existentes guías clínicas como posibles cambios futuros de los algoritmos de seguimiento (247).

6.1.5 PCR Viral-ADN VPH

Se determina el ADN viral en todas las muestras. Esta detección ha sido definitiva para aplicar los criterios de inclusión y exclusión, en que las pacientes con ADN viral negativo, las de “bajo riesgo” y las de resultado “no concluyente” han sido excluidas. Un dato a comentar es que los genotipos 53, 66, están considerados como de potencial alto riesgo (alto riesgo-evidencia probable) (36), y sin embargo al mirar la ficha técnica de Clart^R HPV2, que ha sido la técnica utilizada, consideran estos dos genotipos dentro del grupo de alto riesgo, por lo que han sido incluidos en el inicio del estudio.

En cuanto a las coinfecciones, hemos encontrado casos con coinfecciones y se ha considerado predominante si existe un genotipo de alto riesgo oncogénico. Algunos estudios han sugerido que en caso de coinfección de un VPH tipo 6 (bajo riesgo) y un VPH tipo 16, presentan un riesgo significativamente menor de desarrollar carcinoma que una infección por únicamente el VPH tipo 16, aunque se necesitan más estudios para demostrar los posibles mecanismos de este antagonismo (68). En cambio otros autores no han encontrado relación en el caso de coinfección con otros tipos virales (69).

Por lo tanto mediante el ADN del VPH, se identifican los pacientes de riesgo elevado en un periodo inicial de la infección, pero debido a que la mayoría de las mismas se resuelven espontáneamente y que sólo una pequeña cantidad de mujeres infectadas desarrollarán lesiones clínicamente relevantes, un único test positivo al VPH no justifica ningún planteamiento terapéutico, pero sí que identificará un mayor riesgo a medida que la infección es persistente durante un largo periodo de tiempo. Por otro lado, el hecho de conocer que existe una positividad al virus, puede llegar a crear situaciones inusuales por parte de la paciente y solicitar visitas seriadas más próximas en el tiempo, por intranquilidad y falta de información, por lo que aun se complicaría más el tema, sobretodo en aquellas pacientes en que la lesión se resolvería espontáneamente y el aclaramiento del virus sería más o menos inmediato.

También, respecto a la detección del VPH, la mayoría de tests o pruebas comercialmente disponibles, que sirven para identificar los pacientes con riesgo de presentar una infección inicial, se basan en la presencia o ausencia del gen estructural L1, entre un pool de VPH de alto riesgo. Existe una dificultad, cuando el virus se integra en el genoma humano y empieza a desarrollar su potencial oncogénico, se hace indetectable por dicha técnica, ya que se pierde la región L1 y los test ADN definirían incorrectamente la muestra como negativa. Otra de las dificultades técnicas para la valoración de la integración viral, consiste en evaluar la desaparición por escisión, del ORF viral E2. Este gen es el responsable de actuar sobre los promotores

p97 y p105 que mantienen reprimida la expresión de E6 y E7. Al perderse E2, por integración en el genoma celular, no se ejerce el efecto represor con la consiguiente sobreexpresión de oncoproteínas. En concreto la PCR, como método que valora la presencia de E2, es una técnica exclusivamente cualitativa, que requiere la desaparición completa de E2 en todas las células, ya que de forma contraria la coexistencia de virus episomales, con regiones E2 intactas, enmascararía a las formas integradas por amplificación de las mismas (248).

-Integración del virus-forma episomal.

Pero existe un debate de la necesidad o no de la integración viral para la inmortalización de las células infectadas. Éste es un punto de controversia ya que si bien se ha demostrado que ciertas líneas celulares derivadas de tumores establecidos presentan integración completa del genoma vírico en el huésped, no quiere decir que sea necesario que ocurra este hecho para la aparición del fenotipo tumoral, sino que podrían ser otras las características asociadas que considerarían como clonales a estas líneas celulares. Si que se ha demostrado, junto a los supuestos anteriores, que existe un porcentaje de lesiones tumorales, en las que no se ha encontrado integración, o bien que coexisten las formas episomal e integrada. Todos estos procesos de transformación, están relacionados con un bloqueo efectivo de las proteínas del ciclo celular, que puede ser secundario o bien a una elevada cantidad de virus que expresen cantidades basales de oncoproteína o bien de una pequeña proporción de ellos que expresen altas tasas de las mismas, que tanto pueden ser independientes del proceso de integración o secundarias al mismo. Es decir, la integración viral producirá un estado persistente de expresión de oncoproteínas, pero este mismo estado puede ser secundario a la conjunción de otros factores ajenos a la integración, por lo que la integración sería una causa suficiente, aunque no necesaria, para atribuir a las células características de transformación. El estado de integración se determina mediante el análisis entre la proporción de E6 o E7 con el gen susceptible de pérdida E2. En el virus no fragmentado, por cada copia del gen E6-7 debe existir una copia de E2. Si hay variaciones en este equilibrio, nos informa del estado del virus: Episomal si $E6-7=E2$; Integración total si $E2=0$ y coexistencia de formas episomales e integradas si $E6-7>E2$.

Por este motivo, la cuantificación de las oncoproteínas, nos proporcionaría una información del proceso de transformación y oncogénesis, independientemente del estado de integración del virus.

6.1.6 Cuantificación de las oncoproteínas E6-E7

Todas las muestras citológicas, se habían conservado a temperatura ambiente durante 2 meses, posteriormente se centrifugaron y se congeló el pellet a - 80°C. Para realizar el estudio de ARNm de E6 y E7, las muestras fueron enviadas al laboratorio central de Stanford, (Invirion diagnostics), California. Una vez recibidas, fueron descongeladas y resuspendidas en 30 ml. de Preserv-Cyt, donde fueron procesadas.

Se ha trabajado con muestras congeladas, al ser un estudio prospectivo en que se iban eliminando pacientes al no cumplir los criterios de inclusión, más todas de las que se perdió el seguimiento, sólo se procesaron el total de aquellas muestras de las pacientes que estaban incluidas en el estudio y que correspondían a su primer diagnóstico de citología líquida. No se conoció la evolución de las pacientes, ni el resultado final de la cuantificación de las oncoproteínas hasta el final del periodo de seguimiento.

Ya se ha comentado que, los eventos patogénicos más importantes que provocan la transformación del epitelio cervical se inician a través de la desregulación y expresión aberrante de los oncogenes virales E6 y E7 en la replicación de las células basales y parabasales del epitelio.

Durante un ciclo de vida normal de un virus, estos genes se expresan únicamente en las células totalmente diferenciadas en las capas de células más superficiales del epitelio cervical, que son irreversiblemente detenidas en el ciclo celular, donde es improbable que los oncogenes virales dañen estas células. Sin embargo, si estos genes se expresan a un elevado nivel en las células no totalmente diferenciadas, puede alterar la regulación normal del ciclo celular y la mitosis, induciendo a una inestabilidad cromosómica que posteriormente resultará en una transformación neoplásica de las respectivas células clonales. Una peculiaridad de las lesiones CIN 2/3 (comparadas con las lesiones CIN 1 y con el cérvix normal), es la desregulación de la expresión E7, que puede ser detectada a lo largo de todo el grosor del epitelio (249).

La detección de estos cambios celulares que aparecen junto a la desregulación de la expresión de los oncogenes virales en las células basales y parabasales, aportan una información diagnóstica muy importante, indicando las poblaciones celulares que han alcanzado el nivel siguiente a la simple infección viral, por lo que ahora ya no tendría posibilidad de regresión o aclaramiento viral. Esta información sería mucho más amplia que la de conocer el ADN viral.

Esta prueba se basa en la identificación de las proteínas celulares que se sobreexpresan en las células infectadas por VPH en respuesta a los oncogenes virales E6, E7. Cuantifica la cantidad ARNm de E6-E7, que se encuentra en la célula y el

porcentaje de células en las que se sobreexpresan. (HPV Oncotect^R. Invirion diagnostics) (197).

6.1.7 P16 INK4a inmunohistoquímica

En las mismas muestras citológicas de las pacientes seleccionadas, se ha determinado la positividad de p16^{INK4a}, mediante tinción inmunocitoquímica. El prototipo de este marcador es el p16^{INK4a} (Cintec^R).

A nivel de histología, también hemos estudiado el p16^{INK4a} en las biopsias cervicales realizadas y en las conizaciones practicadas.

El p16^{INK4A}, (Cintec^R) es un producto génico celular, que podría ser activado, bien directa o indirectamente, por un patrón de expresión desregulado de oncogenes virales a nivel del compartimento de las células basales y parabasales del epitelio. La ventaja es que con sólo uno o pocos anticuerpos directos contra las respectivas proteínas celulares, puede proporcionar información con independencia de la actividad subyacente de los VPH de alto riesgo específicos mediadores de la enfermedad. La p16^{INK4a} es una proteína tiene una función reguladora del ciclo celular, en concreto es un regulador de pRb. La proteína E7 es capaz de interferir con pRb y la E6 con p53, la ubiquitina las marca rápidamente y, por consiguiente anula su función y se consigue una célula que cicle constantemente (ausencia de actividad de pRb) y que no investigue su ADN con el objeto de buscar mutaciones y repararlas (ausencia de actividad de p53). Cuando en la célula existe mucha cantidad de pRb, p16^{INK4a} desaparece, y a la inversa, cuando no existe pRb, p16^{INK4a} aumenta en cantidad. Consecuentemente, si pRb es prácticamente anulado por E7, la cantidad de p16^{INK4a} aumentará. Por lo tanto, la detección de p16^{INK4a} tanto en células como en tejido, podría relacionarse con una alteración de la maduración epitelial de grado variable e infección de VPH de alto riesgo, que confiere una información muy precisa al identificar las células que exponen el perfil de la expresión de los genes de los oncogenes de los VPH-AR (250).

La sobreexpresión de p16^{INK4a} es fácilmente detectable en muestras citológicas e histológicas por tinción inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, al ser un buen marcador de transformación neoplásica, mejora la especificidad diagnóstica y soluciona los problemas existentes de variabilidad inter e intra-observador.

6.1.8. Otros marcadores

Existen diferentes categorías y tipos de marcadores, las ventajas de un determinado tipo de marcador respecto a otros y sus implicaciones clínicas, son objeto de debate y están bajo estudio de manera intensa y continuada.

El objetivos principales de estos marcadores moleculares son:

- 1) Identificar las mujeres con lesiones CIN 2 + actuales.
- 2) Identificar las infecciones transitorias.
- 3) Identificar las mujeres sin lesiones actuales CIN2+, pero con mayor riesgo de desarrollar cáncer en los próximos tres años.

Existen diferentes marcadores en vías de determinar e identificar cuáles serían los más apropiados, pero que no son objeto de este estudio actual, y entre ellos son:

- Detección de la actividad de los genes virales oncogénicos, mediante la detección de los genes E6 y E7, por ejemplo mediante la detección de E6-E7 ARNm de los VPH 16,18,31,33,45 con Nuclisens EasyQ^R, (tecnología Pretect, HPV- Proofer^R) (196). O de los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 con Aptima HPV^R (195).

- Alteraciones del patrón de metilación de diversos genes celulares que podría predecir eficientemente el inicio de una transformación neoplásica (iniciación).

- Cambios de los cromosomas o de los genomas virales (inteligencia artificial, IA), métodos en distinguir las regiones genómicas o los cambios de la integridad estructural de los genomas virales (integración).

- Marcadores que reflejarían las consecuencias de una inestabilidad cromosómica y por lo tanto servirían como marcadores de progresión (nivel más avanzado de riesgo) hacia carcinoma invasivo.

Otros marcadores incluyen: el HSP 70, survivin, E6 Strip test, varios marcadores de proliferación incluyendo los antígenos mcm, el ADN alfa polimerasa, C4.8/NET-1 entre otros.

Una cuestión a comentar es el hecho y la complejidad actual en cuanto a que la carga viral tiene un valor limitado para discriminar mujeres con y sin lesiones.

Como conclusión, estos marcadores de la actividad transformadora de los VPH representan una importante área de investigación, pero que todavía no está clarificado su valor clínico y su aplicación, por lo que aún necesitan y una aclaración una futura respuesta.

En las siguiente tabla, se muestran algunos de estos marcadores que aun requieren una evaluación y futuros ensayos clínicos.

	Descripción	Hipótesis de aplicación	Desventajas-limitaciones
Genotipificación	Evaluación del tipo en la muestra	Seguimiento de las VPH-AR positivas, su persistencia y diferenciar el riesgo de CIN2+	La realización y la reproducibilidad del test. Ausencia de métodos validados
Carga viral	Medida de la severidad de la infección y actividad de la replicación	Distinguir entre las infecciones de VPH-AR que son clínicamente relevantes	Dificultad en determinar un cut-off relevante clínicamente. La realización y la reproducibilidad del test. Ausencia de métodos validados. No tiene valor pronóstico.
P16INK4a	Evaluación de la sobreexpresión de la proteína p16 de cualquier tipo de VPH-AR	Aumenta el VPP del test de VPH-AR para el CIN 2+	Interpretación del patrón y la puntuación nuclear. Optimización del Cut-off. Baja especificidad.
Expresión ARNm E6-E7 (Pre-tect ^R)	Evalúa la expresión de los oncogenes virales E6/E7	Identifica las lesiones con mayor riesgo de progresión	Expresión Cualitativa <i>versus</i> cuantitativa
Cuantificación E6-E7 (Oncotech ^R)	Cuantifica E6/E7 ARNm, intracelular y el porcentaje de células en las que se sobreexpresan	Identifica las lesiones con mayor riesgo de progresión y cuantifica las proteínas	Interpretación y validación del test
Hipermetilación	Evalúa el patrón de metilación de los genes de VPH	Metilación del ADN del VPH podría ser un mecanismo de defensa del huésped para suprimir la transcripción del ADN extraño o una estrategia que el virus usa para mantener la infección largo plazo.	Estudios preliminares han confirmado la impresión de alta especificidad sin conseguir la sensibilidad requerida.
<i>hTERT</i> -gain	Marcador de enfermedad y no de infección	Podría ser útil como marcador pronóstico.	Alta complejidad y requiere experiencia en la interpretación
Otros marcadores de proliferación celular	Marcador de enfermedad y no de infección, podría incrementar la especificidad	Podría ser útil como marcador pronóstico.	Alta complejidad y requiere experiencia en la interpretación Reproducibilidad cuestionable

Tabla 37: La asociación entre la carga viral y la enfermedad cervical probablemente depende del tipo de VPH, del estado físico del virus y de la heterogeneidad de la lesión cervical (Carozzi, HPV today 2008), adaptado (251).

