



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Genética y Microbiología

“Infección por el virus del papiloma humano en mujeres con lesión intraepitelial cervical: aspectos virológicos y clinicopatológicos”

Antonio Moreno Docón

2014



D. Manuel Segovia Hernández, Catedrático de Universidad del Área de Microbiología Clínica del Departamento de Genética y Microbiología,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Infección por el virus del papiloma humano en mujeres con lesión intraepitelial cervical: aspectos virológicos y clinicopatológicos”, realizada por D. Antonio Moreno Docón, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Genética y Microbiología, y que presenta para la obtención del grado de doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Noviembre de 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Manuel Segovia Hernández'.

Manuel Segovia Hernández



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Facultad de
Biología

D. Francisco José Murillo Araujo, Director del Departamento de Genética y Microbiología, informa:

Que la Tesis Doctoral titulada “Infección por el virus del papiloma humano en mujeres con lesión intraepitelial cervical: aspectos virológicos y clinicopatológicos”, ha sido realizada por **D. Antonio Moreno Docón**, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Manuel Segovia Hernández, Catedrático de Universidad del área de Microbiología clínica, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, 21 de noviembre de 2013



A mis padres, a mi suegro *In memoriam*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al director de esta tesis doctoral, el Dr. Manuel Segovia Hernández, por su confianza y apoyo para que este proyecto iniciado hace unos años, no fáciles en sus inicios, pudiera tener el final esperado. Debo reconocer, que su ímpetu para que iniciara un proyecto de investigación, me hizo tener serias dudas a cerca del tema de investigación de esta tesis, pero creo haber respondido a sus expectativas y espero no haberle defraudado.

Hay tantas personas a las que tengo que agradecer su apoyo incondicional, que espero no olvidarme de ninguna de ellas.

Al todo el Servicio de Anatomía Patológica, que en los primeros inicios en el año 2007 con el VPH, fuimos a la par en el diagnóstico virológico y citológico, “algo difícil en los tiempos que estamos”, gracias al Dr. Bermejo y Dr. Sola, por vuestras enseñanzas, profesionalidad y sobre todo por vuestra amistad, creo que personas como Juan y Joaquín hacen todavía más grande su Servicio. A todos los compañeros de Anatomía (Enrique, Belén,...) que siempre me han recibido muy bien, pero en especial a Amparo Torroba, que siempre ha estado dispuesta a colaborar y ayudarme en todo lo que he necesitado, gracias Amparo por ser como eres.

Al Servicio de Ginecología del Hospital General Universitario Reina Sofía, a su Jefe de Servicio, Dr. Meseguer, al que tengo que agradecer especialmente su gran interés para que este proyecto iniciara el camino y actualmente sigamos trabajando conjuntamente en el “VPH”, gracias Paco por tu ayuda, pero sobre todo por tu gran fortaleza y tu amistad.

Que voy a decir de mis compañeras y amigas, Carlota, Elena y Ana “VIP VPH”, que tanto me han ayudado en el conocimiento de la patología cervical. Estoy enormemente agradecido por vuestra disposición en todo lo que he necesitado, además de haber compartido tantos momentos de reflexiones personales y profesionales, pero también de alguna cervecita que otra. Gracias por vuestra amistad y apoyo constante.

A todo el personal del Servicio de Microbiología, pero muy en especial a la Unidad de Virología donde se ha realizado este trabajo. A mi compañera Asun, por mantener la calma y la tranquilidad en momentos difíciles durante estos años, por sus consejos en determinadas situaciones y últimamente por sus ayudas informáticas que me bloqueaban de vez en cuando. Gracias por todo.

Este trabajo no hubiera sido posible, sin la ayuda incondicional de los técnicos del laboratorio de Virología, pero muy en especial de Pascui e Isa o Isa y Pascui, inseparables desde mis inicios en este hospital y que han sabido siempre estar a la altura. Siempre os estaré agradecido por vuestra máxima implicación en todos los proyectos que se han iniciado en el laboratorio, nunca tuve un mal gesto, me habéis mostrado lo importante que es confiar en “tus técnicos”, por eso no me ha sorprendido vuestra ayuda en este trabajo. Muchas gracias por hacerme las cosas fáciles.

Espero no olvidarme de nadie,,, pero desde luego no de mi familia.

A mi mujer, Toñi, que siempre ha estado a mi lado y nunca me ha reprochado nada. Por su ilusión y apoyo constante, por sus ánimos en momentos de flaqueza y sobre todo por creer en mí. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A mi pequeña María y a mi adolescente Pilar, por darme las fuerzas suficientes para poder seguir adelante. No olvidaré a mi pequeña María, cuando me decía “Papi, la hora de la tesis”, sin saber muy bien que era eso, pero entendiendo lo importante que era para mí. A mi adolescente Pilar, toda una mujer, que a pesar de su pequeña rebeldía propia de la edad, siempre ha estado pendiente de mí, valoro mucho tu gran constancia y espero que puedas cumplir todos tus sueños.

Gracias por demostrarme vuestro cariño y amor.

Por último, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los hospitales de la región de Murcia que han participado en este proyecto y que continúan colaborando con nosotros.

ACOG	Asociación Americana de Ginecología y Obstetricia
ACS	Asociación Americana del Cáncer
ADC	Adenocarcinoma
AEPCC	Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia
AGC	Células glandulares atípicas
AIS	Adenocarcinoma “in situ”
AR	Alto riesgo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCCP	Asociación Americana de Patología Cervical y Colposcopia
ASC-H	Células escamosas atípicas no excluye una lesión de alto grado
ASCP	Asociación Americana de Patólogos Clínicos
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado incierto
BR	Bajo riesgo
CCI	Carcinoma cervical invasivo
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CEC	Carcinoma escamoso de cérvix
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical
CIS	Carcinoma “in situ”
CO	“Cut-off”
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E “early” (genes)	Genes de expresión temprana
E2F	Factor de transcripción E2F
E6AP	Proteína asociada a E6
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FDA	“Food and Drug Administration”
HC2	Captura de híbridos 2ª generación

HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
HSV-2	Virus <i>Herpes simplex</i> tipo 2
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ICO	Instituto Catalán de Oncología
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus
IFCPC	Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia
ITS	Infección de transmisión sexual
KDa	Kilodalton
L “late” (genes)	Genes de expresión tardía
LCR	Región larga de control
LLETZ	Excisión con asa de diatermia de la zona de transformación
MCM	Proteína de mantenimiento microsomal
mdm2	Proteína “ <i>mouse double minute-2</i> ”
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NILM	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Fragmento de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pg	Picogramos
pRB	Proteína del retinoblastoma
RLU	Unidades relativas de luz

rpm	Revoluciones por minuto
SEGO	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
TBS	Terminología del sistema de Bethesda
TLR	Receptores Toll-like
UAH	Universidad de Alcalá de Henares
UGA	Unidad ginecológica de apoyo
UPC	Unidad de patología cervical
URR	Región reguladora no codificante
USPSTF	“U.S. Preventive Service Task Force”
VLP	Partículas similares a virus
VPH	Virus del papiloma humano
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WHO	Organización Mundial de la Salud

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Breve reseña histórica	3
2. Virus del papiloma humano. Características generales.....	4
2.1.- Clasificación de los papilomavirus	4
2.2.- Estructura genómica del virus	7
2.3.- Clasificación epidemiológica del riesgo oncogénico	12
2.4.- Oncogénesis viral	15
2.4.1.- Mecanismo de regulación del ciclo celular	17
2.4.2.- Nuevos conceptos en la carcinogénesis por VPH	21
2.5.- Inmunología de la infección: interacción virus-huésped.....	23
3. La infección por el virus del papiloma humano	25
3.1.- Historia natural de la infección	25
3.2.- Prevalencia de la infección a nivel mundial	31
3.3.- Cáncer de cuello uterino: prevalencia y mortalidad	35
3.4.- Estrategias de prevención del cáncer del cuello uterino	38
3.4.1.- Prevención primaria: vacunación.....	38
3.4.2.- Prevención secundaria: protocolos de cribado	41
3.4.3.- Actualización de guías consenso de cribado.....	42
3.5.- Tratamiento de las lesiones intraepiteliales cervicales	46
3.5.1.- Métodos escisionales y destructivos.....	46
3.5.2.- Seguimiento postratamiento de lesiones	49
4. Métodos utilizados para el diagnóstico de cáncer de cérvix	50
4.1.- Métodos basados en el diagnóstico citológico	50
4.2.- Métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos	55

4.2.1.- Métodos de amplificación de secuencias diana.....	57
4.2.2.- Métodos de amplificación de señal.....	60
4.3.- Detección de marcadores de progresión oncogénica.....	61
4.3.1.- Detección de la proteína <i>p16INK4a</i>	61
4.3.2.- Detección de la expresión de los genes E6/E7	62
II. OBJETIVOS	65
III. MATERIAL Y MÉTODOS	69
Pacientes y muestras clínicas utilizadas en el estudio	71
Análisis estadístico del estudio	74
1. Estudio de prevalencia de la infección y genotipos de VPH en mujeres con lesión intraepitelial cervical	76
1.1.- Detección de ADN de VPH mediante captura de híbridos	77
1.1.1.- Fundamento	77
1.1.2.- Realización del ensayo	77
1.1.3.- Interpretación de resultados	79
1.1.4.- Controles de calidad	79
1.2.- Detección y tipado de VPH mediante PCR <i>microarray</i>	80
1.2.1.- Fundamento	80
1.2.2.- Realización del ensayo	81
1.2.3.- Interpretación de resultados	83
1.2.4.- Controles de calidad	84
2. Estudio comparativo de la técnica de captura de híbridos frente a la técnica de PCR-<i>microarray</i>	85
2.1.- Captura de híbridos	85
2.3.- PCR <i>microarray</i>	86
2.3.- PCR hibridación reversa	86