Además, a nivel práctico de aplicabilidad, actualmente no existen o no se han desarrollado guías clínicas de diagnóstico o incluso de seguimiento de pacientes para implantarlas dentro del programa de un screening primario, a nivel de la detección del VPH o de sus lesiones asociadas, y tampoco existen pautas, a nivel de control de la evolución de una lesión de bajo grado y menos aún si el objetivo es aplicar un procedimiento predicción de evolución ó de diagnóstico que sea a la vez útil y fiable.

Como ya sabemos, los resultados de las pruebas diagnósticas deben ser interpretados con cautela y requieren una cuidadosa evaluación a nivel de laboratorio (199). Por lo tanto, existe una clara y evidente, actual y futura, necesidad de establecer un control de calidad internacional, consistente y bien estandarizado que compare los diferentes métodos diagnósticos (252), para que tengan una validación clínica y se puedan aplicar en los programas rutinarios habituales, tanto a nivel de diagnóstico como de predicción de la evolución de una lesión.

En nuestro estudio, una vez aplicadas las pruebas diagnósticas, interpretadas y valoradas, se observa de manera prospectiva la evolución de estas pacientes y cuando finaliza el periodo de seguimiento, que es a los tres años, durante los cuales se han ido excluyendo pacientes, es cuando se analizan **los resultados** y las variables que han contribuido a la realización de este análisis y son los siguientes:

6.2 VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

Se ha intentado hacer una correlación estadística entre la **edad** de la paciente y el riesgo de progresión, pero no se ha llegado a ningún resultado significativo. Se debe tener en cuenta que en este estudio no se han incluido las pacientes menores de 22 años, por el mayor porcentaje de eliminación o curación de la lesión y por la alta prevalencia de infección por VPH y de alteraciones citológicas menores en este grupo de edad.

Se encuentra una paciente de 22 años, con un genotipo 18, que presentó una regresión espontánea, hecho que ya es habitual en esta franja de edad.

En un meta-análisis mundial de 157879 mujeres con citología normal, derivadas de 78 estudios publicados, estiman que el 10,4% de mujeres con citología normal son positivas para el ADN VPH cervical. Y la prevalencia es más elevada en los países no desarrollados (15,5%) que en los países desarrollados (10,0%) siendo en África donde la prevalencia es mayor (22,1%, 20,9-23,4) y fue más alta en las mujeres menores de 25 años (16,7%) y decreciendo posteriormente con la edad. También muestran un segundo pico de prevalencia de infección por VPH en mujeres mayores de 44 años, en

todos los continentes, excepto en Asia (253). Este segundo pico de prevalencia a una edad más avanzada puede ser debido a cambios en el sistema inmunitario que permite la expresión de infecciones latentes o bien a cambios en la conducta sexual .

El consumo de **tabaco** y la progresión de la lesión, no muestran diferencias significativas, así como no muestran diferencias significativas ni el número de cigarrillos consumidos, ni tampoco los años previos de exposición al mismo .

Estos datos no coinciden con la literatura, en la que la mayoría de estudios encuentran relación entre el tabaco y riesgo de progresión, especialmente si se suma más cantidad (48, 97) y más años de hábito tabáquico (35), en aproximadamente un aumento del riesgo de 2-4 veces frente a las no fumadoras (254). Hay algunos autores que no encuentran asociación (98) o bien no está clara. E incluso existen estudios tanto en hombres como en mujeres que no han encontrado una asociación entre tabaquismo y detección de VPH y que la posible explicación es que el tabaquismo aumenta la susceptibilidad a la infección, o bien que las asociaciones positivas quedaron atenuadas después de averiguar el comportamiento sexual. Otros estudios han reportado una asociación positiva significativa entre la condición de fumador actual y la infección incidente por el VPH, incluso después de controlar por diversas medidas el comportamiento sexual (99). Una posible explicación de este hallazgo es que el tabaquismo aumenta la susceptibilidad a la infección pero a su vez también puede ser una medida sucedánea de conductas sexuales no medidas.

Sin embargo, existe suficiente evidencia epidemiológica para relacionar el consumo de tabaco como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer de cérvix. (35) y el motivo es que las nitrosaminas y el alquitrán, carcinógenos del tabaco, están presentes en la secreción del moco cervical de las mujeres fumadoras (41, 91), por lo que el tabaco tiene efecto carcinogénico directo y produce una alteración de la inmunidad local del cuello del útero contribuyendo a cronificar la infección por VPH

Cuando se intenta relacionar la **anticoncepción hormonal** y el riesgo de progresión de la lesión, obtenemos una diferencia que no es estadísticamente significativa, ni tampoco en cuanto a los años previos de toma de anticonceptivos vía oral. Hay autores que confirman el consumo prolongado de contraceptivos hormonales durante cinco o más años que actúa como cofactor para cáncer cervical y aumenta el riesgo a medida que se suman años (111). Incluso hay una relación a largo plazo con el uso prolongado de anticonceptivos, y de un aumento de riesgo hasta cuatro veces sobretodo si el uso es superior a diez años ya que existe un cambio en la respuesta inmunitaria local. Se estima que el riesgo disminuiría después de ocho años de suspenderlos. Otro tema que se podría asociar es que el uso de anticonceptivos iría unido a un mayor número de compañeros sexuales y a un menor uso del profiláctico

(60). Sería cuestionable si es aconsejable dejar de tomar anticonceptivos en caso de infección por VPH, ya que hay autores que no encuentran asociación (93).

Tampoco encontramos diferencia estadísticamente significativa cuando se correlacionan el número de **partos** y el riesgo de progresión, si bien no se puede evidenciar una asociación, si que existen estudios casos-control que relacionan la alta paridad con CIN III y carcinoma de cérvix, en que asocian un riesgo incrementado de HSIL, con un riesgo 2,6 más alto en las multíparas de presentar cáncer que las nulíparas y se incrementa el riesgo con 7 o más partos. El motivo de esta asociación no está muy clara, pero podrían ser las modificaciones hormonales del embarazo que modulan localmente la respuesta inmune, los cambios cervicales por el traumatismo del parto o una mayor persistencia de la zona transformación exocervical. (108, 109, 110, 255).

No se encuentra relación tampoco en cuanto a la **edad de inicio de relaciones sexuales y el número de parejas sexuales**. Es evidente, que a mayor número de parejas sexuales, existiría mas riesgo de adquirir la infección por VPH, pero los diversos estudios demuestran que cuando se adquiere, la infección está causada por diferentes genotipos. En los casos de infección por múltiples genotipos, el riesgo se aumenta, pero no está claro si el riesgo es mayor que la suma de cada uno de los riesgos de forma individual (42).

Un último trabajo publicado (243), en el que utilizan la extirpación electroquirúrgica con asa para la resolución de discrepancias anatomopatológicas entre los resultados de la citología y de la biopsia y qué factores preoperatorios predicen la presencia de neoplasia cervical intraepitelial definitiva, en un intento de identificar posibles factores de riesgo que pudieran definir las pacientes que están expuestas al mayor riesgo de presentar CIN 2 ó 3, muestran que no había ninguna diferencia significativa en cuanto a antecedentes de tabaquismo, edad, número de partos, tipo de método anticonceptivo y edad de inicio de relaciones sexuales y consideran que aunque el tabaquismo se ha asociado con la CIN, no fue un factor significativo en dicho estudio .

Entre todos nuestros casos estudiados, no presentan antecedentes de **enfermedades de transmisión sexual**. Sólo un caso de hepatitis C en una paciente y no se sabe si de forma casual ó no, la lesión progresa hacia una lesión de alto grado.

También se conoce, que a mayor número de parejas sexuales, mayor es el riesgo de adquirir enfermedades de transmisión sexual. Los dos patógenos que se han asociado con efecto en la progresión a cáncer de cérvix son el Virus simple herpes-2 (VSH-2) y la Chlamydia trachomatis.

Se ha demostrado en estudios epidemiológicos, que mujeres VPH-ADN seropositivas tienen entre dos y nueve veces incrementado el riesgo de progresión si hay una seropositividad concurrente con el VSH-2 (100). Sin embargo, estudios in vitro (101), no detectan HVS-2 Bg/II N en las piezas de biopsia de carcinoma celular, cuya integración (fragmento Bg/II N subfragmento Xho2) en los queratinocitos inmortalizados por VPH 16 y 18 había demostrado previamente que inducía transformación neoplásica (102).

La infección por Chlamydia Trachomatis tiene una alta prevalencia. Es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en la adolescencia. La prevalencia más alta se observa en edades entre los 30 y 34 años, con un 7,9% que desciende al 1,5% en mujeres de más de 45 años. Es causa de cervicitis, uretritis y con frecuencia enfermedad inflamatoria pélvica. Son frecuentes las re-infecciones durante el primer año después del diagnóstico y tratamiento. Una infección antigua con Ig G anticuerpos en suero para Chlamydia Trachomatis junto a positividad para VPH, se asocia a un incremento entre dos y diecisiete veces de desarrollar un carcinoma de cuello de útero (103), sin embargo la adquisición de la infección después del desarrollo de un SIL bajo grado (LSIL) no parece que afecte a la progresión hacia un SIL alto grado (HSIL) o una carcinoma (104).

Aunque existen controversias, la evidencia es una asociación con la infección de Chlamydias, VHS-2 y VPH oncogénesis, generando radicales libres, así como una respuesta inflamatoria asociada y secundariamente inestabilidad genética.

Tampoco se han encontrado diferencias significativas, en cuanto a consumo de **drogas**, antecedentes de **interrupción legal de embarazo**, índice de masa corporal media (**IMC**), **raza**, **país de origen** y **post-menopausia**.

Tal y como es de suponer en el carcinoma de cérvix, a diferencia de otros, no existe relación entre el peso de la paciente y el riesgo de progresión. Se ha encontrado una posible asociación en un estudio caso-control comparando 273 pacientes con adenocarcinoma y carcinoma escamoso celular y 307 casos control en cuanto a índice masa corporal (IMC), altura y peso, encontrando una asociación positiva con adenocarcinoma pero no con carcinoma escamoso celular, (106) donde el elevado nivel hormonal endógeno inducido por la obesidad podría ser responsable de esta asociación (107).

Tampoco los factores socioeconómicos estudiados a nivel global, han podido ser evaluados adecuadamente para establecer una relación, ni tampoco la raza o el país de origen. En estudios epidemiológicos encuentran diferentes prevalencias de los distintos genotipos según los diferentes países, tanto en citologías normales, como en alteraciones (253, 256).

6.3 SEROTIPO VIRAL-CARGA VIRAL

Todas las pacientes seleccionadas, corresponden a VPH de alto riesgo, también se han incluido las de “ alto riesgo potencial “ y los consideramos como de alto riesgo, pero causalmente correspondían a 11 casos del genotipo 53 y 5 casos del serotipo 66, y la mayoría han quedado a su vez excluidas ya que no cumplían el resto de criterios de inclusión.

Entre las pacientes estudiadas, se ha intentado hacer una correlación estadística de los genotipos, pero debido a la amplia diversidad (14 serotipos) y a que la muestra es pequeña (56 pacientes), no se han podido obtener resultados concluyentes, con significancia estadística.

El genotipo más prevalente es el 16 que, es el más altamente oncogénico y el que tiene menos probabilidades de desaparición. Pero podemos ver que nuestros resultados son muy variados, pero sí que tiene explicación ya que los genotipos son numerosos y se comportan de forma muy diversa en función de cada paciente, de su inmunidad y de sus características locales.

También tenemos casos de infección por múltiples genotipos, en que el riesgo de progresión aumenta, pero no está claro si el riesgo es mayor o bien se considera la suma cada uno de los riesgos de forma individual (42). Ya hemos comentado que según otros autores consideran una infección múltiple como un determinante importante de persistencia (70).

Por ejemplo, los pacientes inmunodeprimidos, aunque no estén incluidos en este estudio, generalmente están infectados por más de un genotipo y la tasa de aclaramiento es más baja comparada con los individuos inmunocompetentes en cuanto a todos los genotipos, excepto para el VPH 16 en que no existen diferencias, ya que es el más persistente y carcinogénico.

Existe un meta-análisis que recoge 55 estudios publicados, que revisa la distribución de los genotipos a nivel mundial en las lesiones de bajo grado y comparado según la localización geográfica el cáncer cervical. Sus resultados informan que la detección de VPH en LSIL oscila entre el 80% (Norte América) y el 70 % en otras regiones y entre los 5.910 VPH positivos y los casos con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), la distribución fue la siguiente: (256) (tabla 38).

Tabla 38: distribución de genotipos mundial y L-SIL (Clifford 2005) (256)

Tipo VPH- L-SIL	Distribución mundial
VPH 16	26,3%
VPH 31	11,5%
VPH 51	10,6%
VPH 53	10,2%
VPH 56	9,5%

Otro estudio que revisa la distribución mundial de tipos de VPH en biopsias de cáncer cervical y en biopsias de neoplasias intraepiteliales de alto grado (CIN2+) , la distribución es la siguiente , para los cinco tipos más prevalentes (32):

Tabla 39: distribución de genotipos mundial y cáncer de cérvix (Cortés 2009) (70)

Tipo VPH- Ca. cérvix	Distribución mundial
VPH 16	55,2%
VPH 18	12,8%
VPH 45	4,6%
VPH 31	3,8%
VPH 33	3,7%

Tabla 40: distribución de genotipos mundial y CIN2+ (Cortés 2009) (70)

Tipo VPH- CIN 3	Distribución mundial
VPH 16	45,3%
VPH 31	8,6%
VPH 33	7,3%
VPH 18	6,9%
VPH 45	2,3%

6.4 ARNm DE LAS ONCOPROTEINAS E6/E7

En nuestros resultados se han apreciado diferencias estadísticamente significativas entre la positividad para la prueba de la sobreexpresión de las oncoproteínas E6/E7 y la evolución posterior de lesión hacia una progresión o lesión de alto grado.

Hemos excluido al inicio, todas las pacientes VPH negativas, bajo la suposición que las pacientes portadoras de virus de elevado riesgo oncogénico (VPH-AR), debido al comportamiento derivado de la historia natural del virus, tienen una probabilidad de progresión hacia lesión de alto grado, H-SIL, de aproximadamente el 10% (93). Estos genotipos de alto riesgo oncogénico, son capaces de integrarse en el ADN de la célula huésped e iniciar la transformación maligna, de modo más frecuente que los de bajo riesgo oncogénico. Ya se ha comentado que la vía de actuación es una sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, que interactuando con los supresores tumorales p53 pRb, respectivamente, activarían la división celular y disminuirían la apoptosis. La sobreexpresión de estas oncoproteínas es un marcador del inicio del comienzo de la transformación epitelial secundaria al genoma viral integrado, y este hecho ocurre con mayor probabilidad en los genotipos de alto riesgo. (257).

El motivo de excluir las pacientes con virus de bajo riesgo y a las pacientes negativas, se hizo con la suposición de que en estos casos encontraríamos con más frecuencia resultados negativos en Oncotech^R, que es concordante con el carácter transitorio de estas infecciones, en que suelen ser eliminadas por el sistema inmune sin que ocurra integración del genoma viral en el ADN de la célula huésped.

Quizás esta exclusión, ha contribuido a una dificultad en la correlación de los resultados, ya que encontramos estudios (198), en que independientemente del subgrupo de riesgo oncogénico, presentan resultados negativos en VPH-PCR, que sin embargo demuestran sobreexpresión de oncoproteínas virales en el Oncotech^R. Sus autores comentan que este fenómeno inicialmente antiintuitivo, encuentra su explicación en el mecanismo de integración del genoma viral dentro del ADN celular, debido a que este fenómeno conlleva interrupción, combinada con deleciones genómicas en los lugares de integración. Como las regiones involucradas en este proceso (E1 a L1) son las que se emplean como dianas para la PCR, es evidente que, en determinados casos, el virus es indetectable por dicha técnica, a partir del momento que se integra y comienza a desarrollar su potencial oncogénico (258).

Ahora que ya ha finalizado el estudio y ya se ha hecho el seguimiento de las pacientes, pensamos que quizás la población ha sido excesivamente seleccionada, y que si se hubiesen incluido todos los genotipos e incluso los negativos, quizás los

resultados hubiesen sido algo más favorables o si no, podrían haber sido más reales en cuanto a tasa de especificidad y sensibilidad.

En estos resultados observamos que la curva roc y la regresión logística dan p-valores distintos, pero ambos estadísticamente significativos. Es debido a que son test distintos para testar hipótesis distintas (aunque relacionadas) y con diferentes potencias. El test ji-cuadrado para construirlo a partir de la curva roc, trata de medir la dependencia estocástica entre el “dar positivo” y el “ser positivo”. El test de la razón de verosimilitud para determinar la significación de las variables en la regresión logística, trata de ver hasta que punto la función logit de “p” ($\ln(p/(1-p))$) puede expresarse como una función lineal de las variables independientes. En definitiva, lo importante es que ambos resultados van “en la misma dirección” y nos indican que el test de Oncotech es predictivo en la persistencia o en la progresión de la lesión. Además la regresión logística nos ofrece la cuantificación explícita del riesgo de persistencia, al estimar la probabilidad de persistencia para cada paciente.

A partir de estos análisis estadísticos, hemos obtenido una especificidad del Oncotech de un 64% para el punto de corte mayor o igual a 2, es sensiblemente más baja que la obtenida en otros trabajos, pero podemos señalar que no sólo para el Oncotech, si no en general para todas las pruebas, la especificidad siempre tiende a ser mejor en estudios de cribado primario, que en este tipo estudios como el nuestro, con un grupo de pacientes muy seleccionadas, con confirmación citológica de L-SIL, VPH positivo de alto riesgo, y sin antecedentes de alteraciones o cirugía relacionada con patología cervical en los últimos dos años.

La sensibilidad obtenida ha sido de un 76%, que es inferior a los resultados ya publicados, pero es preciso recordar de nuevo que la población es muy seleccionada y no es de cribado primario. El estudio de Narimatsu y Patterson, (197) de una muestra de 232 pacientes, de las que obtuvieron 30 citologías patológicas, concluyen con una sensibilidad de 83,3% y una especificidad del 91,4%.

Si se cambiase el punto de corte a 1, la sensibilidad de 96% y la especificidad de 48%. Debemos diferenciar los estudios de Oncotech y el resto de estudios que también detectan oncoproteínas, pero utilizan otros biomarcadores. El Oncotech cuantifica las oncoproteínas de todas las células y no las destruye, los otros reactivos que son el Aptima^R y Nuclisens^R se basan en otra tecnología y sólo detectan el ARN m de un porcentaje de ellos, en concreto los VPH 16, 18, 31, 33, 45 con Nuclisens EasyQ^R, (tecnología Pretect, HPV- Proofer) (196). O de los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 con Aptima HPV^R (195), en que los estudios publicados si que demuestran su utilidad clínica, incluso para su uso a nivel de screening, pero aún están en fase de demostrar su reproducibilidad.

Existen diferentes estudios que comparan detección de ARN m con detección de ADN o carga viral (195, 259, 260, 261, 262) , en concreto Molden et al (167) y confirman en un amplio ensayo clínico prospectivo de 4.136 mujeres, las ventajas de los test de ARNm en cuanto a referir menos mujeres con CIN a colposcopia, y que además las biopsias obtenidas por colposcopia pueden infradiagnosticar lesiones de alto grado. Aunque encuentran resultados similares con test de de ADN y con detección de ARNm en las lesiones de alto grado, en que comentan que existe una baja prevalencia de estas lesiones. Pero no ocurre así con las lesiones de bajo grado y con ASCUS, donde si no hay transformación neoplásica tampoco hay expresión de E6/E7, así se minimiza la angustia innecesaria de los resultados ADN positivos con bajo riesgo de progresar a H-SIL, consecuentemente consideran que la combinación de ARNm test (Prelect-HPV proofer^R) y la citología como screening primario obtendría un mejor sensibilidad y especificidad, ya que entre éstos sólo una pequeña proporción presentan detección de ARNm .

Otros estudios comparan la fijación de las células en diferentes tipos de citología líquida, con PreservCyt^R se conserva la integridad para poder realizar ambos test , pero no ocurre con Surepath^R (262, 263).

Carozzi (251) compara la tasa de positividad de ARNm Prelect^R,HPV-Preofer^R (Norchip AS, Klokkarstua, Hurum, Norway) a partir de citología y sus resultados de positividad de expresión de ARNm, concluye que la correlación con la histología son estadísticamente significativos y, el resto de resultados positivos fueron: 25% entre negativas, 38,1% entre ASCUS, 46,7% entre L-SIL y 70,4% entre H-SIL, y no encuentra lesiones CIN2+ con ARNm negativo en un seguimiento de 24 meses.

6.5 P16 INK4a EN CITOLOGÍA LIQUIDA

En este estudio citológico, y una vez determinada la positividad de p16, mediante tinción inmunocitoquímica, con el marcador p16^{INK4a}, (Cintec^R), el siguiente procedimiento ha sido aplicar el sistema de puntuación nuclear de Wentzensen , que ya es conocido, que puntúa entre 1 y 4. Esta clasificación contempla puntuación de 1 si la relación núcleo/citoplasma es > 50% y las separa de las demás categorías, que son excluyentes, tal y como se ha comentado en el apartado de material y métodos.

Proponemos un sistema nuevo de puntuación, que hemos llamado Wentzensen modificado, en que se considera puntuación 1, si la relación núcleo/ citoplasma es < al 50%, ya que partimos del conocimiento, de que las células L-SIL tienen una relación nucleo/citoplasma es < 50% e independiente de los otros criterios, que son hiper cromasia, anisonucleosis e irregularidad de la membrana nuclear.

En resumen, en esta segunda clasificación o puntuación, no se suma la característica de N/C > 50% ya que estos casos se clasifican directamente como un alto grado.

En nuestros resultados la clasificación WEN MOD muestra una predicción de lesión de alto grado estadísticamente significativa, pero menor que cuando se aplica el test Oncotech, con una sensibilidad de 42,9% y una especificidad de 84,6% y en cambio la clasificación WEN no es estadísticamente significativa, con una sensibilidad de 21,4% y una especificidad de 96,4% , esta variabilidad podría ser debida a que todas las lesiones eran de bajo grado y todas eran N/C < 50 %, entonces en la clasificación WEN, el score de N/C > 50% siempre es 0 ya que no hay ningún caso en nuestra serie, y en la puntuación WEN MOD, N/C < 50% puntúa como 1 y se supone que deberían corresponder a todas las pacientes con un diagnóstico citológico de L-SIL.

Las **dos clasificaciones de puntuación nuclear** son las siguientes:

<u>Wentzzen modificado (WEN MOD)</u>	<u>Puntuación</u>
0- negativos para p16.....	0
1.- células normales p16 +.....	1
a) células LSIL (relación núcleo/citoplasma < 50%).	
b) hiperromasia.	
c) anisonucleosis.	
d) irregularidad de membrana nuclear	

La interpretación de esta puntuación es :

- Uno de los 4 criterios (a, b, c, d) es un 2.
- Dos de los 4 criterios (a, b, c, d) es un 3.
- Tres de los 4 criterios (a, b, c, d) es un 4.

<u>Wentzzen (WEN)</u>	<u>Puntuación</u>
0.- negativos para P16	0
1.- células normales p16 +.....	1
2. Cualquiera de las siguientes características:	
a) células con relación núcleo/citoplasma > 50%.	
b) hiperromasia.	
c) anisonucleosis.	
d) irregularidad de membrana nuclear.	

La interpretación de esta puntuación es :

- Cualquiera a) ó b) ó c) ó d) es una puntuación de 2.
- Cualquiera b) ó c) ó d) + a) > 50% relación núcleo / citoplasma es una puntuación de 3.
- b) y/o c) y/o d), es decir más de un criterio de a) ó b) ó c) + a) 50% relación núcleo / citoplasma es una puntuación de 4.

En un estudio de Wentzsen (234), entre 108 muestras con citología normal, 52 muestras L-SIL y 19 muestras H-SIL, sí que encontraba correlación de 98% en las de alto grado que eran positivas para p16^{INK4a}, y en todas una puntuación anormal, pero entre las 52 citologías de bajo grado (L-SIL), 19 eran positivas para el p16^{INK4a}, pero al aplicar la puntuación nuclear era anormal sólo en 5.

Carozzi et al. (251), comparan dos grupos con L-SIL y evalúa la expresión inmunohistoquímica de p16^{INK4a} como marcador de progresión, y observa una sobreexpresión significativa de p16 en el grupo que progresa, cuando lo compara con el grupo que no progresa, y sugiere que puede ser de utilidad como marcador entre las mujeres VPH positivas si llega un momento que se usa el test de VPH como método de screening primario. Y en un estudio previo, dos años antes, también defiende un mayor valor predictivo positivo con una probable futura reducción del número de colposcopias (191).

Otros estudios practicados en muestras citológicas demuestran que p16^{INK4a} es un buen marcador de lesión intraepitelial, e incluso en ASCUS indica la posibilidad de lesión de alto grado. Meyer et al. (179) evalúan la expresión de p16^{INK4a} en citología líquida en LSIL y ASCUS y confirmado con histopatología en casos de alto grado, con una sensibilidad de 100% y encuentran mayor especificidad para la detección de CIN-2 comparado con HC2 (68% vs 19 % respectivamente). Similares resultados comparando p16^{INK4a} con HC2 (180) Wentzsen et al. (181), investigan la eficacia de p16^{INK4a} como bio-marcador en identificar muestras con CIN alto grado entre citologías convencionales con resultado de ASCUS o LSIL, y utiliza una evaluación cuantitativa contando las células p16 positivas y una evaluación cualitativa usando una puntuación según los cambios del núcleo de la célula, demostrando una buena correlación entre la p16^{INK4a} en muestras citológicas y la p16^{INK4a} en biopsia. Se ha estudiado en citología convencional tanto ASCUS y LSIL con seguimiento anatomopatológico, como en AGC-células glandulares atípicas (182).

También se ha demostrado su utilidad en citología líquida (183, 184, 185, 186, 187, 188, 189) y en biopsias, por lo que el p16^{INK4a} ayudaría a clarificar la aún confusa definición de lesión displásica de bajo grado y a distinguir las verdaderas lesiones displásicas con alto riesgo de progresión de aquellas que más bien podrían ser definidas con el término más general “efecto citopático inducido por VPH” (189, 190).

Nuestros resultados demuestran una mejor predicción utilizando el test Oncotech que mediante la tinción p16^{INK4a}, una explicación podría ser que con el ARN mensajero se mide el elemento productor de la lesión biológica y con el p16^{INK4a} se detecta el efecto biológico de la lesión producida.

También hemos intentado hacer un modelo de regresión logística binaria con las variables Oncotech y WEN, y otra segunda con las variables Oncotech y WEN MOD. El primer modelo, que combina Oncotech con WEN resulta prometedor, teniendo en cuenta los aciertos en la predicción, pero por el contrario la estimación de los parámetros es bastante imprecisa y requiere futuros estudios donde se amplíe la muestra y, tal vez se revise la escala de codificación. El segundo modelo, Oncotech y WEN MOD, tiene una significación ligeramente peor, si bien su comportamiento global predictivo es bueno. En resumen, a falta de un estudio con un tamaño de muestra mayor, es razonable el uso de Oncotech para cuantificar el riesgo de persistencia de las lesiones, tanto usando Oncotech como única variable independiente como combinado su uso con otras variables categóricas como WEN y WEN MOD.