2.3.1.- Fundamento	86
2.3.2.- Realización del ensayo	87
2.3.3.- Interpretación de resultados	89
2.3.4.- Controles de calidad	90
2.4.- PCR secuenciación	91
3. Evaluación de dos biomarcadores de progresión oncogénica, marcador citológico (p16/Ki-67) y virológico (ARNm E6/E7)	93
3.1.- Técnica de inmunocitoquímica (Anatomía patológica).....	94
3.1.1.- Método de tinción p16 ^{ink4a} /Ki-67	94
3.2.- Método de detección de ARNm de E6/E7	95
3.2.1.- Fundamento	95
3.2.2.- Realización del ensayo	96
4. Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante conización por lesión cervical de alto grado.100	
4.1.- Diseño del estudio: selección de pacientes.....	100
4.2.- Control y seguimiento de pacientes.....	100
IV. RESULTADOS	103
1. Estudio de prevalencia de infección y genotipos de VPH en mujeres con lesión intraepitelial cervical	105
1.1.- Infección y genotipos de VPH según resultado citológico.....	105
1.2.- Infección y genotipos de VPH por rangos de edad.....	115
1.3.- Infección y genotipos de VPH por áreas sanitarias	118
2. Evaluación del método de PCR <i>microarray</i> frente a la técnica de captura de híbridos	121
2.1.-Resultados de concordancia entre los métodos estudiados....	121
2.2.-Resultados de discrepancias entre los métodos estudiados...	123

2.3.-Resultados de los métodos confirmatorios utilizados.....	124
3. Evaluación de dos biomarcadores de progresión oncogénica, marcador citológico (p16/Ki-67) y marcador virológico (ARNm E6/E7)	127
3.1.- Resultados de concordancia entre los métodos evaluados....	128
3.2.- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.....	129
3.3.- Estudio de discrepancias observadas en citologías ASCUS...	130
3.4.- Estudio de discrepancias observadas en citologías LSIL	131
4. Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante escisión con asa de diatermia por lesión cervical de alto grado	132
4.1.- Infección por VPH en mujeres con enfermedad residual.....	134
4.2.- Evaluación del test de VPH y la citología como marcadores pronósticos de enfermedad residual	135
4.2.1.- La detección de VPH como marcador pronóstico.....	135
4.2.2.- El estudio citológico como marcador pronóstico.....	137
V. DISCUSIÓN	139
VI. CONCLUSIONES	167
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	171

I. INTRODUCCIÓN

1- Breve reseña histórica

El concepto de que una enfermedad infecciosa (viral) participe en la génesis de ciertos procesos oncogénicos es de aceptación relativamente reciente, si bien hace ya casi más de un siglo que se gestó. En 1908, Ellerman observó como una determinada leucemia que afectaba a las aves era capaz de transmitirse de un animal a otro, como si de un agente infeccioso se tratara, y en 1964, Epstein y Barr observaron partículas virales pertenecientes a la familia herpesvirus en células linfoblásticas de linfoma de Burkitt.

La primera constatación de que el cáncer de cuello de útero tenía un posible origen infeccioso fue la observación, en 1842, de que el cáncer de cuello de útero se presentaba en mujeres casadas en Florencia, pero era excepcional entre las monjas de los monasterios de la ciudad (Scotto y Bailar, 1969). Analizando retrospectivamente, este patrón de comportamiento ya reflejaba la existencia de un agente transmisible por vía sexual. Es más, durante algún tiempo, el virus del *Herpes simplex* tipo 2 e incluso *Chlamydia trachomatis* fueron propuestos como posibles agentes causales del carcinoma de cuello de útero (Vonka y col., 1987). A partir de la década de los 70 se hizo patente la estrecha relación entre la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y las lesiones escamosas intraepiteliales e invasivas cervicales, relación principalmente basada en datos epidemiológicos.

A partir de finales de los 80 y sobre todo en la década de los 90, la causalidad se fundamentó no sólo desde un punto de vista epidemiológico, sino sobre sólidas bases biológicas (Yee y col., 1985; Pirisi y col., 1987). El conocimiento de que un virus de transmisión sexual es el agente causal del cáncer de cuello de útero ha proporcionado una nueva dimensión clinicoepidemiológica y social a dicha patología.

En el año 2008 se le concedió el premio Nobel en Medicina al Dr. Harald zur Hausen por sus investigaciones relacionadas con el mecanismo de la carcinogénesis producida por el VPH, los factores que predisponen la persistencia viral y la transformación celular.

2- Virus del papiloma humano (VPH). Características generales

Los virus de papiloma humano son virus de ADN de doble cadena y de pequeño tamaño (aproximadamente 8000 pares de bases) que han convivido con la especie humana durante decenas de milenios presentando pocos cambios en su composición genética.

El VPH representa una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en la población. Se han identificado más de 150 tipos de VPH que pueden clasificarse según su tropismo cutáneo o mucoso. Los genotipos cutaneotrópicos se aíslan frecuentemente en verrugas cutáneas y plantares, en lesiones cutáneas en pacientes con epidermodisplasia verruciforme, en pacientes inmunodeprimidos postrasplante y en algunos tumores epiteliales. Los genotipos mucosotrópicos se identifican en lesiones neoplásicas no sólo de cuello de útero sino también de otras localizaciones (vagina, vulva, ano y pene). Ocasionalmente, estos tipos virales se aíslan en tejidos y lesiones malignas de la cavidad oral, orofaringe, laringe y esófago.

2.1.- Clasificación de los papilomavirus

Históricamente el VPH se incluía en la familia *Papovaviridae*, de la que también formaban parte los Poliomavirus y el virus vacuolizante de los simios (SV40), debido a que todos ellos son virus desnudos con ADN circular de doble hélice y cápside esférica. Estudios posteriores demostraron que son muy diferentes en el tamaño de su genoma y la organización del mismo, con la excepción de una pequeña homología en su antígeno T y genes E1 (Rebrikov y col., 2002). El comité internacional para taxonomía de los virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) ha reconocido y separado oficialmente a los miembros de la antigua familia *Papovaviridae* en dos familias distintas *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* (de Villiers y col., 2004).

Dentro de la familia *Papillomaviridae* existen virus que afectan a diferentes animales vertebrados. Además, la mayoría de los papilomavirus (y entre ellos el VPH) tienen especificidad celular, y solo afectan a células del epitelio escamoso, cutáneas o mucosas, dando lugar solo a lesiones proliferativas de origen epitelial. Solo los papilomavirus bovinos 1 y 2 han demostrado tener capacidad para infectar células mesenquimales y de transmitirse entre varias especies.

Hasta la fecha, existen más de 200 tipos de VPH, de los cuales al menos 150 tipos virales se han aislado y caracterizado mediante la secuenciación de ADN de la región L1 del genoma viral, región bien conservada en todos los papilomavirus (Bernard, 2005).

La clasificación actual del VPH se basa en las diferencias de las secuencias de nucleótidos dentro de las regiones codificadoras de las proteínas E6, E7 y L1 (de Villiers y col., 2004). Se define un nuevo tipo viral cuando la secuencia de la región L1 difiere más de un 10% del tipo conocido más similar. Las diferencias entre un 2% y un 10% definirían un subtipo, y las inferiores al 2%, una variante.

Hasta la fecha se han descrito al menos tres aislamientos que cumplen la definición de subtipo: VPH 46, 55 y 64. Con respecto a las variantes, existe un número limitado para cada tipo de VPH y presentan una divergencia máxima cuando pertenecen a grupos étnicos diferentes. El mejor ejemplo para las variantes lo constituye el tipo VPH 16, del cual se conocen cuatro variantes ampliamente estudiadas en su distribución mundial y en su relación con la neoplasia cervical invasora: E (Europea), As (Asiática), AA (Asiática-Americana) y Af (Africana) (Villa y col., 2000).

El estudio de la secuencia genómica de los VPH, además de servir para clasificarlos en tipos, también se utiliza para hacer grupos taxonómicos en función de las similitudes de dicha secuencia. De esta manera, se define un *género* como un conjunto de tipos de VPH que comparten al menos el 60% de la secuencia de la región L1. Dentro de un género hay varias *especies*, y en cada una de ellas se distinguen varios tipos de VPH, que guardan entre un 60 y 70% de similitud en la secuencia

de L1. Dentro de cada especie, asimismo, existen varias subespecies, que incluyen tipos de VPH que comparten entre un 71% y un 91% de la secuencia de L1.

La clasificación en géneros es útil, ya que agrupa virus relacionados filogenéticamente, pero biológicamente distintos. A su vez, la especie reúne tipos virales próximos no solo en su filogenia, sino también en sus propiedades biológicas y patogénicas. El género clínicamente más importante es el *Alpha-papillomavirus*, que contiene la mayoría de los VPH asociados con lesiones mucosas y genitales (figura 1).

Dentro del género *Alpha-papillomavirus* existen diferentes especies, destacamos la especie 7 que incluye el VPH 18 y la especie 9 que incluye el VPH 16.

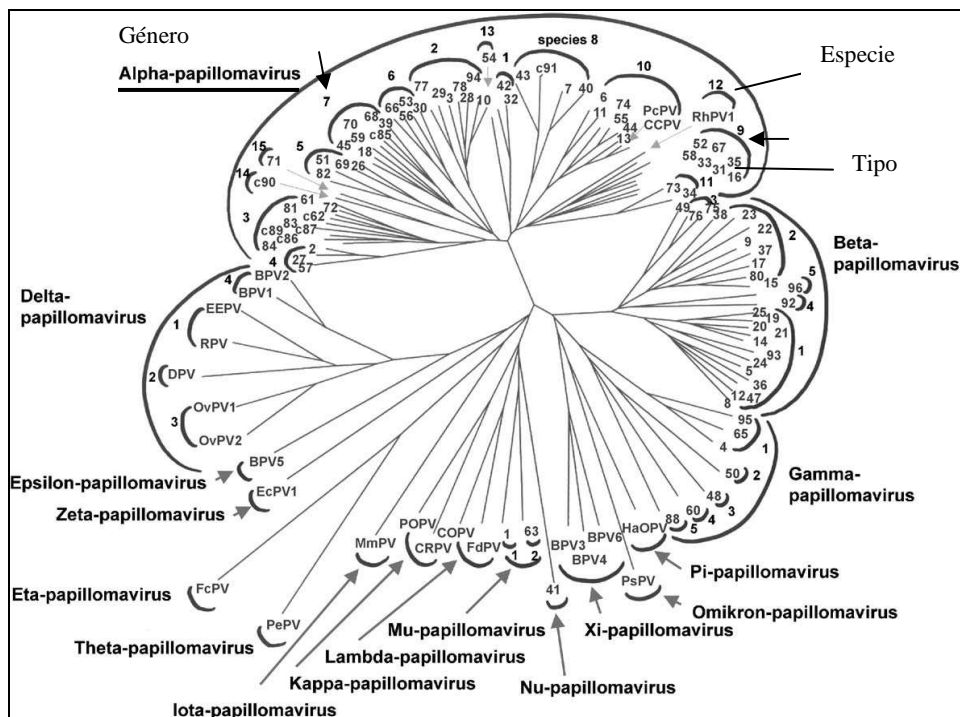


Figura 1. Clasificación filogenética del VPH (modificado de Villiers y col., 2004)

2.2.- Estructura genómica del virus

El virus del papiloma humano es un pequeño virus de ADN de doble cadena circular de 7.900 pares de bases. Las partículas virales son proteínicas y carecen de envoltura (virus desnudo), siendo muy estables a condiciones adversas del medio externo y con capacidad de infección duradera. Tienen un diámetro de 55-60 nm, con una cápside viral que consta de 72 capsómeros ordenados de forma icosaédrica (Baker y col., 1991)

Las secuencias codificadoras de las proteínas se encuentran en una única hebra de ADN y se denominan como tempranas o tardías, indicando el momento de su expresión en el ciclo celular. La hebra simple codificadora del ADN viral del VPH tipo 16, el más conocido, se puede dividir en tres regiones (Stanley, 2012) (figura 2):

- Región temprana (E, *early*), contiene 8 fragmentos de lectura abierta (ORF, *open reading frames*), responsables de la regulación de la replicación viral e incluso algunos de estos genes tienen potencial transformador (E6, E7)
- Región tardía (L, *late*), consta de dos genes (L1-L2) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cápside viral.
- Región no codificante (LCR, *long control region*) o también denominada URR (*upper regulatory region*), que no codifica proteínas, pero contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales.