Pero finalmente sólo se ha conservado la variable Oncotech ≥ 2 , como predictora de mantenimiento o progresión. Se supone que es debido a que la información de WEN modificado es muy similar a la de Oncotech, entonces es muy difícil encontrar resultados significativos cuando se comparan las dos variables

6.6 P 16^{INK4a} BIOPSIAS Y CONO

Los resultados del p16^{INK4a} en la histología si que correlacionan con la severidad de la lesión. Todas las lesiones que han finalizado en conización y con resultado anatómico-patológico de CIN2+, el p16^{INK4a} ha sido positivo y en todos los conos con resultado CIN1-displasia leve, el resultado de p16^{INK4a} ha sido negativo.

En un caso de conización displasia severa p16^{INK4a} positivo, la biopsia previa cervical era negativa por lo que no se practicó p16^{INK4a}. El resto de cuatro conos con displasia severa el p16^{INK4a} en las biopsias previas cervicales, la tinción p16^{INK4a} había sido positiva.

Todas las pacientes con lesión de alto grado (100%), presentan tinción p16^{INK4a} de manera intensa, por lo que se considera un adecuado y útil predictor de la presencia de una displasia moderada-severa o de alto grado y además debido a su conocido mecanismo biológico es también predictor de la presencia de una infección por VPH de alto riesgo.

Los análisis practicados en las biopsias, demuestran la utilidad de p16^{INK4a} para marcar displasias, tanto del cuello de útero como alteraciones de la maduración

epitelial relacionadas con infección por VPH en epitelios escamosos fuera del cuello de útero (192, 264, 265).

Si revisamos a lo largo de la historia, tal y como hemos ido comentando, se encuentran múltiples estudios de prevalencia mundiales, en diferentes tipos de población y con un amplio rango de positividad. Se han elaborado numerosos estudios epidemiológicos heterogéneos, que demuestran marcadas diferencias en la prevalencia del VPH en las diferentes poblaciones respecto a edad, frecuencia de anomalías en la citología, diversidad de genotipos de VPH y distribución geográfica. También se han utilizado múltiples muestras y técnicas de detección del ADN del VPH, con diferente sensibilidad y especificidad, indicando un posible impacto significativo en las tasas de detección.

La infección por el VPH produce una respuesta humoral inmune contra la proteína mayor de la cápside, creando unos anticuerpos que permanecen detectables durante varios años, pero la serología no sirve para discriminar infecciones pasadas y presentes. En los diferentes ensayos clínicos, se estima que aproximadamente el 70% de niñas y jóvenes sexualmente activas menores de 26 años y con una media de dos parejas sexuales, eran positivas para el ADN del VPH y en cambio serológicamente negativas para los genotipos 16 y 18. Este hecho es debido a que aproximadamente la mitad de los todos los individuos expuestos previamente a infecciones genitales por el VPH nunca desarrollan anticuerpos, por lo que se supone que incluso este 70% es obviamente una estimación muy por debajo de la actual exposición acumulativa al VPH en este grupo de población.

Hasta el momento, el único diagnóstico fiable de infección por el VPH es la detección del ADN viral

Un tema importante radica en que los mecanismos que desarrollan el fenotipo maligno están interrelacionados, y estas interacciones moleculares están mediadas por proteínas. El estudio de estos marcadores moleculares, utilizando varias y diferentes de técnicas de investigación, nos ayuda a examinar estos complejos mecanismos moleculares (249). Estos biomarcadores moleculares son indicadores cuantificables de los efectos de la exposición y de la susceptibilidad del estado de la enfermedad, y se utilizan para entender y conocer los mecanismos de progresión del cáncer.

Desde hace unos años existe una gran necesidad en validar estos nuevos marcadores para la detección del cáncer cervical, y es lo que se ha ido haciendo y se está consiguiendo.

Ya se ha comentado que además existen una serie de limitaciones técnicas a nivel de la primera interpretación morfológica de las muestras celulares del cuello del útero,

tanto por la naturaleza subjetiva de la citología, la marcada variabilidad dependiendo del medio en el que se realiza, desde la toma de la muestra hasta su procesamiento y lectura y a las dificultades existentes en cuanto a la baja reproducibilidad interobservador (234), aunque no ocurre así en el estudio de biopsias, en que la fluctuación intra e interobservador no es tan marcada (266). Por lo tanto estos marcadores moleculares ofrecen el potencial de mejorar el nivel de reproducibilidad respecto a los métodos e instrumentos de screening tradicionales.

Existen diferentes categorías y tipos de marcadores, las ventajas de uno respecto a otro y sus implicaciones clínicas son objeto de debate y están bajo estudio de manera intensa y continuada, y este ha sido uno de los motivos que nos ha llevado a la realización de este trabajo.

Pero se conoce y si que se han publicado un elevado número de estudios y ensayos clínicos controlados en fase III, que han demostrado que la tasa de detección precoz de cáncer de cuello de útero, se incrementa de manera significativa si se combina la citología cervical con el test de VPH. Actualmente hay evidencia de que la asociación de citología con la determinación del ADN del VPH, a partir de los 30-35 años, incrementa la sensibilidad del cribado, manteniendo una adecuada especificidad en mujeres de 30-35 años, con un valor predictivo negativo próximo al 100%, y que la negatividad de ambos test permite espaciar, de manera segura, el intervalo de cribado de 3 a 5 años. Otros autores demuestran que el test VPH empleado como técnica única en el cribado primario es, de promedio, un 28-30% más sensible que la citología, pero un 7% menos específico. (93). En España se estableció un consenso en el año 2006, en que incluye un test para los tipos de alto riesgo de VPH (Hybrid Capture II^R, Digene, Gaithersburg, MD, USA), junto a la citología en mujeres de 35 años o mayores. Si la citología es negativa y el test VPH positivo, se vuelve a repetir en un año ambas pruebas. Si la citología es al menos células atípicas o de significado indeterminado, y existe un virus de alto riesgo, es remitida para la práctica de una colposcopia (267). Si ambas pruebas son negativas, el intervalo de screening se alarga hasta cinco años.

Hesselink et al (268), en un estudio de cohortes reciente, concluyeron que a nivel de screening primario en pacientes con citologías normales, la detección de la carga viral de los serotipos virales 16, 18, 31, 33 GP5+/6+-PCR positivas, no aportaba un valor añadido en la prevención de un posterior desarrollo CIN 2 o CIN 3, y respecto a la citología se incrementaba la sensibilidad, a costa de una marcada disminución en la especificidad para \geq CIN2.

Bulkmans et al. en otro estudio de cohortes (269), evalúan la tasa de aclaramiento de los 14 serotipos más prevalentes altamente oncogénicos, en mujeres positivas con citología normal y con discariosis leve/borderline, en una población basada en un screening de cohortes de 44.102 mujeres. La tasa de aclaramiento de los VPH-AR a los 6 meses en citología normal y en moderada discariosis, fue de 43% (95% intervalo de confianza (IC) 39-47) y 29% (95% IC 24-34) respectivamente. A los 18 meses, las tasas aún eran más elevadas, 65% (95% IC 60-69) y 41% (95% IC 36-47), respectivamente. Las tasas más bajas de aclaramiento en los casos con citología normal, fueron para los VPH16, VPH18, VPH31, VPH 33. A los 18 meses existe una reducción más significativa hasta un 1% para el VPH 16 con citología normal (49%, 95% IC 41-59) y VPH 31 (50%, 95% IC 39-63) y para el VPH 16 en los casos de mujeres con alteraciones en la citología (19%, 95% IC 12-29). Entre las mujeres que presentan persistencia de VPH 16, aumenta la tasa de detección de \geq CIN 3 (normal $P < 0.0001$; BMD, $P = 0.005$). Estas diferencias en función del genotipo viral, indican el valor potencial del mismo en los programas de screening. Estos datos son evidentes para el VPH 16, pero no son concluyentes para el seguimiento de mujeres positivas para el VPH 18, VPH 31, y VPH 33. Para el resto de serotipos aconsejan un periodo de espera y seguimiento, ya que la tasa de aclaramiento de VPH-AR es marcadamente más elevada después de 18 meses, que después de 6 meses de seguimiento y el riesgo de progresión a \geq CIN 3 es bajo.

Otro estudio, en referencia a los casos de citología cervical negativa y VPH positivo, en que es conocido que es un hecho muy común, y que representaría un porcentaje de casos no diagnosticados de CIN 2-3, que supone aproximadamente un 4% de todos los CIN 2-3 y un 0,74% de los casos de cáncer de cérvix invasivo con dos Papanicolau negativos y un 0.51% de los casos con un Papanicolau negativo, concluyen que cuando se aplica la detección de VPH en citologías negativas, se incrementa en un 40 % la detección de CIN 2-3. Se considera que se debe proseguir el estudio si la citología es negativa y el VPH positivo en dos ocasiones, o la citología negativa y el VPH positivo en una ocasión cuando los genotipos virales son el 16-18- o 45 (229).

Un reciente meta-análisis (200), tras una revisión sistemática de 25 estudios que cumplían los criterios de inclusión en cuanto a tipos de participantes, tipos de intervenciones y métodos para limitar la verificación de las desviaciones. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo del test de VPH y de la citología, con el objetivo de determinar la exactitud en la detección de neoplasias intraepiteliales de alto grado que pasan desapercibidas o infradiagnosticadas a nivel de un screening primario de cáncer de cérvix. Los resultados en cuanto a sensibilidad

de HC2, PCR, citología (ASCUS o mayor) y citología (LSIL o mayor) fue de 90%, 80.9%, 72.7% y 61.6% respectivamente y la especificidad fue de 86.5%, 94.7%, 91.9% y 96% respectivamente. El ratio de sensibilidad de HC2 comparado con citología (ASCUS) fue de 1.25 (95% IC: 1.20-1.29), y el correspondiente ratio de especificidad fue de 0.97 (95% IC: 0.96-0.98). El ratio de sensibilidad de la combinación de HC2 y citología (ASCUS) frente a HC2 sólo fue de 1.05 (95% IC: 1.04-1.06) y el ratio de especificidad 0.95 (95% IC: 0.94-0.96). Para mujeres mayores de 30 años, la sensibilidad del HC2 fue de 94.8% y la especificidad 86%. Concluyen que comparado con la citología, el HC2 y el PCR son sustancialmente más sensitivos para la detección de un CIN II existente o un grado mayor, pero significativamente menos específico. La combinación del test HC2 y la citología presentan la más elevada sensibilidad y la más baja especificidad. Sin embargo, también concluyen que aún no se ha demostrado una reducción de la incidencia o de la mortalidad, secundaria a cáncer cervical invasivo, entre las pacientes sometidas a cribado sólo citológico comparadas con el grupo de pacientes en las que se determinó el VPH.

Dillner et al (270), en un estudio de cohortes a nivel europeo muestran unos resultados en la tasa de incidencia acumulada de aparición de CIN 3, que después de 3 años de citologías negativas es de 0.51% (0,23-0,77 %) siendo este periodo el intervalo de tiempo recomendado en Europa. La tasa acumulada de incidencia de CIN 3+ después de de seis años es considerablemente menor entre las mujeres VPH negativas (0.27%, 95% intervalo de confianza 0.12% a 0.45%) que entre las mujeres con resultados negativos de citología (0.97%, 0.53% a 1.34 %). La tasa de incidencia acumulada entre las mujeres con citología negativa y positiva para el VPH, aumenta continuamente a medida que pasa el tiempo, alcanzando el 10% a los seis años, mientras que si la citología es positiva y el VPH negativo, la tasa se mantiene por debajo del 3%. Si bien es conocido que el realizar el test de VPH a nivel de screening aumenta la sensibilidad para el CIN 3+, y que el intervalo de tiempo apropiado lo determina la duración del efecto protector del test de VPH como negativo, este amplio análisis de unión de siete estudios diferentes de seis países Europeos concluye de forma consistente que la tasa de incidencia acumulada de CIN3+ entre las mujeres VPH negativas es muy baja por lo que la estrategia futura de screening cervical cada seis años es seguro y efectivo.

En un estudio llevado a cabo por el Instituto Nacional del Cáncer en USA y La Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP), concluyeron que el test de ADN de HPV puede ser utilizado junto a la citología en el screening en mujeres mayores de 30 años, con un intervalo de 3 años si ambos test son negativos (271). Cuando el HC2 es positivo y la citología es normal, se propone la repetición de

ambos tests entre 6 y 12 meses. Si ambos test son positivos, la paciente es referida para la práctica de una colposcopia.

En Europa, sin embargo, el uso de test de VPH no está incluido como norma en los programas de screening. Cuzick et al publicaron otro meta-análisis (239), con siete estudios europeos y norteamericanos y las conclusiones fueron similares al metaanálisis de Koliopoulos et al (200), pero probablemente el contraste entre el test de VPH y la citología era exagerado al incluir en el estudio dos estudios alemanes que presentaban la citología con muy baja sensibilidad. En el estudio de Cuzick, los autores sugieren el uso de test de VPH como exclusivo en el screening y seguido por citología sólo en los casos de resultado positivo al VPH, pero sin embargo consideran, que a pesar de la mayor sensibilidad del test de VPH en los estudios transversales realizados, todavía no se considera con suficiente peso o firmeza como para recomendar su uso en el screening primario cervical. Además, teniendo en cuenta que se necesitan varios años para que una lesión pre-cancerosa evolucione hacia un cáncer, y que además algunas lesiones de alto grado incluso pueden regresar, no estaría claro si el hecho de detectar el ADN del VPH, no llevaría más que a encontrar mayor número de lesiones de pequeño tamaño, las cuales probablemente desaparecerían sin necesidad de intervenir ni de preocuparse.

Tenemos que recordar que el principal objetivo de los programas de screening cervical es reducir a largo plazo, de forma cuantitativa, la incidencia y la mortalidad derivadas del cáncer de cérvix, y a su vez a corto plazo aumentar la tasa de detección de la enfermedad pre-invasiva. Ambos son importantes, y se debe evitar un excesivo screening que conllevaría un sobrediagnóstico de condiciones transitorias y aumentaría el riesgo de sobretratamiento.