La región temprana representa aproximadamente un 45% del genoma viral, la tardía un 40% y un 5% la región no codificante.

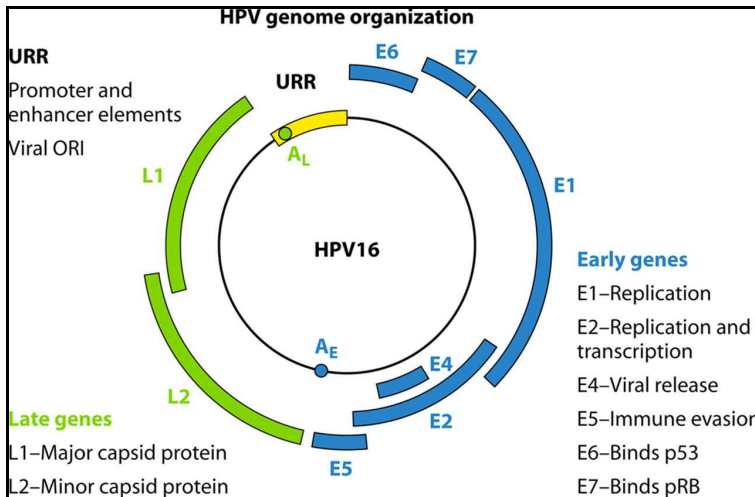


Figura 2. Organización genómica del VPH 16 (Stanley, 2012)

Actualmente, de los numerosos tipos de papilomavirus que se han detectados, unos 100 tipos han sido completamente secuenciados y caracterizados. La clasificación de los distintos genotipos de VPH se basa en diferencias en la secuencia nucleotídica del ADN.

Mientras que los genes de expresión temprana (E) difieren notablemente en la secuencia entre los diferentes tipos de VPH, los genes de expresión tardía (L) presentan notables similitudes entre ellos. Esta particularidad convertirá a estos genes, especialmente a L1 (proteína mayor de la cápside), en la diana principal de la detección de ADN viral por los métodos “consenso”, al contrario de la detección “tipo específica” que utilizará los genes con alta variabilidad intertipo como E6 y E7 (Bosch y col., 2002).

Características y funciones de las proteínas de VPH

Elementos genómicos no codificadores:

- Región larga de control (LCR) o región reguladora no codificante (URR): tiene un tamaño de unos 1.000 pb. No codifica proteínas pero contiene elementos cis necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales (Muñoz y col., 2003)

Proteínas tempranas:

- **E1:** Tiene un tamaño entre 68-85 kDa. Es una proteína multimérica con actividad ATPasa y ADN helicasa, reconoce y está unida al origen de replicación del ADN viral formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas, ADN polimerasa y proteínas de la célula huésped (Conger y col., 1999). Esta proteína es necesaria para la replicación del ADN viral y el control de la transcripción.
- **E2:** Tiene un tamaño de 48 kDa. Es el principal regulador de la transcripción de los genes virales, se une al promotor transcripcional viral como un dímero. Además E2 reprime a los promotores p97(VPH 16) y p105 (VPH 18), encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7 (oncogenes virales), reduciendo la síntesis de las mismas. Interfiere en la síntesis de la proteína p53, lo que produciría finalmente la detención del ciclo celular en G1 y apoptosis (Webster y col., 2000)
- **E3:** Es una proteína cuya función no se conoce, sólo está presente en algunos tipos de VPH (IARC, 2005)
- **E4:** Se fusiona con regiones de E1 formando la proteína mixta E1-E4 de 10-44 kDa. Interviene en el ciclo celular en G2, a través de la unión a ciclinas y quinasas dependientes y por bloque de E7, alterando el soporte estructural del citoesqueleto produciendo daño mitocondrial y apoptosis (Raj y col., 2004)
- **E5:** Tiene un tamaño de 14 kDa. Se localiza principalmente en la membrana citoplasmática de la célula huésped, interactuando con algunos factores de proliferación celular (EGF, PDGF). Inhibe la apoptosis y la migración del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a la superficie celular (Campo, 2005)
- **E6:** Proteína de 16-18 kDa. Induce la síntesis de ADN, activa la actividad de la telomerasa, interactúa e interfiere con la función

de numerosas proteínas celulares. La unión de E6 de VPH de alto riesgo a p53 conduce a la degradación de ésta última; en ausencia de p53 los reguladores negativos del ciclo celular no se expresan y la proliferación celular sigue incluso en condiciones inadecuadas, lo que conduce a mutaciones y anomalías cromosómicas (IARC, 2005; Campo, 2005).

- **E7:** Proteína de 10 kDa. Induce a la proliferación celular no programada; interactúa con factores de transcripción y enzimas remodeladoras de cromatina; activa los reguladores positivos del ciclo celular e inhibe reguladores negativos y supresores de tumores, principalmente p105Rb causando su degradación y la activación consiguiente de genes celulares involucrados en la replicación del ADN. (IARC, 2005; Campo, 2005).

Hay que destacar que los genes E6 y E7 de VPH 16/18 son considerados como potentes oncogenes virales ya que sus productos interactúan con numerosas proteínas celulares, induciendo proliferación celular e inmortalización y transformación maligna de las células infectadas (Munger y col., 2002). Una constante actividad de las oncoproteínas E6 y E7, durante la infección viral, provoca una inestabilidad cromosómica severa, la acumulación de mutaciones en oncogenes, pérdida del control de crecimiento celular y finalmente cáncer (Duensing y col., 2004).

- **E8-E2C:** recientemente se ha descrito una nueva proteína de la fusión de un pequeño ORF E8 con parte de la proteína E2. Tiene un tamaño de unos 20kDa y es capaz de reprimir la replicación del ADN viral así como su transcripción, por ello se cree que juega el papel más importante en el mantenimiento de la latencia viral observada en las células del epitelio infectado (Hiller y col., 2004)

Proteínas tardías:

- **L1:** Proteína de 57 kDa. Es la proteína mayor de la cápside viral, se autoensambla en capsómeros y cápside, interactúa con L2; interactúa con receptores de la célula.
- **L2:** Proteína de 43-53 kDa. Es la proteína menor de la cápside viral, interactúa con el ADN; se cree que facilita el ensamblaje del virión; puede interactuar con receptores de las células.

Las características y funciones principales de las proteínas del virus se muestran de forma resumida (tabla 1).

Tabla 1. Funciones de las proteínas del VPH

Proteína	Funciones
E1	Replicación de ADN viral y control de la transcripción
E2	Principal regulador de la transcripción de los genes virales. Reprime a los promotores encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7.
E3	No conocida
E4	Detiene el ciclo celular
E5	Induce proliferación celular; inhibe la apoptosis y la migración de complejos MHC a la superficie celular.
E6	Induce la síntesis de ADN y evita la diferenciación celular
E7	Induce a la proliferación celular no programada
L1	Proteína estructural mayor. Interacción con receptores celulares
L2	Proteína estructural menor. Facilita el ensamblaje de viriones

2.3.- Clasificación epidemiológica del riesgo oncogénico

Actualmente se considera que existen más de 150 tipos diferentes de VPH, con distintas variantes y subtipos, y que según su capacidad oncogénica, es decir su capacidad de establecer infecciones persistentes y promover la proliferación celular alterando el ADN de las células huésped, se clasifican en tipos de alto riesgo, probable alto riesgo y de bajo riesgo oncogénico (Muñoz y col., 2006). El paradigma de los primeros lo constituyen los VPH 16 y 18, si bien se han descrito hasta 15 tipos más, mientras que el paradigma de los VPH de bajo riesgo son los tipos 6 y 11 (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación epidemiológica de VPH según riesgo oncogénico (Muñoz y col. 2006)

Clasificación epidemiológica	Tipos de VPH
Alto riesgo	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59
Probable alto riesgo	26,53,66,68,73,82
Bajo riesgo	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81,CP6108

Los distintos tipos de VPH se pueden clasificar también según su tropismo por los epitelios cutáneos o genitales. Existen unos 40 tipos genitales, que se subdividen a su vez, en función de su capacidad para producir cáncer de cuello de útero, en tipos de alto y bajo riesgo oncogénicos. Entre los tipos de alto riesgo, los tipos 16 y 18 son responsables del 70% de los casos de cáncer cervical a nivel mundial (Clifford y col., 2003; Schiffman y col., 2007), mientras que entre los tipos de bajo riesgo, los tipos 6 y 11 son responsable de hasta el 90% de los condilomas acuminados (Vandepapeliere y col., 2005; Lacey, 2005).

Los tipos VPH de bajo riesgo son aquellos que presentan un riesgo muy bajo de lesiones neoplásicas y están asociados a lesiones condilomatosas o verrugas genitales, además de papilomatosis respiratoria recurrentes en niños y adolescentes (Armstrong y col., 1999). Los tipos 6 y 11 son responsables de hasta el 90 % de todos estos casos.

Los tipos de alto riesgo 16, 18, 31 y 45 son los tipos más frecuentes encontrados en lesiones de alto grado y en el cáncer cervical invasor (Cliffort y col., 2003).

La mayoría de los casos de cáncer de cérvix son carcinomas escamosos de cérvix (CEC), mientras que los adenocarcinomas son menos frecuentes (ADC). Los carcinomas escamosos están más relacionados con el VPH 16 y otros tipos relacionados filogenéticamente (31, 35 y 52), mientras que los adenocarcinomas se asocian más con el VPH 18 y tipos relacionados (39, 45 y 59).

La tabla 3 resume la clasificación filogenética y epidemiológica de los papilomavirus anogenitales.

Tabla 3. Clasificación filogenética y epidemiológica de los tipos de VPH del tracto anogenital (Modificada de Muñoz y col., 2006)

ESPECIE VPH (alfa)	GENOTIPO	RIESGO	ESPECIE VPH (alfa)	GENOTIPO	RIESGO
9	VPH 16	Alto	10	VPH 6	Bajo
	VPH 52	Alto		VPH 11	Bajo
	VPH 67	Indeterminado		VPH 13	Bajo
	VPH 33	Alto		VPH 74	Indeterminado
	VPH 58	Alto		VPH 44	Bajo
	VPH 31	Alto		VPH 55	Indeterminado
	VPH 35	Alto			
11	VPH 34	Indeterminado	13	VPH 54	Bajo
	VPH 73	Prob.Alto			
7	VPH 18	Alto	3	VPH 61	Bajo
	VPH 45	Alto		VPH 72	Bajo
	VPH 59	Alto		VPH 62	Indeterminado
	VPH 70	Bajo		VPH 81	Bajo
	VPH 39	Alto		VPH 83	Indeterminado
	VPH 68	Prob.Alto		VPH 89	Bajo
	VPH 85	Indeterminado		VPH 84	Indeterminado
5	VPH 26	Prob.Alto	4	VPH 57	Indeterminado
	VPH 69	Indeterminado		VPH 2	Indeterminado
	VPH 51	Alto		VPH 27	Indeterminado
	VPH 82	Prob.Alto			
6	VPH 30	Indeterminado	8	VPH 91	Indeterminado
	VPH 53	Prob.Alto		VPH 7	Indeterminado
	VPH 56	Alto		VPH 40	Bajo
	VPH 66	Prob.Alto		VPH 43	Bajo
1	VPH 32	Indeterminado	2	VPH 28	Indeterminado
	VPH 42	Bajo		VPH 3	Indeterminado
15	VPH 71	Indeterminado		VPH 10	Indeterminado
	VPH 90	Indeterminado		VPH 29	Indeterminado
				VPH 77	Indeterminado

Prob.Alto: probablemente alto riesgo

Dentro del género *Alpha-papillomavirus*, hay cinco especies integradas totalmente por VPH de bajo riesgo y otros tipos indeterminados (especies 1, 3, 4, 8 y 10). Sin embargo, un VPH que es sin duda de bajo riesgo por su características oncogénicas, el VPH 70, se encuentra dentro de una especie donde predominan los VPH de alto riesgo, la especie 7. Por lo tanto, las características filogenéticas no pueden predecir si un virus es de alto o bajo riesgo, debe existir una asociación del virus con el desarrollo de la enfermedad (Lacey y col., 2006).

2.4.- Oncogénesis viral

La mayoría de los procesos oncogénicos humanos se rigen por un conjunto diferenciado de principios genéticos y bioquímicos, en los que la alteración de un número limitado de vías celulares serían suficientes para inducir la transformación maligna. Las células que presentan un fenotipo maligno “adquieren capacidades” que permiten un crecimiento descontrolado sin inhibición, evasión de la apoptosis, inmortalización, estimulación independiente y angiogénesis (Hahn y col., 2002; Bocchetta y col., 2004).

El papel causal del VPH en el cáncer de cuello uterino ha sido firmemente establecido tanto desde el punto de vista biológico como epidemiológico (Zur Hausen, 1996; Muñoz y col., 2006).

El VPH es un virus altamente epiteliotropo, solo puede causar infecciones productivas en los epitelios estratificados de la piel, tracto anogenital y la cavidad oral. Su ciclo vital está ligado a la diferenciación de la célula epitelial infectada. La infección viral se inicia en las células del estrato basal, a las que accede a través de una leve abrasión o microtrauma, generalmente a nivel del introito vaginal.

No ha sido aún identificado el receptor específico que permite la unión inicial de virus a las células, aunque existen evidencias que sugieren que tanto la familia de las integrinas α -6 como el heparán sulfato pueden jugar un cierto papel (Evander y col., 1997). Recientes trabajos sugieren que la internalización de los viriones es un proceso lento y que ocurre mediante la endocitosis de vesículas recubiertas de clathrina (Day y col., 2003; Culp y col., 2004). Dentro de las vesículas de endocitosis se va a desarrollar el desencapsulamiento del virus y la posterior liberación del ADN viral, proceso donde interviene la proteína menor de la cápside viral (Doorbar y col., 2006).

Los papilomavirus humanos, al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse y cuando alcanzan las células basales pueden permanecer en ellas en forma episomal (no integrado en la célula), en estado latente, o bien abandonar esa latencia y aprovechar la maduración celular propia del epitelio cervical. De este modo, paralelamente a la maduración del epitelio cervical, los VPH expresarán sus genes de forma secuencial: en primer lugar, los genes tempranos (E1-E8), en las capas basales, y posteriormente sus genes tardíos (L1 y L2), en las capas superficiales del epitelio más diferenciado, formarán la cápside y permitirán el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo (Doorbar y col., 2012) (figura 3).

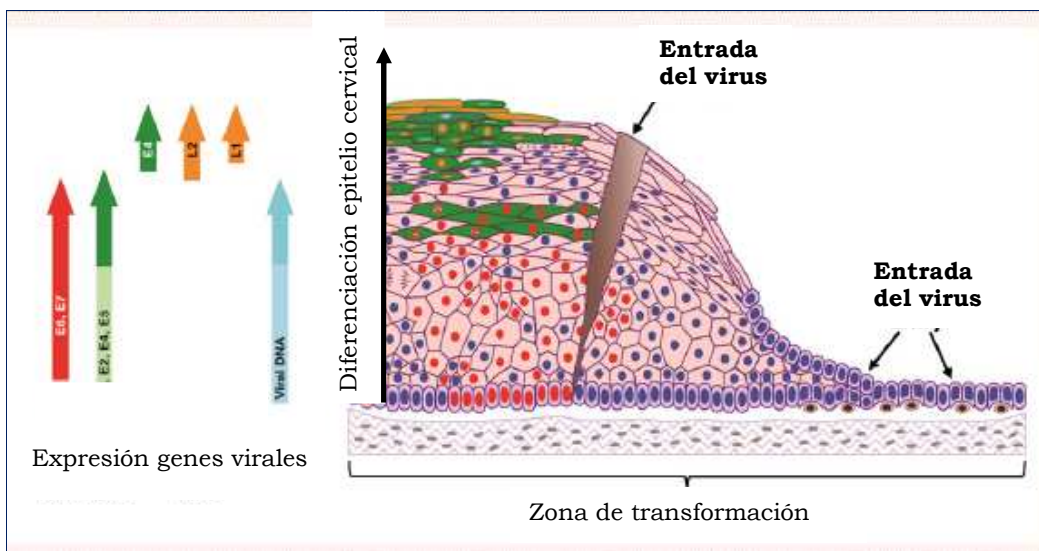


Figura 3. Modelo biológico de expresión de los genes de VPH de alto riesgo en células del epitelio cervical (modificado de Doorbar y col., 2012)

Los papilomavirus están perfectamente adaptados a su huésped natural, la célula epitelial en vías de diferenciación de la piel o las mucosas, y activan la maquinaria celular en beneficio propio (Lowy y col., 2001).

2.4.1.- Mecanismo de regulación del ciclo celular

El ciclo comienza cuando las partículas virales alcanzan, a través de pequeñas roturas, la capa basal del epitelio cervical escamoso y/o metaplásico de la zona de transformación, donde se unen a las células. Se ha sugerido que, para mantener la infección, el virus debe infectar una célula madre epitelial (Doorbar, 2005).

El genoma viral se replica a bajo nivel en la capa basal, y durante períodos variables de tiempo mantiene esta baja replicación en las células inicialmente infectadas pero que todavía son competentes y capaces de replicarse. Las proteínas E1 y E2 son esenciales para esta fase de replicación basal de ADN. Se ha especulado que durante la persistencia viral, el sistema inmunológico mantiene la infección en este estado (Doorbar 2005).

En determinadas circunstancias fisiológicas de permisividad inmunológica y tras un periodo de persistencia de la infección generalmente largo, las partículas de ADN viral que se encuentran en forma episomal (no integrado) sufren un proceso de integración dentro del genoma celular.

La integración del ADN viral al genoma celular es probablemente el evento crítico en la carcinogénesis cervical y éste siempre precede al desarrollo de anomalías cromosómicas (Pett y col., 2004). Una serie de acontecimientos ocurren durante este proceso de integración viral, destacando el bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y retinoblastoma, Rb). Como consecuencia, alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical seguidas de un acúmulo de errores genéticos (clastogénesis) que pueden ser la base de la transformación tumoral (Doorbar y col., 2012) (figura 4).