En España se presentaron resultados del estudio Afrodita, y concluyeron, entre otros resultados, que el porcentaje de mujeres entre 18 y 65 años en las que se les tomó una muestra citológica cervical en los últimos 3 años, fue de 75,6%, con una insuficiente cobertura en las mujeres mayores de 55 años (66 %), especialmente las que viven en áreas rurales, en mujeres con un nivel socioeconómico bajo, dependiendo de la comunidad autónoma e incluso con discrepancias en función de determinados grupos de población con excesivos reconocimientos periódicos no necesarios debido a un screening oportunista especialmente en mujeres de bajo riesgo. Aunque se conoce que alrededor del 80% de las mujeres con cáncer de cérvix invasivo no estaban adecuadamente controladas y no tenían historia previas de citologías (267, 272).

Se han realizado o se están realizando en estos últimos años, siete grandes ensayos clínicos randomizados, : Suecia (Swedescreen 24510 mujeres 12.514 mujeres) ; Holanda (Pobascam, 44.938 mujeres); Reino Unido (Artistic, 24.510 mujeres); Italia (NTCC, 95.000 mujeres); Finlandia (Finnish RPHT, 200.000 mujeres); Canadá (12.000 mujeres); India (140.000 mujeres) (200), y entre ellos, algunos ya han dado resultados preliminares:

- Uno en Suecia , Swedescreen , con 12.514 mujeres entre 32 y 38 años, concluyen que una primera prueba de ADN junto a la citología en el programa de screening, y repetir el test de ADN en las mujeres con citología negativa, parece ser la mejor estrategia y más factible para poder aplicar como screening primario (273).

- Uno en Holanda, Pobascam, con 44.938 mujeres, en que se han publicado los resultados de las primeras 17.155 mujeres entre 29 y 56 años. Comparan una combinación de citología junto a test de VPH (N = 8.575) con únicamente citología (N = 8.580) (274), y 5 años después se realizaron ambas pruebas en los dos grupos, con un seguimiento de 6.5 años. Se concluyó que más del 70% de lesiones CIN 3, fueron detectadas usando la combinación de ambos procedimientos. El número de lesiones CIN 3 fue similar en ambos grupos, pero fueron detectadas antes en el grupo en el que se realizó el test de ADN del VPH que en el grupo control (68/8575 vs 40/8580, aumento 70%, 95% IC: 15–151; p=0.007). En el siguiente control, fue al revés, el número de lesiones CIN 3 detectadas fue menor en el grupo con test ADN del VPH que en el grupo control (24/8413 vs 54/8456, 55% disminuye, 95% IC 28–72; p=0.001). Defienden que el añadir un test de VPH-AR al screening citológico aumenta la detección de lesión intraepitelial de alto grado (H-SIL \geq CIN 2), tras confirmación histológica de \geq CIN2 en 36 meses , con una sensibilidad relativa 1.4, 95%CI: 1.3-1.5; y una sensibilidad absoluta 94.1 y 68.0%, respectivamente) y en caso de negatividad el riesgo es prácticamente nulo, sólo 0.2% (95% IC: 0.0-1.1).Concluyen que la implantación del test de ADN del VPH en el cribado primario conlleva a una detección precoz de una lesión CIN 3, por lo cual el intervalo de screening contemplado de cinco años, se puede ampliar un año más. Ya que en el screening segundo, la incidencia de lesiones cervicales en el grupo en que estaba ya controlado el ADN viral, era muy baja (274).

- En Reino Unido, Artistic, incluía 24510 mujeres entre 20 y 64 años, se practicaba citología líquida y test de VPH, también concluyen una elevada proporción de VPH positivas en mujeres de menos de 30 años, y entre las VPH positivas de todas las edades, una displasia leve-moderada es 20 a 30 veces más elevada que entre las VPH negativas, y una displasia severa se incrementa en más de 100 veces que entre las VPH negativas. Y contrariamente a la literatura, no existe diferencia de edad, e

incluso mayor proporción de displasia severa en mujeres jóvenes que en las de más de 50 años (275).

- Otro en Canadá entre 10.154 mujeres de 30 a 69 años, y concluyen que usando test de VPH la sensibilidad es de un 94.6% (95% IC: 84.2 a 100) para detectar CIN 2 o 3, y utilizando sólo la citología la sensibilidad es de 55.4% (95% IC: 33.6 a 77.2; $p=0.01$). Usando test de VPH, la especificidad es de 94.1% (95% IC: 93.4 a 94.8) y con sólo la citología la especificidad es de 96.8% (95% IC, 96.3 a 97.3; $p<0.001$). Por tanto el test de VPH tiene mayor sensibilidad que la citología en la detección de la neoplasia cervical intraepitelial (276).

- Otro en Italia, NTCC, es un amplio ensayo randomizado (Nuevas tecnologías en el estudio del screening del cáncer cervical) (277, 278). En que concluyen que el test de VPH es un 63% más sensitivo que la citología convencional, pero menos específico para detectar una lesión intraepitelial, debido a que muchas lesiones regresan, y por lo tanto es necesario volver a repetir el test en estos casos. Para mejorar la especificidad, consideran el p16^{INK4A} inhibidor de la quinasa ciclina-dependiente, como marcador de infección de VPH, y de los oncogenes virales activados y del ciclo celular desregulado inducido por el virus.

En un subestudio del NTCC, los investigadores observaron los ADN positivos para el VPH, aplicaron el test de p16^{INK4A} por inmunohistoquímica y entre éstos, independientemente de la edad, detectaron lesiones CIN 2 o mayor en 81 de 92 mujeres con dichas lesiones, con una sensibilidad del 88 %, y una especificidad del 61 %. Concluyen que en mujeres VPH positivas, la sobreexpresión de p16^{INK4A} está fuertemente asociada con la presencia de CIN2+ confirmado histológicamente (279).

Consecuentemente, encontramos muchos estudios epidemiológicos y ensayos randomizados, pero todavía no existen datos que demuestren a largo plazo una reducción en la incidencia y mortalidad por cáncer cervical, tras la aplicación del cribado primario con el test de VPH. Pero podemos argumentar, que debido a las conclusiones de estos estudios ya finalizados y los que aún están en marcha, y dada la obvia superioridad de la prueba de VPH sobre la citología, en todos los estudios transversales, parece poco probable que los futuros resultados de los estudios actuales obtengan resultados contradictorios. Además, cuando se introdujo la citología como cribado poblacional, no se hicieron estudios randomizados. Sin embargo, en la época actual de la medicina basada en la evidencia, todas estas importantes innovaciones en el screening cervical, deben estar justificados con datos de la más alta calidad, al menos en los países en los que aun no se ha introducido el test de VPH.

Las directrices futuras en el cribado poblacional son cambiantes, teniendo en cuenta las cohortes vacunadas, nos encontraremos con una menor prevalencia de alteraciones citológicas, y la búsqueda de las mismas será más difícil, por lo que la citología será sustituida a nivel de primera línea de cribado por un test más sensible., con la finalidad de poder iniciar los controles más tarde, a los 30-35 años, con intervalo cada 5 años.

Pero tanto la citología como el test VPH detectan un exceso de mujeres con ASCUS o LSIL o con infección transitoria, no significativas. Esto conlleva una carga asistencial para su diagnóstico y eventual tratamiento.

Para mejorar la especificidad y detectar sólo mujeres con CIN 2-3 ó cáncer, o con potencial de progresión, se aplicarían estos marcadores moleculares, que detectan lesión celular, en concreto la cuantificación de oncoproteínas E6 -E7 como elemento productor de la lesión, y la tinción inmunohistoquímica de la proteína p16^{INK4a}, como marcador de proliferación, que detectan específicamente las células en transformación neoplásica, tal y como se ha comentado en el subestudio de la NTCC (279), y éstos son los dos marcadores moleculares que hemos aplicado en nuestro estudio, en concreto el p16^{INK4a}.

Si se le comenta a la paciente que es positiva para un virus de alto riesgo, pero la citología es negativa, y de que no existe la necesidad de repetir la prueba hasta dentro de un año, podría llegar a generar situaciones confusas que pueden ocasionar a una repetición de visitas y a seguimientos innecesarios por parte de la paciente. También ocurre en el caso de mujeres jóvenes, en que la infección es más prevalente y a su vez la tasa de aclaramiento es más elevada, aunque sean VPH de alto riesgo, (a excepción del 16 y 18 , que son los que están incluidos en las vacunas disponibles), pero existe la incertidumbre o la ansiedad especialmente por parte de sus madres si tienen el conocimiento de un prueba positiva al VPH, y aun más actualmente que se ha administrado un exceso de información y aún no se ha establecido un adecuado estado de concienciación.

Está claro, que una lesión intraepitelial de bajo grado, en principio se controla y se realizan controles seriados, según la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), sólo estaría indicado el tratamiento excisional con asa diatérmica (loop electrosurgical excision) en casos de colposcopia insatisfactoria, legrado endocervical positivo, infección por VPH de alto riesgo durante más de dos años con persistencia de LSIL, lesión amplia, o en las mujeres mayores de 40 años siempre que exista infección por VPH-AR.

Por lo que no es adecuado realizar una escisión de la zona de transformación cuando es una lesión que regresaría y estaríamos realizando una conización sin necesidad,

con los riesgos que conlleva de posible estenosis posterior del cuello del útero e incluso de parto prétermino o distocias de dilatación cervical en el momento del parto. Aunque en los diferentes estudios éstas posibles complicaciones sólo ocurrían cuando se practicaban las conizaciones con bisturí frío. En un meta-análisis de Kyrgiou en 2006, revisando más de 27 estudios, no encontraron diferencias significativas en cuanto a ingresos neonatales en la unidad de cuidados intensivos, ni en cuanto a mortalidad perinatal (247).

En un último metaanálisis de más de veinte estudios de Arbyn et al. 2008 (279), demuestra que existe riesgo, con un aumento de partos pretérmino, bajo peso al nacer e incluso mortalidad perinatal, pero sin ser estadísticamente significativo. Debe existir el equilibrio entre el tamaño de la conización, que determinará la morbilidad obstétrica, y conseguir una completa curación en cuanto a recurrencias, y es un tema que aún no tiene respuestas, a pesar de los ya conocidos test que ayudan al control de las recidivas del tratamiento post-escisional. Este es otro de los motivos por los que es necesario que se desarrollen y apliquen procedimientos diagnósticos que seleccionen estrictamente aquellos casos que progresarán y que necesitan un tratamiento quirúrgico, especialmente en aquellas mujeres que se encuentran en edad reproductiva, para orientar con más precisión el tamaño de la lesión y la agresividad de la exéresis.

Aunque Matthews et al. (243), proponen la extirpación electroquirúrgica con asa para la resolución de discrepancias en los diagnósticos no acordes entre citología y biopsias, ya que concluyen en su estudio que sí sería adecuado practicar una conización cervical diagnóstica para resolver discrepancias en los resultados anatomopatológicos, debido a que tenían una elevada tasa de CIN 2-3 (66%) en los resultados anatomopatológicos finales, en el grupo pacientes con citología H-SIL y resultados de biopsia de cérvix CIN1 o inferior. Además encontraban mayor riesgo de presentar lesiones significativas aquellas pacientes que tenían antecedentes de tratamientos cervicales previos. Este hecho indica que si hubiésemos incluido en el presente estudio las pacientes con tratamientos o cirugía cervical previa, hubiésemos obtenido más resultados positivos y mayor porcentaje de casos con progresión de la lesión.

Con la implantación de la vacuna contra los VPH 16 y 18, a largo plazo se reducirá el riesgo de cáncer de cuello, pero no se llegará a eliminar. En el cohorte vacunado y en un primer tiempo se reducirán las consultas y visitas por alteraciones citológicas menores, como ASCUS y L-SIL, y será más a largo plazo, aproximadamente más de diez años en que se reducirá la incidencia de H-SIL y en consecuencia de cáncer cervical. Se ha estimado un descenso superior al 40% en los resultados citológicos

anómalos. (253, 70). Debido a que las alteraciones de células escamosas serán menos frecuentes, puede llegar a ocurrir que aparezcan más falsos negativos con una pérdida de sensibilidad, o al revés que den a confusión los cambios inflamatorios y las atipias reactivas, ante la menor prevalencia de anomalías escamosas y atipias nucleares, los cito-técnicos no estarán tan preparados, ni tan acostumbrados para detectarlas y podría llevar a informar más falsos positivos con la consiguiente pérdida de especificidad. También la colposcopia y la biopsia dirigida, considerada como “gold standard”, puede ser variable en función de la persona que la practica (280), y tampoco existen estudios que evalúen la exactitud de la colposcopia en relación al screening primario. Sólo existe un estudio en que Koliopolus et al (200) examinan a colposcopistas a los que se les ha enmascarado los test del screening, y es por ello que no existe evidencia que de soporte al uso de la colposcopia como técnica “gold standard” a nivel de cribado primario, y que ésta influya en los resultados.

Entonces el test de ADN del VPH como prueba única en screening primario, si bien no está sujeto a interpretaciones subjetivas, no es suficiente como para proporcionar información de si será un virus con potencial oncogénico elevado ó no, a pesar de ser catalogado como un virus de alto riesgo oncogénico, conociendo que en ocasiones el test es negativo, a pesar de existir integración viral. Es cuando se necesitará tener más información que la proporcionarán los marcadores moleculares que nos detectan las oncoproteínas y otras alteraciones del ciclo celular, que son las que contribuirán a que la lesión persista.

Podemos concluir del presente estudio, que la cuantificación de la sobreexpresión del ARNm de las oncoproteínas E6-E7, nos proporciona una información estadísticamente significativa (p: 0,002), de predicción de evolución de la lesión en las lesiones intraepiteliales de bajo grado, cuando se aplica el marcador en la primera citología con dicho diagnóstico. La p16^{INK4a} nos proporciona también una predicción estadísticamente significativa (p: 0,041), pero únicamente si se aplica la puntuación nuclear “Wenztsen modificada” (WEN MOD). Cuando se combinan ambas variables Oncotech y p16^{INK4a}, la significación es ligeramente peor, si bien su comportamiento global predictivo es bueno.