El estado físico del ADN del VPH dentro del núcleo de las células infectadas predice el curso biológico de la lesión cervical inducida por el virus. El ADN viral se encuentra en forma episomal en las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), mientras que en las lesiones de alto grado (HSIL) y en el cáncer invasor, se encuentra integrado formando parte del genoma celular (Cullen y col., 1991)

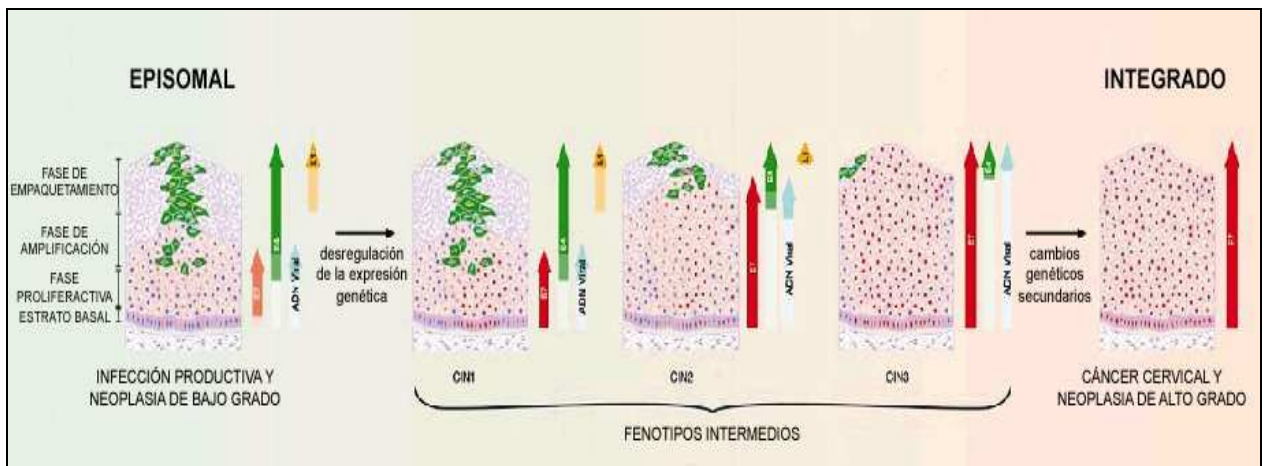


Figura 4. Modelos de expresión génica del VPH en el desarrollo del cáncer cervical (modificado de Doorbar y col., 2012)

La integración del ADN del VPH al genoma celular ocurre en cualquier lugar donde existe fragilidad cromosómica, es decir, no existe un locus específico de integración (Mincheva y col., 1987). Sin embargo, sí se conoce que durante la integración la secuencia genómica del VPH se interrumpe en la región E1/E2, esto hace que pierda su capacidad de actuar sobre la región control del genoma viral, responsable de que se mantenga reprimida la expresión E6/E7, aumentando así la expresión de estos genes transformantes (Thierry y col., 2004).

En el contexto de la carcinogénesis cervical, existe una compleja gama de interacciones entre los productos de los oncogenes virales E6/E7 con varias proteínas celulares de la célula huésped. Existen diferencias entre las proteínas E6/E7 de los tipos de VPH de alto y bajo riesgo, pero suele tratarse de diferencias de naturaleza cuantitativa más que cualitativas (Longworth y col., 2004). Hasta la fecha, las interacciones mejor caracterizadas se producen con las proteínas pRB y p53, las cuales constituyen moléculas fundamentales en el control del ciclo celular .

El producto del gen E6 de los VPH de alto riesgo (AR) interfiere con varias proteínas reguladoras del ciclo celular (Münger y col., 2002), la más conocida es la unión a la proteína celular E6AP que regula la transcripción en las células proliferantes, ocasionado una degradación proteolítica del gen p53 mediada por la ubiquitina. En las células no infectadas, la degradación de p53 mediada por ubiquitina se desencadena por la proteína mdm-2, mientras que en las células infectadas por VPH-AR, el complejo E6-E6AP reemplaza a mdm-2 en el control de los niveles celulares de p53.

La unión de E7 a la proteína pRB activa el factor de transcripción E2F, que desencadena la expresión de las proteínas necesarias para la replicación del ADN (Münger y col., 2004). En condiciones normales la fase S no programada conduciría a la apoptosis mediada por p53; sin embargo, en las células infectadas por VPH, este proceso se bloquea por la proteína viral E6, que provoca la degradación proteolítica de p53 (Thomas y col., 1999). Como consecuencia, se anula la dependencia del control del ciclo celular y se retrasa la diferenciación normal de los queratinocitos (Hiller y col., 2005) (figura 5)

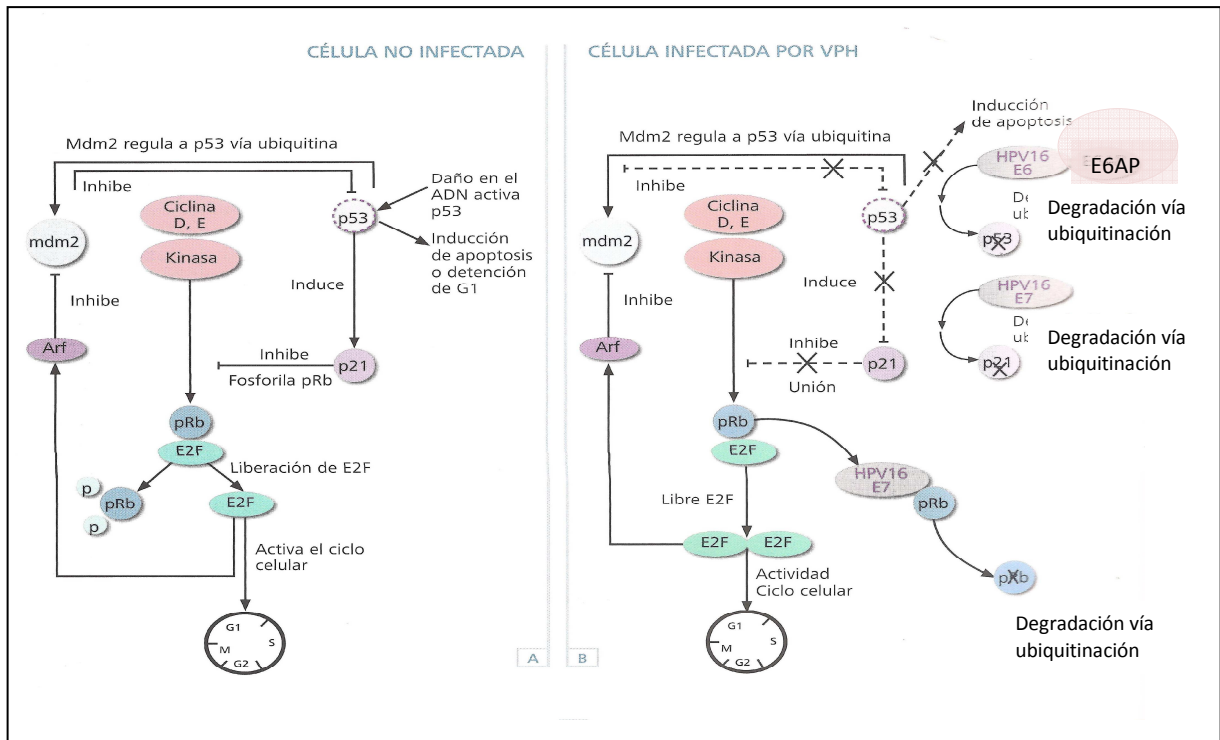


Figura 5. Proceso de regulación del ciclo celular. A) Célula epitelial no infectada. B) Célula infectada por VPH alto riesgo (Modificado de Hiller y col., 2005)

El proceso de bloqueo de p53 y Rb por los genes virales E6 y E7, conduce a una inmortalización celular, la célula no solamente es incapaz de eliminar el ADN viral, sino que también se ve imposibilitada para corregir errores intrínsecos al ADN celular, de modo que va acumulando alteraciones genéticas de forma progresiva y convirtiéndose en una célula con fenotipo neoplásico.

En condiciones normales, la expresión basal de E6 y E7 en los VPH es muy baja, ya que la proteína E2, por medio de la región reguladora URR, mantiene prácticamente silenciada la expresión de dichos genes (gen represor de E6/E7). En las infecciones con alta carga viral, en las que el sistema inmune no es capaz de eliminar la infección, tienen un riesgo más alto de transformación neoplásica. Sin embargo, se ha demostrado que ciertas infecciones persistentes con baja carga viral también pueden generar un fenotipo neoplásico.

2.4.2.- Nuevos conceptos en la carcinogénesis por VPH

Se considera que la carcinogénesis es consecuencia de infecciones persistentes por VPH de alto riesgo con una duración superior a 6 meses (Woodman y col., 2007). Sin embargo, el término **“infección persistente”** se define sólo de forma arbitraria y no incluye ningún criterio funcional que haga referencia a los eventos moleculares necesarios para el desarrollo de la carcinogénesis impulsada por el VPH. Aunque en la actualidad este término se utiliza ampliamente, es necesario diferenciar con una mayor claridad las fases clínicamente relevantes de las infecciones por VPH de alto riesgo desde una perspectiva molecular.

La expresión de genes virales durante una infección inicial por VPH sigue un patrón definido, que está estrechamente relacionado con la fase de diferenciación de las células escamosas epiteliales. La expresión y replicación de estos genes se produce sólo en células terminalmente diferenciadas de las capas celulares intermedias y superficiales (Longworth y col., 2004). Esta fase se denomina **“infección replicante”**.

Sin embargo, si se pierde el control de los genes virales en las células basales, los oncogenes virales E6 y E7 se expresan intensamente en células basales y parabasales con capacidad replicativa (Munger y col., 2004). Esto conduce a inestabilidad cromosómica y puede provocar la transformación de las células infectadas. Por consiguiente, esta última fase se denomina **“infección transformante”**.

Inicialmente, se creía que la integración del genoma viral era la responsable de la desregulación de expresión de los genes virales (Pett, 2006). Sin embargo, se ha observado que la integración se produce en algunos casos en una fase bastante avanzada del proceso oncogénico (Klaes y col., 1999) y en otros casos es indetectable en cánceres invasivos establecidos (Vinokurova y col., 2008).

La integración viral, en algunos estudios, sigue claramente a la inducción de inestabilidad cromosómica y aneuploidía (Melsheimer y col., 2004). Los acontecimientos descritos anteriormente sugieren de forma

contundente que todavía quedan por descubrir mecanismos moleculares que puedan explicar la desregulación de los genes E6-E7 en una fase más precoz en el proceso de cambio de infección replicante a transformante.

En comparación con las infecciones replicantes, que pueden producirse en muchas localizaciones epiteliales en hombres y mujeres, las infecciones transformantes se producen fundamentalmente en la zona de transformación uterina (unión del epitelio escamoso-cilíndrico). La transición de una infección replicante a una infección transformante, se acompaña de una sobreexpresión masiva del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas p16^{INK4a}. (figura 6)

Sin embargo, independientemente de la existencia o no de una asociación temporal entre la integración y la inestabilidad genética, el concepto actual de la carcinogénesis sugiere que la integración aporta a la célula una ventaja de crecimiento selectivo (von Knebel Doeberitz y col., 2002; Kalof y col., 2006). El lugar de integración viral es único para cada tumor y se mantiene sin cambios durante las distintas fases de expansión clonal (Negri y col., 2004).

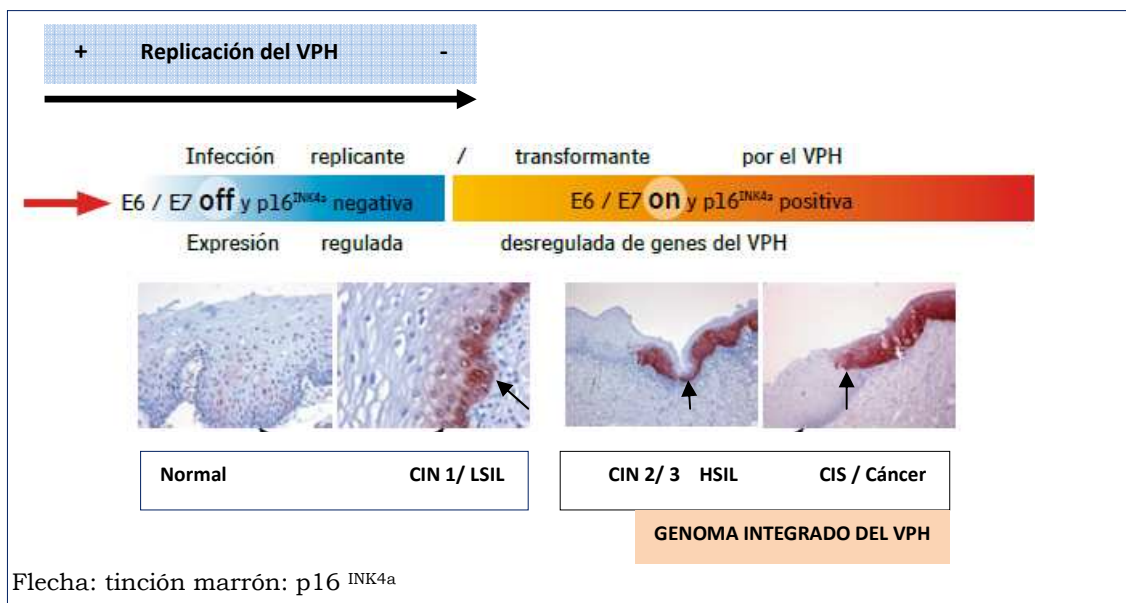


Figura 6. Representación esquemática de la progresión de infecciones replicantes a infecciones transformantes (modificado de von Knebel Doeberitz 2002)

2.5.- Inmunología de la infección: interacción virus-huésped

La interacción entre VPH y huésped es compleja y variada. En el caso del papilomavirus, no se ha encontrado un receptor celular específico que permita evitar la infección por bloqueo del mismo, además, diferentes estudios han demostrado que la molécula de superficie que sirve de unión a los VPH están muy conservada y parece tener otra serie de funciones celulares virales que hacen imposible su utilización como diana para el bloqueo de la infección. Al contrario de lo que ocurre con otros virus, no parece que los receptores de superficie estén implicados en la especificidad del tejido afectado ni en el tropismo de los VPH.

En términos generales, tras la primera infección de las células del epitelio cervical por VPH se desencadenan una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células natural killer (NK), anticuerpos naturales, e incluso del sistema de complemento, que formaran una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. La prolongación de la respuesta en el tiempo y la protección frente a futuras infecciones requiere, sin duda, mecanismos de inmunidad específica.

Una de las principales deficiencias de la inmunidad innata frente a la infección por VPH estriba en la ineficacia de las células presentadoras de antígeno como centinelas para el inicio de la respuesta inmune adaptativa (células dendríticas localizadas en la dermis y células de Langerhans en la epidermis y capas superficiales). Dicha tolerancia inmunológica radica en:

- ✓ La ausencia de expresión de proteínas virales en las capas basales y suprabasales del epitelio cervical (áreas de vigilancia de las células de Langerhans) ya que la producción de viriones (altamente inmunógenos) se produce en las capas superficiales del epitelio desprovistas de tales células presentadoras de antígenos.

- ✓ La falta de lisis celular durante el ciclo viral que impide la activación de las células dendríticas dérmicas y secundariamente la falta de respuesta linfocítica.

- ✓ Por otro lado en el reconocimiento antigénico juegan un papel clave los receptores Toll-like (TLR), grupo de receptores expresados primariamente sobre células del sistema inmune innato con capacidad de reconocer a agentes infecciosos y que se traduce en la expresión de múltiples productos proinflamatorios. Se ha demostrado que los oncogenes E6 y E7 del VPH 16 producen una baja expresión de TLR9 contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune (Hasan y col., 2007).

Se ha observado que en mujeres inmunocomprometidas las lesiones producidas por el VPH son más agresivas y se producen en un tiempo más corto, por tanto, uno de los factores que determinará la respuesta de un epitelio frente a un virus oncogénico como es el caso del VPH es la capacidad de dar una adecuada respuesta inmune por parte del huésped.

Los virus son parásitos intracelulares obligados, sin embargo manifiestan una fase extracelular en la que también son susceptible de ser neutralizados por el sistema inmunitario humoral. En esta fase, los virus sin cubierta, como el VPH, pueden ser bloqueados por anticuerpos específicos frente a los antígenos de la cápside.

De todas las proteínas del VPH, la proteína L1 es la mejor caracterizada en cuanto a la generación de respuesta inmunitaria. Anticuerpos específicos frente a la proteína L1, la proteína mayor de la cápside, son la mejor prueba de respuesta inmunitaria frente al virus. La detección de estos anticuerpos, a veces, no se observa hasta varios años después de la infección natural por VPH y no todos los sujetos expuestos generan esta respuesta. En cualquier caso, parece ser que sólo un 50-60% de mujeres desarrollan anticuerpos séricos tras la infección natural por VPH (Carter y col., 2008). En la actualidad, aún se desconoce la duración de la inmunidad adquirida de forma natural tras infección por VPH,

aunque probablemente será de varios años al igual que la conferida por la vacunación (Insinga y col., 2009)

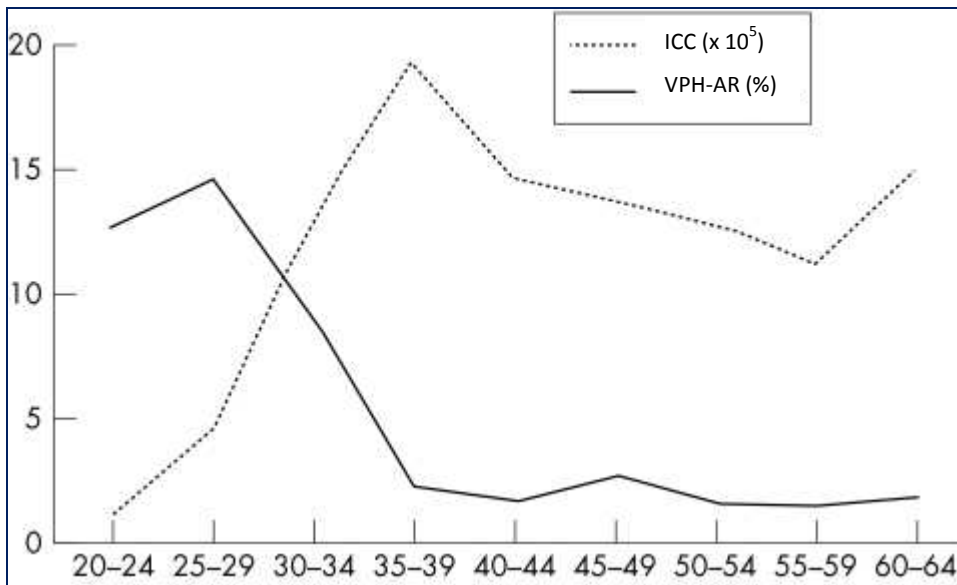
3- La infección por el virus del papiloma humano

El VPH representa la infección de transmisión sexual más frecuente. Su prevalencia es muy elevada en varones y mujeres jóvenes sexualmente activos, afectando en algunos casos hasta el 70% de individuos (Moscicki y col., 1998). En la tercera década de la vida la prevalencia disminuye, y a partir de los 35 años se mantiene estable en unos valores próximos al 5% (Myer y col., 2000).

La prevalencia de la infección por VPH en mujeres asintomáticas, varía entre el 2 y el 44% (Trottier y col., 2006).

3.1.- Historia natural de la infección

La prevalencia de la infección por VPH está asociada a la edad. Generalmente, la prevalencia es más alta en las edades inmediatas al inicio de las relaciones sexuales y responde al patrón de comportamiento sexual de la población. En las poblaciones donde el número de compañeros sexuales distintos y ocasionales es elevado, la prevalencia puede llegar hasta el 15 % en los grupos de 20 a 29 años de edad (figura 7). Este primer pico de prevalencia va seguido de una disminución muy marcada, de modo que en las edades intermedias (30-40 años) la detección viral se estabiliza a niveles entre el 3 y el 5%. Esta fracción representa el grupo de mujeres portadoras crónicas de la infección viral y del grupo de alto riesgo para la progresión neoplásica.



ICC: Incidencia de cáncer cervical (10^5) ajustado por edad
VPH-AR: Frecuencia de infección por VPH de alto riesgo (%)

Figura 7. Prevalencia de infección por VPH e incidencia de cáncer cervical por rangos de edad (modificado de Bosch y col., 2002)

En algunas poblaciones, se ha observado un segundo pico de prevalencia en las mujeres postmenopáusicas que podría reflejar la reactivación de una infección latente que hubiera pasado indetectable a lo largo de la vida y que se hace aparente en este momento asociada a la reducción fisiológica de la inmunidad natural en las mujeres de edad avanzada.

Las investigaciones longitudinales llevadas a cabo hasta la fecha han mostrado de forma consistente que la mayoría de las infecciones por el VPH son transitorias, pasando a no ser detectables al cabo de 1-2 años. Las infecciones por tipos del VPH de alto riesgo parecen persistir durante más tiempo que las producidas por tipos de bajo riesgo. Entre los tipos de alto riesgo, existe suficiente evidencia que el tipo 16 puede persistir durante más tiempo que los otros tipos (Trottier y col., 2006; Khan y col., 2005).

Una vez que el VPH ha contactado con las células basales de epitelio cervical a través de una pequeña erosión cervical, tienen lugar una serie de cambios histopatológicos, con una fuerte tendencia a la regresión y una muy baja a la progresión (Moscicki y col., 2004; Castle y col., 2005).