Con estos marcadores pretendemos y es uno de los objetivos de este trabajo conocer y predecir, mediante la cuantificación del ARNm de las oncoproteínas E6-E7, aquellas lesiones que evolucionarían hacia una lesión de alto grado, y así evitar que pasen desapercibidas. Es conocido y ya hemos comentado en varias ocasiones, que la mayoría de LSIL regresan espontáneamente, por lo que es importante detectar a estas pacientes, ya que no necesitan controles adicionales. La finalidad que se

pretende conseguir, consiste en disminuir e incluso eliminar visitas sucesivas e innecesarias que incrementan el tiempo asistencial y el coste.

Además muchas mujeres prefieren saber que tienen un LSIL, que un VPH positivo, ya que el conocimiento de tener una infección leve que seguramente desaparecerá y que sólo se debe controlar es tranquilizante, pero sin embargo el hecho de saber que tienen un virus de transmisión sexual que además produce cáncer crea una ansiedad y una actitud de espera con inquietud.

Es a la vez prioritario, determinar con exactitud las pacientes que requieren un tratamiento escisional, para evitar tratamientos agresivos e innecesarios, y a la vez detectar todas las lesiones sin que pasen desapercibidas.

En cuanto a nuestra muestra, ha sido una población excesivamente seleccionada, por lo que no se puede extrapolar el resultado a una población general. Si no se hubiesen excluido los virus de bajo riesgo probablemente los resultados hubiesen sido más prometedores, pero nos sirve para que se inicien otros estudios con una población más grande

En el momento en que empezamos a recoger citologías y datos de las pacientes para el inicio de este estudio, que se finalizó en octubre del año 2005, aun no se había implantado el programa de vacunación, tampoco se habían iniciado muchos de estos ensayos clínicos randomizados a nivel mundial en cuanto a futuras directrices de screening primario. En estos años, se han publicado miles de trabajos, se han ido estudiando posibles cambios a nivel de detección de lesiones y posibles predictores de lesiones de alto grado y nuevos marcadores, con múltiples estudios epidemiológicos a gran escala que son los que en un futuro y aplicando estos marcadores moleculares, nos darán una respuesta a todos estos interrogantes que todavía tenemos.

CONCLUSIONES

1. En el seguimiento de lesiones intraepiteliales de bajo grado (L-SIL), la cuantificación del ARNm de las oncoproteínas E6-E7 es un eficaz predictor en seleccionar aquellas lesiones que evolucionarían hacia una lesión de alto grado, y evita que estas pasen desapercibidas.
2. La tinción inmunocitoquímica de la proteína p16^{INK4a}, en muestras citológicas, es un buen marcador de proliferación, detecta específicamente las células en transformación neoplásica, en casos de lesiones intraepiteliales de bajo grado (L-SIL), pero sólo si se utiliza la clasificación de Wentzensen modificada.
3. La combinación de la cuantificación de ARNm para las oncoproteínas E6-E7 y la detección de p16^{INK4a}, no mejora la estrategia para la detección precoz de una futura progresión hacia una lesión de alto grado ni para detectar una lesión de alto grado subyacente, ya que se obtiene una significación ligeramente peor, aunque su comportamiento global predictivo es bueno y se observa que ambas son importantes en la predicción de la probabilidad de que la alteración permanezca.
4. El punto de corte óptimo, en la cuantificación del ARNm de las oncoproteínas E6-E7, mediante el test Oncotech^R para la predicción de evolución de la lesión, es mayor o igual a 2,00% y es a este nivel cuando se obtiene una mejor relación sensibilidad/especificidad.
5. El estudio inmunohistoquímico de p16^{INK4a} en las biopsias cervicales y en las conizaciones, sí se correlaciona con la severidad de la lesión.

Como conclusión general, los resultados de este trabajo indican que la cuantificación del ARN mensajero para E6-E7 y la detección de p16^{INK4a}, son de utilidad en el seguimiento de las pacientes con diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de bajo grado, debido a que:

- permite identificar aquellas pacientes sin riesgo de progresión que pueden volver al cribado habitual.

- aumenta la sensibilidad en detectar las pacientes con mayor riesgo de presentar una futura progresión de la lesión intraepitelial, especialmente en las pacientes en que la lesión es permanente.

BIBLIOGRAFIA

1. Enciclopedia Espasa-Calpe. Suplemento anual 1959-1960. Apartado Biología; 394-398.
2. Stanley W.M. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of the tobacco mosaic virus. *Science* 1935; 81: 644-645
3. Stanley W.M., Loring H.S. The isolation of crystalline tobacco mosaic virus protein from diseased tomato plants. *Science* 1936; 83 (2143): 85.
4. Stanley W.M. , Lauffer M.A. Disintegration of tobacco mosaic virus in urea solutions. *Science* 1939; 89 (2311): 345-347.
5. Holmes EC, Drummond AJ. The evolutionary genetics of viral emergence. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:51-66.
6. Liu Y, Nickle DC, Shriner D, Jensen MA, Learn GH Jr, Mittler JE, Mullins JI. Molecular clock-like evolution of human immunodeficiency virus type 1. *Virology.* 2004 Nov 10;329(1):101-8.
7. Koonin EV. The Biological Big Bang model for the major transitions in evolution. *Biol Direct.* 2007; 20: 2-21.
8. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA and its prevalence in cancer biopsy samples in different geographic regions. *Proc Natl Acad Sc USA* 1983; 80: 3812-5.
9. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55 (2):74-108.
10. Evans F, Adamson C, Papillo J. Distribution of human papillomavirus in thinprep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer* 2006;106:1054-64.
11. Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human Papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from Thin Prep Papanicolaou Tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer* 2002; 94 (8): 2199 -2210.
12. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-29.

13. Castellsagué X, Diaz M, de Sanjose S. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:303-15.
14. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006; 26 (Supl 3): 11-25.
15. Koutsky LA. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3-8.
16. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowsky J, et al Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women .*CMAJ* 2003; 168:421-5.
17. Nobbenhius MAE, Helmerhorst TJM, Van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet*. 2001; 358:1782-3.
18. Kjaer SK, Van Den Brule AJ, Paull G, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002; 325:572.
19. Hebner CM, Laimins L. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenecity. *Rev.Med.Virol.*2006;16:83-97.
www.interscience.wiley.com.
20. Parkin DM. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94:153-156.
21. World Health Organization (2006). *Comprehensive cervical cancer control : a guide to essential practice*. Geneva, Switzerland : WHO.
22. Longworth MS, Laimins LA. Patogénesis of human papillomaviruses in differentiating ephitelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(2):362-72.
23. Giuliano A, Tortolero Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kruger Kjaer S, et al. Epidemiology of Human Papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 2008; 26 (Suppl.10): K16-28.

24. Parkin DM, Almonte M, Bruni L, Clifford GM, Curado MP, Piñeros et al. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the Latin America and Caribbean Region. *Vaccine* 2008; 26 (Suppl. 11):L1-15.
25. Stanley M, Gissman L, Nardelli-Haeffliger D. Immunobiology of HPV infection and vaccination. Implication for second generations vaccines. *Vaccine* 2008; 26 (Suppl. 10): K61-7.
26. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano A, Bruni L, de Sanjose S, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and Type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26 (10): K29-41.
27. Torné A, Alba A, Castellsagué X, Cortés J. Vacunas contra el virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol*. 2006; 49 (7): 380-93.
28. IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Vol. 90. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007.
29. Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A, Gissman L. El VPH en la etiología del cáncer humano. *Vaccine* 24S3 (2006) S3/1-S3/10.
30. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 64: Human Papillomaviruses. Lyon, France, IARC, 1995. International Agency for Research on Cancer.
31. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis, *Br J Cancer* 2003; 88 (1):63-73.
32. Smith JS, Lindsay L, Keys J, Hoots B, Winer RL, Franceschi S, et al . Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007 Aug 1;121(3):621-32.
33. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa L. Distribución de los tipos del VPH en mujeres con y sin patologías neoplásicas cervicales. *Vaccine* 2006; 24 (supl.3). Cap 3. S26-34. Elsevier ISSN 0264-410X.

34. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis, *Br J Cancer* 2003; 88 (1):63-73.
35. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13541 women with carcinoma of the cervix and 23017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;118:1481-95.
36. Castellsagué X, de Sanjosé S, Bosch F.X. Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas. En *Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero*. Carreras R. Ed Med Panamericana 2007. ISBN 978-84-9835-101-9. Cap 1 ;1-25.
37. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med* 2007; 13:857-61.
38. Burchell AN, Richardson H, Mahmud SM, Trottier H, Tellier PP, Hanley J, et al. Modeling the sexual transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am J Epidemiol* 2006; 163 (6): 534-46
39. Barnabas RV, Laukkanen P, Koskela P, Kontula O, Lehtinen M, Garnett GP. Epidemiology of HPV 16 and cervical cancer in Finland and the potential impact of vaccination : mathematical modelling analyses. *Plos Med* 2006 ; 3 (5) :e138.
40. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971; 47 (1): 1-13.
41. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch M, Wheeler CM. A 2-prospective study of HPV persistence among women with ASCUS or LSIL cytology. *J Infect Dis* 2005; 192: 1158-65.
42. Herrero R, Castle PE, Schiffman M et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste , Costa Rica. *J Infect Dis* 2005;191:1796-807.
43. Collins, S. et al. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG* 2002 ;109: 96-98.

44. Castle, P. E. et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J. Infect. Dis.* 2005; 191: 1808-1816.
45. Franceschi, S. et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 2677-2684.
46. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24 (Supl 1): S1-15.
47. Manhart LA, Kousky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia ? A meta-analysis. *Sex Trans Dis* 2002; 29 (11): 725-35.
48. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Colmes KK, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Md.* 2006; 354: 2645-54.
49. Hogewoning CJ, Bleeker MC, Van den Brule AJ et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer* 2003; 107: 811-16.
50. Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1149-56.
51. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Maijer CJ, Shah KV, DeSanjose S, et al. IARC. Multicenter Cervical Cancer Study Group. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med.* 2002; 346:1105-12.
52. Sarkola ME, Grenman SE, Rintala MA, Syrjanen KJ, Syrjanen SM. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(11):1181-1188.
53. Burchell AN, Eduardo L, Franco EL. Epidemiology of Oncogenic and Nononcogenic HPV Types, and Evidence for Differences in Their Sexual Transmissibility En Monosego J (ed) 2006: Emerging Issues on HPV Infections: From Science to Practice. Basel, Karger, pp 20-33.

54. Majewski S, Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1312-18.
55. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in VPH carcinogenesis. *Virus Res.* 2002; 89 (2):191-9.
56. Evans MF, Koreth J, Bakkenist CJ et al. Allelic deletion at 11q23.3-q25 is an early event in cervical neoplasia. *Oncogene* 1998; 16:2557-64.
57. Harima Y, Sawada S, Nagata K et al. Polymorfism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cáncer in japanese women. *Int J Mol Med* 2001; 7: 261-4.
58. Madkan VK, Cook-Norris RH, Steadman MC, Arora A, Mendoza N, Tyring SK. The oncogenic potential of human papillomaviruses: A review on the role of host genetics and environmental cofactors. *Br J Dermatol.* 2007; 157(2):228-241.
59. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006; 24(Supl 1): S1-15
60. Coglianò V, Baan K , Straif Y et al. Carcinogenety of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 2005; 6; Issue 4:204.
61. Ahdieh L, Muñoz A, Vlahov D et al. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 1148-57.
62. Clifford G, Gonçalves MA, Franceschi S. Human Papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS* 2006; 20: 2337-44.
63. Gilles C, Manigart Y, Konopnicicki D, Barlow P, Rozenberg S. Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. *Gynecol Oncol.* 2005; 96:112-8.
64. Patel HS, Silver AR, Northover JM. Anal cancer in renal transplant patients. *Int J Colorectal Dis* 2005; 16:1-5.

65. Corona G CM, Tinoco A, Navaro T et al . Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2 and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. *Hum gene Ther* 2004; 15:421-31.
66. Yang R, Wheeler CM, Chen X et al. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol* 2005; 79:6741-50.
67. Welters M.J.P, Van der Logt P, Van den Eeden. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 inmunity in relation to health versus disease. *Int. J. Cancer* 2006; 118: 950-956.
68. Silins I, Wang Z, Avall-Lundqvist. Serological evidence for proteccion by human papillomavirus (HPV) type 6 infection against HPV type 16 cervical carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89:191-9.
69. Molano M, Van de Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, Maijer CJ, Munoz N, Franceschi S; HPV Study Group . Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 486-494.
70. Cortés J, García M, Muñoz E, Martínón F, Torné A, García A, Cisterna R, Vidart JA, Abizanda, Pipoll MA, Vilaplana E, Poveda A. Documento de consenso de las sociedades científicas españolas. Vacunas profilácticas frente al VPH. *Prog. Obstet Ginecol* 2009; 52 (1): 32-44.
71. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type16 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.
72. Kjaer SK, Hogdall E, Frederiksen K, et al. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res* 2006; 66:10630-36.
73. Schiffman M, Herrero R, Desalle R et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337:76-84.

74. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 (suppl 1): S16-24.
75. Pagliusi SR, Dillner J, Pawlita M, Quint WG, Wheeler CM, Ferguson M. Cap. 23: International standard reagents for harmonization of HPV serology and DNA assays-an update. *Vaccine* 2006; 24 (suppl 3): S193-200.
76. Schiffman M, Castle PE, Jerónimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cancer. *Lancet* 2007; 370: 890-907.
77. Clifford GM, Gallus S, Herrero R et al. Worldwide distribution in human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366: 991-98.
78. Kovacic MB, Castle PE, Herrero R et al. Relationship of human papillomavirus type, qualitative viral load, and age with cytologic abnormality. *Cancer Res* 2006; 66:10112-19.
79. Berrington de Gonzalez A, Green J. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8097 women with squamous cell carcinoma and 1374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2007;120: 885-91.
80. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15: 820-22.
81. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002; 360:228-29.
82. Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM et al. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:1038-44.

83. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 891-94.
84. Ordi J, Alonso I, Torné A, Esteve R, Sierra E, Campo E, Puig-Tintoré LM. Human Papillomavirus load in hybrid capture II assay: does increasing the cutoff improve the test?. *Gynecol Oncol* 2005; 99:313-31.
85. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*. 2001;84:1616-23.
86. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 886-91.
87. Pirami L, Giache V, Becciolini A. Analysis of HPV 16,18,31 and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1997;50: 600-04.
88. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1755-62.
89. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel DM. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004; 64:3878-84.
90. McCann MF, Irwin DE, Walton LA, Hulka BS, Morton JL, Axelrad CM. Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1992; 1:125-9.
91. Prokopcczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1992;1:125-9.
92. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, de Sanjosé S, Muñoz N; IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group. Smoking

and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003 Nov;14(9):805-14.

93. Puig-Tintoré LM, Cortés J, Castellsagué X , et al. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol*. 2006;49 Supl 2: 5-62.
94. U.S Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking. A report of surgeon's general. Atlanta. U.S department of health and human services, Centers for Disease Control and Prevention and Health Promotion. Office on Smoking and Health; 2004.
95. Kuper H, Titus-Ernstof L, Harlow BL, Cramer DW. Population based study of coffee, alcohol and tobacco use and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 2000; 88: 313-8.
96. Deacon JM, Evan CD, Yule R, Desai M, Binn W, Tayslosr C et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester Cohort. *Br J Cancer*. 2000; 83:1565-72.
97. McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M et al. Smoking is a risk factor for cervical neplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev*. 2005; 14 (5) : 1165-70.
98. Burchell AN, Winer RL, Sanjosé S, Franco E. Epidemiología y dinámica de la transmisión de la infección genital por el VPH. *Vaccine* 2006; 24 (S3):54-65.
99. Winer RL, Lee SK, Hugues JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003; 157 (3): 218-26.
100. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1604-13.
101. Tran-Thanh D, Provencher D, Koushik A et al. Herpes simplex virus tipe II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 129-34.

102. DiPaolo JA, Woodworth CD, Coutlee F et al. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus immortalized cervical keratinocytes. *Int J Cancer* 1998; 76:865-71.
103. Smith JS, Muñoz N, Herrero R et al. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002; 185:324-31.
104. Castle PE, Escoffery C, Schachter J et al. Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotropic virus type 1 are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 575-80
105. García-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, Gonzalez CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* 2005; 117: 629-37.
106. Lacey JV Jr, Swanson CA, Brinton LA et al. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 2003; 98:814-21.
107. Calle EE, Rodríguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-38.
108. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16.563 women with cervical carcinoma and 33.542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;119 (5): 1108-24.
109. Hinkula M, Pukkala E, Kyyrönen P, Laukkanen P et al. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *British Journal of Cancer* 2004; 90:1025-1029.
110. Schiells TS, Falk RT, Herrero R, Schiffman M et al. A case-control study of endogenous hormones and cervical cancer. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 146-152.

111. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002; 359: 1085-92.
112. Molden T, Nygard JF, Kraus I, Karlsen F. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by Prelect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int. J. Cancer* 2005; 114: 973-976.
113. Sotlar K, Stubner A, Diemer D. Detection of high-risk human papilloma virus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-Polimerasa chain reaction. *Journal of medical virology* 74:107-116 (2004).
114. Cuschieri K et al. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence, implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol*. 2004 May; 73 (1): 65-70.
115. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001; 285: 2995-3002.
116. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N , Hanson EN et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004; 364: 1678-1683
117. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review: *Int J Gynaecol Pathol* 1993; 12(2): 86-192.
118. MG, Abdul-Karim FW, Dale G, Sorensen K, Huang YT (1990). Outcome in mild and moderate cervical dysplasias related to the presence of specific human papillomavirus types. *Mod Pathol*. 3, 679-683.
119. Nobbenhius MAE, Meijer CJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK, et al. Addition of high risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001; 84: 796-801.
120. Spitzer M, Apgar B, Brotzman G. Management of histologic abnormalities of the cervix. *Am Fam Physiann* 2006; 73: 105-12.

121. Wright TC, Cox JC, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001. Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189 (1): 295-30.
122. Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto LI, García S, Campo E, Pahisa J, Ordi J. High-risk CIN 1 treated by loop electrosurgical excision procedure: follow-up and value of HPV testing. *Am J Obstet Gynecol* 2007.
123. Guo M, Lin Ch, Gong Y, Cogdell D, Zhang W, Lin E, Sneige N. Human papillomavirus genotyping for eight oncogenic types can improve specificity of VPH testing in women with mildly abnormal pap results. *Mod Pathol*. 2008; 21(8):1037-1043.
124. Lawrence R, Johnson MD, Cindi R, Palmer J, Taylor J, et al. A comparison of two methods to determine the presence of high-risk HPV cervical infections. *Am J Pathol*. 2008;130 (3): 401-408.
125. Ducatman BS, Wang HH: Cervical neoplasia screening in the new millennium. United States and Canadian Academy of Pathology. 2004 Annual Meeting.
126. Nanda K, Mc Crory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132: 810-819.
127. Geisinger KR, Vrbin C, Grzybicki DM, Wagner P, Garvin AJ. Interobserver variability in human papillomavirus test results in cervicocytologic specimens interpreted as atypical squamous cells. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128 (6): 1010-1014.
128. Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM. Performance of thinprep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol* 2003;90:137-144.
129. Shingleton HM, Patrick RL, Johnston WW, Smith RA. The current status of Papanicolau smears (review). *Cancer J Clin*. 1995; 45:305-20.
130. Vassilakos P, Schwartz D, De Mayal F, Yousfi L, Broquet G, Mathez Loic F, et al. Biopsy-based comparison of liquid-based, thin layer preparations to conventional Pap smears. *J Reprod Med*. 2000;45:11-6.

131. Weintraub J, Morabia A. Efficacy of liquid based thin layer method for cervical cancer. Screening in a population with a low incidence of cervical cancer. *Diagn Cytopathol.* 2000; 22:52-9.
132. Guidos BJ, Selvagi SM. Use of Thin Prep Pap Test in clinical practice. *Diagn Cytopathol.* 1999;20:70-3.
133. Hartmann KE, Nanda K, Hall S, Myes E. Technologic advances for evaluation of cervical cytology is newer better? *Obstet Gynecol Surv.* 2001;56:765-74.
134. Cibas ES, Alonzo TA, Austin MR, Bolick DR, Henry M et al. The MonoPrep Pap Test for the detection of cervical cancer and its precursors: Part I: Results of a Multicenter Clinical Trial. *Am J Clin Pathol* 2008; 129 (2): 193-201.
135. Berstein SJ, Sánchez Ramos L, Ndubidi B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and simple adequacy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:308-17.
136. Uyar DS, Eltabbakh GH, Sharon LM. Positive predictive value of liquid-based and conventional cervical Papanicolaou smears reported as malignant. *Gynecol. Oncol* 2003; 89: 227-32.
137. Coste J, Cochand-Priollet B, Cremoux P, le Gales C, Cartier I, Molinié V, et al. Cross sectional study of conventional cervical smear, monolayer cytology and human papillomavirus FDNA testing for cervical cancer screening. *BMJ.* 2003; 326:1-5.
138. Davey E, Barrat A, Irwig L, Chang SF, Macaskill P, Mannes P, Saville M. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet* 2006; 367; 122-132.
139. ACOG. Hunter MI, Holschneider CH. Uptodate in Obstetrics, Gynecology and Women's Health. October 2003.
140. Sarode R, Werner C, Gander R, Foster B, Fulmer A, et al. Reflex human papillomavirus DNA testing on residual liquid-based (TPPT tm) cervical samples. *Cancer cytopathology* 2003;99 (3): 149-155.

141. Castle P, Solomon D, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, et al. Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer Cytopathology* 2003; 99 (2): 89-96.
142. Puig-Tintoré . Neoplasia intraepitelial del cérvix. Diagnóstico, tratamiento y seguimiento. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. SEGO. Cabero Roura L. Ed Med Panamericana 2003. ISBN 84-7903-755-5. Cap 189, 1544-1558.
143. Walker P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F. et al . de Nomenclature Committee of the IFCCP. International Terminology of Colposcopy: un updated report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol.*2003; 101: 175-7.
144. Torné A. Hallazgos anormales. Cambios menores y mayores. En Puig-Tintoré L.M y Andia Ortiz D. (Editores). Patología del tracto genital inferior y colposcopia, en España 2005. Editado por Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia. ISBN 84-609-7825-7.200:27-31.
145. Mitchell MF, Tortorelo-Luna G, Cook E, Whittaker L, RhodesMorris H, Silva E. A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electro-surgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* 1998; 92 (5): 737-44.
146. Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekoussis T, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, et al. The up-to-date evidence of colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: The Cochrane colposcopy&cervical ctoathology collaborative group (C5 group) approach. *Cancer Treat Rev.* 2006;32:516-23.
147. Alameda F, Carreras R. Histopatología, citopatología, inmunohistoquímica y determinación del virus papiloma humano. En *Virus del Papiloma humano y cáncer de cuello de útero*. ISBN:978-84-9835-101-9. Ed panamericana 2007.
148. Koss LG, Melamed MR, editores. In *Koss´diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5ª ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2006. p.282-394, 395-421.

- 149.** Solomon D, Nayar R , editores. The Bethesda system for reporting cervical cytology. Definitions, criteria and explanatory notes. 2^a ed. Nueva York: Springer Verlag, 2004.
- 150.** Arbyn M, Buntinx F, Van M, Paraskevaidis E et al. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia.. J Natl Cancer Inst. 2004; 96:280-93.
- 151.** Bosch FX, Rohan T, Schneider A, et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. Journal of clinical pathology. 2001;54 (3): 163-175 .
- 152.** Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. A systematic review of the role of human papillomavirus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. British Journal of Cancer. 2000; 83 (5): 561-565.
- 153.** Bosch FX, Cuzick J, Schiller JT, Garnett GP, Meheus A, Franco EL, Wright TC. Vacunas VPH y cribado en la prevención del cancer de cuello uterino. Vaccine. 2006; 24 (3). ISSN 0264-410X.
- 154.** Aho J, Kornegay JR, Healey S, Roger M, Dion F, Gaudreault D, Shepard AP, Franco EL, Coutlée F. Evaluation of a convenient enzyme immunoassay to assess the quality of genital specimens submitted for the detection of human papillomavirus DNA by consensus PCR. J Clin Virol. 2004 Feb; 29 (2):127-33.
- 155.** Ciotti M, Sesti F, Paba P, Benedetto A, Patrizi L, Criscuolo A, Piccione E, Branca M, Syrjänen K, Favalli C. Human papillomavirus (HPV) testing in the management of women with abnormal Pap smears. Experience of a colposcopy referral clinic. Eur J Gynaecol Oncol. 2004; 25.
- 156.** Rodríguez MA. Técnicas actuales de determinación del virus papiloma humano. Curso de formación. VPH y cáncer del tracto genital inferior. GlaxoSmithKline 2007. 99-118.
- 157.** Alba A.. Oncogénesis e inmunología de la infección por el VPH. GlaxoSmithKline 2007. 23-27.
- 158.** Evans MF, Mount SL, Beatty BG, Cooper K, Phil D. Biotinyl-Tyramide-based In situ hybridization signal patterns distinguish HPV type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. Mod. Pathol. 2002; 15(2): 1339-47

159. Hopman ANH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FCS. HPV in situ hybridization: impact of different protocols of the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* 2005; 115: 419-428
160. Guo, M, Gong Y, Deavers M, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Luthra R, Lin E, Cheng H, Zhang W, Sneige N. Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detection of HPV DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1): 274-80
161. 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. *Gynecol Oncol* 2005; 99: S7-S11.
162. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:946-949.
163. Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto LI, Campo E, Pahisa J, Ordi J. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 631-36.
164. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid Capture I HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J.Clin Virol* 2002 Dec; 25 Suppl 3: s89-97
165. Lonky NM, Felix J, Tsadik GW, Lonky S. False negative hybrid capture II results related to altered adhesion molecule distribution in women with atypical squamous cells pap smear results and tissue based human papillomavirus positive high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Low genital tract dis* 2004 Oct; 8(4): 285-91
166. Monsonego J, Bohbot JM, Pollini G, et al. Performance of the Roche Amplicor human papillomavirus (HPV) test in prediction of the cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 160-68.

- 167.** Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (2): 367-372.
- 168.** Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M, Quint W. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999 Aug; 37 (8):2508-17.
- 169.** Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, Lloveras B, Evans D, Coutlée F. International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar; 41(3):1080-6.
- 170.** Van Hamont D, Van Ham MA, et al. Evaluation of the SPF10-INNO LIPA Human Papillomavirus (HPV) genotyping test and the Roche Linear Array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol .* 2006; 44: 3122-129.
- 171.** Kay P, Meehan K, Williamson AL. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods.* 2002 Aug;105(1):159-70.
- 172.** Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch pathol Lab Med.* 2003 Aug; 127 (8): 940-5.
- 173.** Cuschieri KS, Seagar AL, Moore C, Gilkison G, Kornegay J, Cubie HA. Development of an automated extraction procedure for detection of human papillomavirus DNA in liquid based cytology samples. *J Virol Methods.* 2003 Jan;107(1):107-13.
- 174.** Coutlée F, Rouleau D, Petignat P, Ghattas G, Kornegay JR, Schlag P, Boyle S, Hankins C, Vézina S, Coté P, Macleod J, Voyer H, Forest P, Walmsley S; Canadian Women's HIV study Group, Franco E. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with

- PGMY primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):1998-2006.
175. Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2025-31.
 176. Sabol I, Salakoya M, Smahelova J, Pawlita M, Schmitt M, Gasperov NM, Grce M, Tachezy R. Evaluation of different techniques for identification of human papillomavirus types of low prevalence. *J Clin Microbiol.* 2008 May;46(5):1606-13. Epub 2008 Mar 5.
 177. Schmitt M, Bravo IG, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 504-12.
 178. ALTS group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1383-92.
 179. Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K. Evaluation of p16^{INK4a} expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16^{INK4a} assay. Correlation with biopsy follow-up results. *Cancer Cytopathology* 2007; 111 (2): 83-92.
 180. Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson D. The predictive value of p16^{INK4a} and Hybrid Capture 2 Human Papillomavirus testing for High-Grade cervical intraepithelial neoplasia . *Anatomic Pathology* 2004;122: 894-901.
 181. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, Doeberitz MK. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology. Use of qualitative assessment of p16^{INK4a} positive cells to identify patients with High-Grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Cytopathology* 2007; 111 (1): 58-66.
 182. Nieh S, Chen S, Chu T, Lai H, Lin Y, Fu E, Gau CH. Is p16^{INK4a} expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; 97:35-40.