En la figura 8 se muestra las principales fases implicadas en el desarrollo de la carcinogénesis cervical: partiendo de la infección del epitelio metaplásico de la zona de transformación cervical por uno o varios tipos carcinogénicos, pasando por una fase de regresión de la lesión en la mayoría de los casos, en algunos casos de persistencia viral y en número reducido de casos que progresan a una lesión preneoplásica y finalmente en un proceso de invasión tisular. Aunque estas fases fundamentales para el desarrollo de la enfermedad se han establecido bien, cada una de ellas presenta matizaciones y cuestiones pendientes en relación a sus cofactores y a la respuesta inmunitaria del huésped.

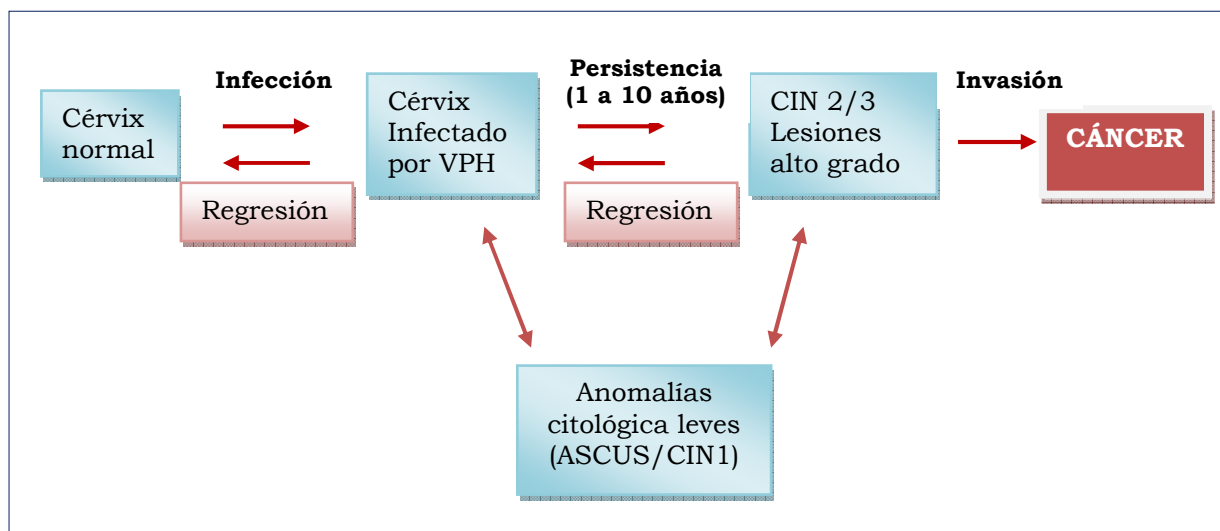


Figura 8. Fases del proceso de oncogénesis por VPH (modificado de Schiffman y col., 2003)

Las infecciones por tipos de alto riesgo siguen habitualmente un curso silente, tienden a establecer infecciones persistentes y generan alteraciones citológicas englobadas mayoritariamente en el grupo de las neoplasias cervicales (CIN, *cervical intraepitelial neoplasia*) de grado 1 (CIN1), o lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL, *low grade squamous intraepithelial lesion*). En una proporción menor, las infecciones por VPH de alto riesgo pueden progresar a lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (CIN2/3, HSIL, *high grade squamous intraepithelial lesion*) y a carcinoma cervical invasivo (CCI).

La lesión escamosa de bajo grado es consecuencia de la infección aguda por VPH. En ausencia de tratamiento, esta lesión remite a los 12 meses en un 61% en pacientes jóvenes y en el 91% a los 36 meses (Moscicki y col., 2004). La probabilidad de remisión es menor en edades más avanzadas (Nobbenhuis y col., 2001). Ostör en 1993 realizó una revisión de la infección por el VPH, en ella muestra que las lesiones CIN1 remiten en el 60% casos, persisten en el 30%, progresan a CIN3 en el 10% y al cáncer invasivo en el 1%.

Se acepta actualmente que la persistencia de la infección por VPH es esencial para el desarrollo de lesiones cervicales premalignas y cáncer. Se entiende como persistente una infección por VPH cuando es posible detectar el mismo tipo viral en dos o más ocasiones en un periodo de tiempo determinado. No existe consenso sobre cuál debe ser la duración de este periodo, y hay quienes entienden que se requieren al menos de 6 a 12 meses (Ho y col., 1998) y otros prolongan hasta dos años (Richardson y col., 2003). Esta es, sin embargo, una estimación aproximada que no tiene en cuenta que las infecciones por tipos de alto riesgo suelen ser más persistentes.

Aunque muchas mujeres contraen infección por el VPH, la mayoría de éstas no progresan a cáncer de cuello de útero. Por lo tanto, es probable que otros cofactores intervengan en la patogénesis de la infección. Los tres **grupos de cofactores potenciales son:**

- Cofactores medioambientales o exógenos, incluyendo anticonceptivos hormonales, hábito tabáquico, paridad y coinfección con otras ITS.
- Cofactores virales, como infección por tipos específicos, coinfección con otros tipos del VPH, variantes virales, carga viral e integración viral.
- Cofactores del huésped, incluyendo hormonas endógenas, factores genéticos y otros factores relacionados con la respuesta inmunitaria.

Se han publicado varias revisiones del papel de estos cofactores en la carcinogénesis cervical (Castellsagué y Muñoz 2003; Smith y col., 2002; Garcia-Closas y col., 2005).

Con respecto a los cofactores mediambientales, se ha observado que el tabaco aumenta el riesgo de progresión de la infección por VPH entre 2-4 veces frente a no fumadores. El tabaco tiene un efecto carcinogénico directo y además produce alteración de la inmunidad local en el cuello uterino, contribuyendo a la persistencia de la infección.

El consumo de anticonceptivos orales durante 10 años se asoció a un aumento en aproximadamente el doble de riesgo comparado con las mujeres que nunca habían usado anticonceptivos orales. Como hipótesis, se postula que los estrógenos y progestágenos pueden potenciar la expresión de genes del VPH en el cérvix a través de mecanismos mediados por receptores de progesterona y elementos de respuesta hormonal en el genoma viral.

La alta paridad se ha relacionado con un aumento de los casos de lesiones de alto grado CIN3 y cáncer de cérvix, se ha postulado que el mantenimiento durante muchos años de la zona de transformación en el exocérvix, puede facilitar la exposición al VPH, aunque podrían también estar implicados factores hormonales que lo justifiquen.

Los agentes de transmisión sexual más estudiados y para los que se ha demostrado alguna asociación con el cáncer de cérvix son *Chlamydia trachomatis*, virus *Herpes simplex 2* (VHS-2) y VIH. Es probable que el aumento del riesgo de cáncer asociado al VHS-2 y a *Chlamydia* se deba, al menos en parte, a la respuesta inflamatoria asociada a la generación de radicales libres y el desarrollo de inestabilidad genética (Castle y col., 2003). En el caso del VIH, el estado de inmunodeficiencia asociado, confirman la importancia de los cofactores inmunológicos del huésped en la carcinogénesis por el VPH.

La evidencia disponible hasta la fecha a favor de una asociación entre dieta, estado nutricional y carcinogénesis por VPH todavía no es convincente, aunque hay cierto respaldo para la hipótesis de que los nutrientes antioxidantes podrían desempeñar un papel protector en la carcinogénesis cervical (Casle y col., 2003).

Con respecto a los cofactores virales, el genotipo viral es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preneoplásica, siendo los genotipos 16 y 18 los que presentan mayor riesgo de progresar (Castellsagué y col., 2002). Por otro lado, se ha observado que además de los genotipos 16 y 18, el genotipo 45, tienen una integración más efectiva en el genoma celular, por lo que pueden desarrollar de forma más rápida una progresión a lesiones de alto grado (Vinokurova et al., 2008).

Las distintas variantes del VPH 16 se han relacionado con un mayor riesgo de cáncer, es posible que las mínimas variaciones en la secuencia de bases del ADN de estas variantes, permitan una evasión del sistema inmunológico del huésped y su progresión esté relacionada con polimorfismos genéticos (Grodzki y col., 2006).

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 para pronosticar la progresión a cáncer, ya que la presencia de una baja carga viral no debe ser excluyente de una lesión de alto grado (Clavel y col., 2001).

Con respecto a la importancia de la integración viral en la progresión neoplásica, algunos autores (Hudelist y col., 2004) apoyan la idea de que el VPH 16 es capaz de inducir la transformación maligna sin que haya integración, lo que indica que seguramente intervienen otros factores en dicho proceso. Es discutible, si la coinfección con varios tipos virales aumenta el riesgo de progresión, algunos autores (Molano y col., 2003) han evidenciado que la tasa de aclaramiento es independiente de la coinfección con otros tipos virales, al menos en mujeres inmunocompetentes. La evidencia reciente apunta a que los genotipos que coinfectan el cérvix actúan de forma independiente en el desarrollo de las lesiones cervicales.

En cuanto a los cofactores del huésped, la respuesta inmune es el principal mecanismo de resistencia frente al desarrollo de carcinomas, así como en la progresión de éstos. Las mujeres con inmunosupresión secundaria a la infección por VIH o trasplantadas con tratamiento inmunosupresor, tienen mayor riesgo de desarrollar carcinomas anogenitales asociados a VPH (Puig-Tintoré y col., 2006). En estas pacientes se ha comprobado a nivel cervical una disminución de linfocitos CD4, así como de células natural killer (NK), que facilitaría la integración de ADN viral del VPH (Cogliano y col., 2005).

3.2.- Prevalencia de la infección a nivel mundial

La infección genital por el VPH es la infección de transmisión sexual (ITS) más común entre las mujeres (Aral y col., 1999). El VPH infecta las áreas mucosas del cuello del útero, la vagina, la vulva, el ano y el pene. La detección de los tipos de VPH mediante técnicas de PCR presenta una gran variabilidad en la población general, según la edad y la situación geográfica, tal y como se ha puesto de manifiesto en un análisis combinado llevado a cabo por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) (Clifford y col., 2005) y de un metaanálisis de estudios publicados (De Sanjosé, 2006).

En mujeres asintomáticas de la población general, la prevalencia de infección por VPH oscila entre un 2% y un 44% (Trottier y Franco, 2006). Un metaanálisis reciente ha estimado la prevalencia del VPH en mujeres con resultados normales en la citología de Papanicolau a partir de datos procedentes de 78 estudios publicados (De Sanjosé, 2006).

La prevalencia global ajustada es del 10.41%, con una variabilidad regional considerable que varía desde un 8.08% en Europa hasta un 22.12% en África, si bien en este estudio no se disponía de datos referentes a Oceanía. De acuerdo con esta evaluación, el número estimado de mujeres en las cuales se detectó infección por VPH en un momento dado en todo el mundo es de 291 millones. Se estima que alrededor de 105 millones de estas infecciones serán debidas a los tipos 16 o 18.