183. Bibbo M, Klump W, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16^{INK4a} antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytologica* 2002;46:25-29.
184. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. P16^{INK4a} as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol.* 2003; 25 (1): 8-11.
185. Chen S, Yang S, Chu T, Lai H, Lin Y, Bai C, Nieh. Wich test is a better strategy to determine the outcome of atypical glandular cell-categorized Pap smears? Immunocytochemical p16^{INK4a} expression or human papillomavirus test- a retrospective cohort study. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 578-584.
186. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16^{INK4a} is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. An immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:187-193.
187. Trunk MJ, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Petry KU et al. Morphologic characteristics of p16^{INK4a} – positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytologica* 2004; 48 (6): 771-782.
188. Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, Moeneclaey LM et al. P16^{INK4a} as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. *Int J Cancer*; 2004 (108): 871-876.
189. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer Cytopathol*; 2004; 102 (2): 100-108.
190. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, Egarter-Vigl E. P16^{INK4a} expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004; 445: 616-620.
191. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, Becattini V, Cariaggi MP, Pontenani G et al. Role of P16^{INK4a} expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer Cytopathology* 2006; 108 (2): 119-123.

- 192.** Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeir J, Suarez H, et al. P16 overexpression identifies HPV positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30 (11): 1347-56.
- 193.** Alameda F, Fusté P, Boluda S, Ferrer L, Baró T, Mariñoso ML, et al. The ki-67 labelling index is not a useful predictor for the follow-up of CIN-1. *J Low Gen Tract Dis.* 2004; 8 (4):313-6.
- 194.** Longatto A, Utagawa ML, Kasumi N, Miranda SM et al. Immunocytochemical expression of p16^{INK4a} and Ki-67 in cytologically negative and equivocal Pap Smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24 (2): 118-124.
- 195.** Castle P, Dockter J, Giachetti C, Garcia F.A, McCormick MK, Mitchell A.L, Holladay E.B, Kolk D. P. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (9): 2599-2605.
- 196.** Agostisni A, Benmooura D, Blanc B, Khiri H, Penaranda G, Halfon P. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS/LSIL/HSIL women using the NuclisensR EasyQR HPV assay. Ponencia EUROGIN 8th International Multidisciplinary Congress. Niza (Francia) 12-15 Noviembre 2008.
- 197.** Narimatsu R, Patterson BK. High-through put cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am.J.Clin.Pathol* 2005; 123: 716-23.
- 198.** González S. P, Henríquez A, Sainz de la Cuesta R. Relación entre el resultado del HPV-Oncotect, las alteraciones citológicas, los factores de riesgo y el genotipo viral determinado por PCR en pacientes peri y postmenopáusicas. *Ginecología y Obstetricia Clínica* 2008; 9 (3): 181-186.
- 199.** Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, Schiffman M, Peyton CL. Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2. *Am J Clin Pathol* 2004; 22: 238-45.
- 200.** Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskeva E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: A systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 232-246.

201. Van der Graaf, Molijin Ac, Doornewaard H, Quint WGV, van Doorn LJ, van den Tweel J. Human papillomavirus and the long-term risk for cervical neoplasia. *Am J Epidemiol* 2002; 156 (2): 158-64.
202. Rousseau MC, Pereira JS, Prado JCM, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus types as a predictors of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis* 2001; 184: 1508-17.
203. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347:1645-51.
204. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103: 519-24.
205. Martin-Hirsch PL, Paraskevaidis E, Kitchener H, Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database System Rev* 1999; 3 [Art N° CD001318.DOI.]
206. Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006; 118(8):2048-55.
207. NHS. Colposcopy and programme management: guidelines for the NHS cervical screening programme. NHSCSP; 2004. Publication N°20.www.cancerscreening.nhs.uk.
208. ACOG Practice Bulletin, Number 66. Management of abnormal cervical cytology and histology. Clinical management guidelines for the Obstetrician and Gynecologist; 2005.
209. Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001; 75 (3): 1565-70.
210. Bousarghin L, Touzé A, Sisarte PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 2003; 77: 3846-50.

- 211.** Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV 16 L1 major capsid protein. *J Cell Biol Chem* 2002; 277 (26): 23958-64.
- 212.** Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl1): S7-15.
- 213.** Conger KL, Liu J-S, Kuo S-R, Chow LT, Wang TS-F. Human Papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 1999; 274 (5) : 2696-705.
- 214.** Penrose KJ and McBride AA. Proteasome- mediated degradation of the papillomavirus E2-TA Protein is regulated phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 2000; 74 (13): 6031-8.
- 215.** Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53- dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; 275 (1): 87-94.
- 216.** Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF et al. Identification of a G2 arrest domain in the E1-E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2002; 76 (19) : 9806-18.
- 217.** Wang Q, Griffin H , Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 2004; 78 (2): 821-33.
- 218.** Raj K , Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1-E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 2004; 78 (13): 7199-207.
- 219.** Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
- 220.** Hausen H. Papillomaviruses causing Cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Review. *JNCI* 2000; 92 (9): 690-8.
- 221.** Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* 2002; 76 (21): 10914-20.

- 222.** Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, et al . Human Papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *J Biol Chem* 2004; 279 (34): 35664-370.
- 223.** Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89:213-28.
- 224.** Gu Z, Matlashewski G. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J virol* 1995; 69 (12): 8051-6.
- 225.** Elhamidi A, A Hamoudi RA, Kocjan G, Du M-Q. Cervical intraepithelial neoplasia: prognosis by combined LOH analysis og multiple loci. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 671-9.
- 226.** Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000; 19:1-5.
- 227.** Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results for a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 293-299.
- 228.** Massad LS, Collins YC, Mayer PM: Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol* 2001; 82 (3): 516-22.
- 229.** KPNC. Kaiser Permanente Northern California
www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00435214.
- 230.** Cuzick J, Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Perryman K, Ho L, Terry G, Sasieni P, Dina R, Soutter WP. Long-term follow-up of HPV testing: Results from the Hammersmith study. *Int J Cancer.* 2008; 122: 2294-2300.
- 231.** Klaes R, Benner A, Friedrich T. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26: 1389-1399.
- 232.** Murphy N, Ring M, Killalea AG. P16INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 2003; 56: 56-53.

- 233.** Nieh S, Chen S, Chu T, Lai H, Fu E. Expression of p16INK4a in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2003; 91: 201-208.
- 234.** Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel DM. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer Cytopathol.* 2005; 105(6): 461-467.
- 235.** Alameda F, Fusté P, Albert S, Romero E, Gimferrer E et al. Citología en medio líquido (Thin Prep Pap Test). Un año de experiencia. *Prog Obstet Ginecol.* 2007; 50 (4): 197-202.
- 236.** Puig-Tintoré LM, Alba A, Bosch FX, Castellsagué X, Coll C, Cortés X, et al. La infección por Papilomavirus. Documento de consenso de la SEGO, SEC y AEPC. Documentos de consenso SEGO 2002. Madrid: Ed. Meditex-Sanex 2003. p. 41-104 (SIN: 1138-6185).
- 237.** Wentzensen N, Hampl M, Herket M, Reichert A et al. Identification of high-grade cervical dysplasia by detection of p16INK4a in cell lysates obtained from cervical samples. *Cancer.* 2006; 107 (9): 2307-13.
- 238.** Silva Aycaguer LC. Excursión a la regresión logística en ciencias de la salud. Diaz de Santos. Madrid.
- 239.** Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006; 119: 1095-101.
- 240.** Weaber MG, Abdul-Karim FW, Dale G, Sorensen K, Huang YT. Outcome in mild and moderate cervical dysplasias related to the presence of specific human papillomavirus types. *Mod Pathol* 1990; 3: 679-683.
- 241.** Mount S, Harmon M, Eltabbakh G, Uyar D, Leiman G. False positive diagnosis in conventional and liquid-based cytology specimens. *Acta Cytol* 2004; 48:363-71.
- 242.** Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Kehoe S, Flannelly G, Mitrou S, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Management of minor cervical

cytological abnormalities: a systematic review and a meta-analysis of the literature. *Cancer treatment reviews* 2007; 33: 514-520.

243. Matthews KS, Rodney PR, Case AS, Estes JM, Straughn M, Huh WK. Técnica diagnóstica de extirpación electroquirúrgica con asa para la resolución de discrepancia. ¿ predicen los factores preoperatorios la presencia de neoplasia cervical intraepitelial significativa ? . *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2007; 11(2): 69-72.
244. Chirenje ZM. HIV and cancer of the cervix: *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2005;19:269-76.
245. Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Hakama M, Tarkkanen J, Martikainen J, Toivonen T et al. Randomized evaluation trial on automation-assisted screening for cervical cancer: results after 777,000 invitations. *J Med Screen.* 2007; 14: 23-8.
246. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of displasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:252-8.
247. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskeva E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2006; 367 (11): 489-498.
248. Alba A. Diagnóstico molecular. La infección por VPH. Ed. BYPASS ediciones. M-52746-2006.
249. Von Knebel-Doerberitz M, Syrjäen KJ. Molecular Markers: How to apply in practice. *Gynecol Oncol* 103 (2006) 18-20.
250. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16INK4A as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population- based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1355-60.
251. Carozzi F, Venturini G, Bisanzi S, Confortini M, Visioli C. Evaluation of HPV E6/E7 m RNA, p16 expression and viral load in predicting CIN 2-3 lesions. *HPV today* 2008; 16: 10-11.
252. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn L. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S43-S51.

- 253.** De Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 453-59.
- 254.** Hildesheim A, Herrero R, Castle PE et al . HPV co-factors related to development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001; 84: 1219-26.
- 255.** Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1093-101.
- 256.** Clifford G, Rashida K.R, Franceschi S, Smith J.S, Gough G, Pimenta J.M. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (5): 1157-1164.
- 257.** Romanczuk H, Villa L, Schlegel R, Howley PM. The viral transcriptional regulatory region of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus 16 and 18. *J Virol* 1991; 65: 2739-44.
- 258.** Herrington CS. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol* 1999; 189 (1): 1-3.
- 259.** Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16,18,31,33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (4) : 1310-7.
- 260.** Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer* 2004; 90 (7): 1407-13.
- 261.** Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R et al. DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005;97 (3): 908-15.
- 262.** Horvath CA, Boulet G, Sahebali S, Depudt C, Vermeulen T, Vanden Broeck D, et al. Effects of fixation on RNA integrity in a liquid-based cervical cytology setting. *J Clin Pathol* 2008; 61 (1):132-7.

- 263.** Powell N, Smith K, Fiander A. Recovery of human papillomavirus nucleic acids from liquid-based cytology media. *J Virol Methods* 2006; 137 (1): 58-62.
- 264.** Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Human Pathol.* 2005; 36: 1101-1107.
- 265.** Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. P16 INK4a immunochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26 (11): 1389-1399.
- 266.** Cai B, Ronnett B.M, Stoler M, Ferenczy A, Kurman R, Sadow D, Alvarez F, Pearson J, Sings HL, Barr E, Liaw K-L. Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(12): 1854-1860.
- 267.** Puig Tintoré LM, Torné A, Alonso I. Current techniques in screening for cervical cancer in Spain: updated recommendations. *Gynecol Oncol* 2008 ; 110: S8-S10.
- 268.** Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkman NW, van Tellingen JE, Meijer CJ, Snijders PJ. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer.* 2008 Nov 11;124(2):381-386.
- 269.** Bulkman J, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJP, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RHM ,van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJF, Meijer CJLM . Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *The Lancet*, Volume 370, Issue 9601, 24 November 2007-30 November 2007, Pages 1764-1772.
- 270.** Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Karl-Ulrich P, Szarewski A, Munk C, de Sanjosé S, Naucler P, Lloveras B, Kjaer S, Cuzich J, Van Ballegooijen M, Clavel C, Iftner T. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: Joint European Cohort Study. *Br Med J.* 2008; 13: 337

- 271.** Wright TC, Schiffman MA, Solomon D, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 304-9.
- 272.** Puig-Tintoré LM, Castellsagué X, Torné A, de Sanjosé S, Cortés J, Roura E, Méndez C, Bosch X. Coverage and factors associated with cervical cancer screening: Results from the AFRODITA study: A population-based survey in Spain. *Journal of lower genital tract disease*. 2008; 12 (2): 82-89. ASCCP.
- 273.** Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell, G, Elfgrén K, Radberg T, Strander B, Forslund O, Hansson B, Hagmar B, Johansson B, Rylander E, Dillner. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *JNCI, Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101(2):88-99;doi:10.1093/jnci/djn444
- 274.** Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJ, Meijer CJ. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*. 2007 Nov 24;370(9601):1764-72.
- 275.** Kitchener HC, Almonte M, Wheeler P, Desai M, Gilham C Bailey A, Sargent A, Peto J. On behalf of the ARTISTIC Trial Study Group. HPV testing in routine cervical screening: cross sectional data from the ARTISTIC trial. *British Journal Cancer*. 2006; 95: 56-61.
- 276.** Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco E. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357 (16): 1579-1588.
- 277.** Ronco G, Segnan N. HPV testing for primary cervical cancer screening *The Lancet*, 2007 ; 370 (9601): 1740-1742.
- 278.** Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, Minucci D, Naldoni C, Rizzolo R, Schincaglia P, Volante R, Zappa M, Zorzi M, Cuzick J, Segnan N; New Technologies for Cervical Cancer Screening Working Group. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology

as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Apr 2;100(7):492-501.

- 279.** Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, Raifu A.O, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Paraskeva E. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ* 2008; 18; 337 a 1284.
- 280.** Stoler MH, Schiffman M. Atypical squamous cells of undetermined significance-low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS) group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study. *JAMA* 2001; 285: 1500-5.