El análisis combinado de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) utilizó el mismo método de PCR para evaluar muestras recogidas sistemáticamente en todo el mundo y sus resultados corroboran, en general, estas observaciones. Los resultados del metaanálisis también ponen de manifiesto que la prevalencia es máxima en mujeres jóvenes y disminuye en los grupos de mediana edad (Burchell y col.,2006).

Un estudio de prevalencia de infección por VPH en mujeres con resultados citológicos normales, realizado en 5 continentes (Bruni y col., 2010), destaca una prevalencia global estimada del 11,7%, siendo muy superior en África subsahariana (24%), este de Europa (21,4%) y en América Latina (16,1%). Se observa una prevalencia particularmente alta en el Este de África (33,6%) y en la zona del Caribe (35,4%) (figura 9). En todos los casos estudiados, los cinco tipos más prevalentes fueron el 16 (3,2%), 18 (1,4%), 52 (0,9%), 31 (0,8%) y 58 (0,75) (Bruni y col., 2010).

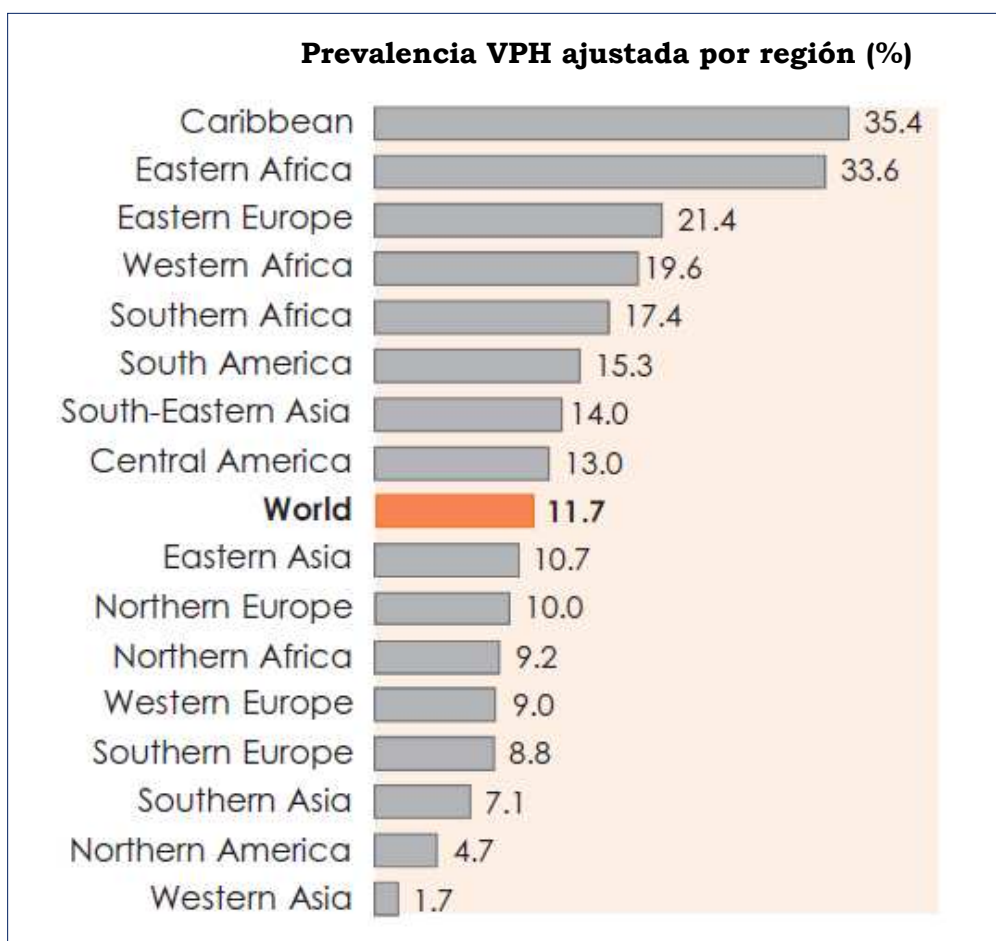


Figura 9. Prevalencia de infección por VPH en distintas áreas geográficas en mujeres con resultado citológico normal (modificada de Bruni y col., 2010)

Un metaanálisis de 53 estudios publicados hasta junio de 2004 incluyó un total de 8.308 casos de LSIL (Clifford y col., 2005). Entre las muestras positivas para VPH, el tipo 16 fue el más común (26%), seguido de los tipos 31 (12%), 51 (11%), 53 (10%), 56 (10%), 52 (9%), 18 (9%), 66 (9%) y 58 (8%). Se observa una amplia heterogeneidad de los tipos de VPH en las lesiones LSIL.

Un exhaustivo metaanálisis de 53 estudios publicados hasta febrero de 2002 incluyó un total de 4.338 casos de HSIL (Clifford y col., 2003). Este estudio fue actualizado posteriormente para incluir más de 7.000 casos procedentes de estudios publicados hasta enero de 2006 (Smith y col., 2007). Los ocho tipos más comunes en los casos de HSIL son similares a los más comunes de cuello de útero, exceptuando la menor frecuencia del VPH 18 y la ausencia del VPH 45. El VPH 16 es el más común en todas las regiones mundiales estudiadas.

Un análisis combinado de 12 estudios llevados a cabo en 25 países estimó la prevalencia específica de tipos de VPH en 3.085 casos de cáncer de cuello de útero. Se aplicó un protocolo de estudio estandarizado y determinación de ADN de VPH mediante PCR con cebadores GP5+/6+. La prevalencia global de VPH fue del 96% y los tipos más comunes fueron, por orden de frecuencia decreciente, los VPH 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 69, 73 y 82 (Muñoz y col., 2004).

Se estima que los tipos 16 y 18 son responsable del 70% de casos de cáncer de cuello de útero en todo el mundo. La prevalencia relativa del VPH 18 es más importante en el adenocarcinoma que en el carcinoma escamoso de cérvix (Clifford y col., 2003).

3.3.- Cáncer de cuello uterino: prevalencia y mortalidad

El cáncer de cuello de útero es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres de todo el mundo, con estimaciones de 530.000 nuevos casos y 275.000 fallecimientos en el año 2008 (Ferlay y col., 2008). Más del 85% de los casos se produce en países en vías de desarrollo, principalmente en Asia, África y Sudamérica, donde el cáncer de cuello de útero representa el 13% de los cánceres femeninos, con un riesgo acumulado antes de los 65 años de edad del 1,5%.

En los países desarrollados el cáncer de cuello de útero sólo representa el 3% de los nuevos casos de cáncer, con un riesgo acumulado (0-74 años) del 0,8%. Las tasas de incidencia más altas se observan en África subsahariana, América Latina y Sudeste asiático (figura 10).

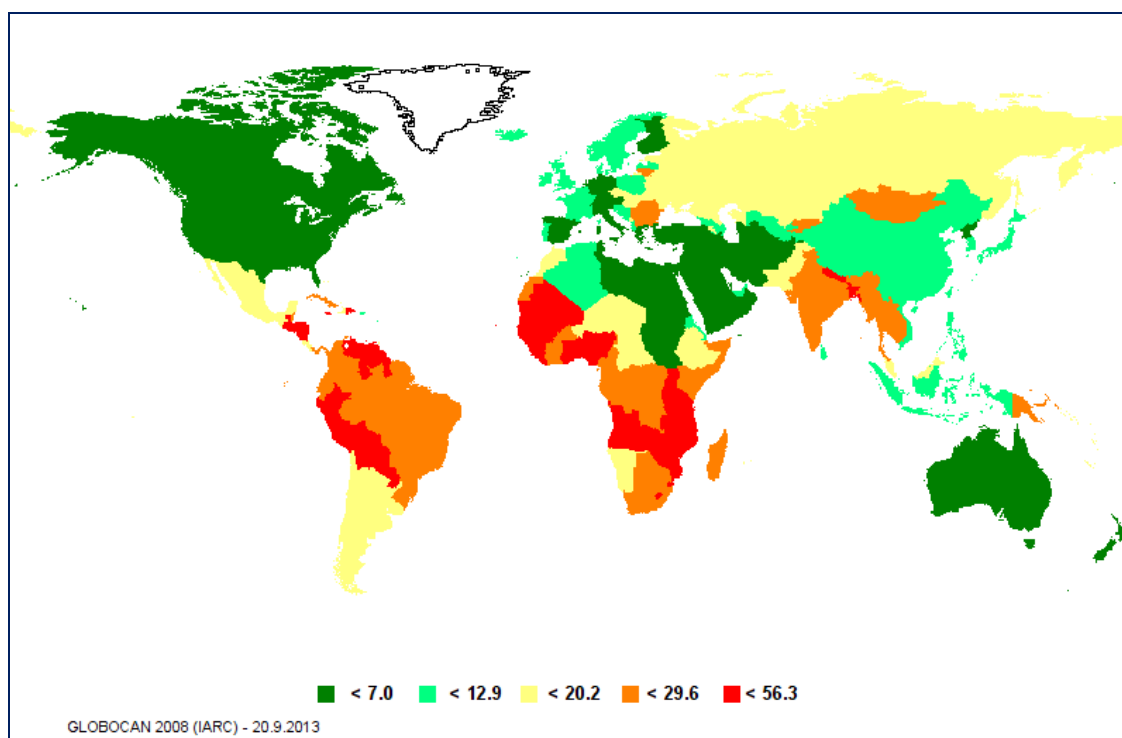


Figura 10. Tasas de incidencia de cáncer de cervix estandarizadas por edad (x 100.000) (según la población mundial) (Ferlay y col., 2008)

En general, las tasas más bajas (menos de 13 por 100.000) se identifican en Europa (excepto en algunos países del este), Norteamérica, Japón, Australia y Nueva Zelanda. Se observan tasas muy bajas en China y en Asia Occidental; la más baja documentada es de 0,4 por 100.000 en Ardabil, en el noroeste de Irán (Ries y col., 2005).

Las tasas de mortalidad son sustancialmente inferiores a la incidencia. En todo el mundo, la relación entre mortalidad e incidencia es del 52% (figura 11). El cáncer de cuello uterino supone la mayor causa de años de vida perdido por cáncer en el Tercer Mundo (Yang y col., 2004).

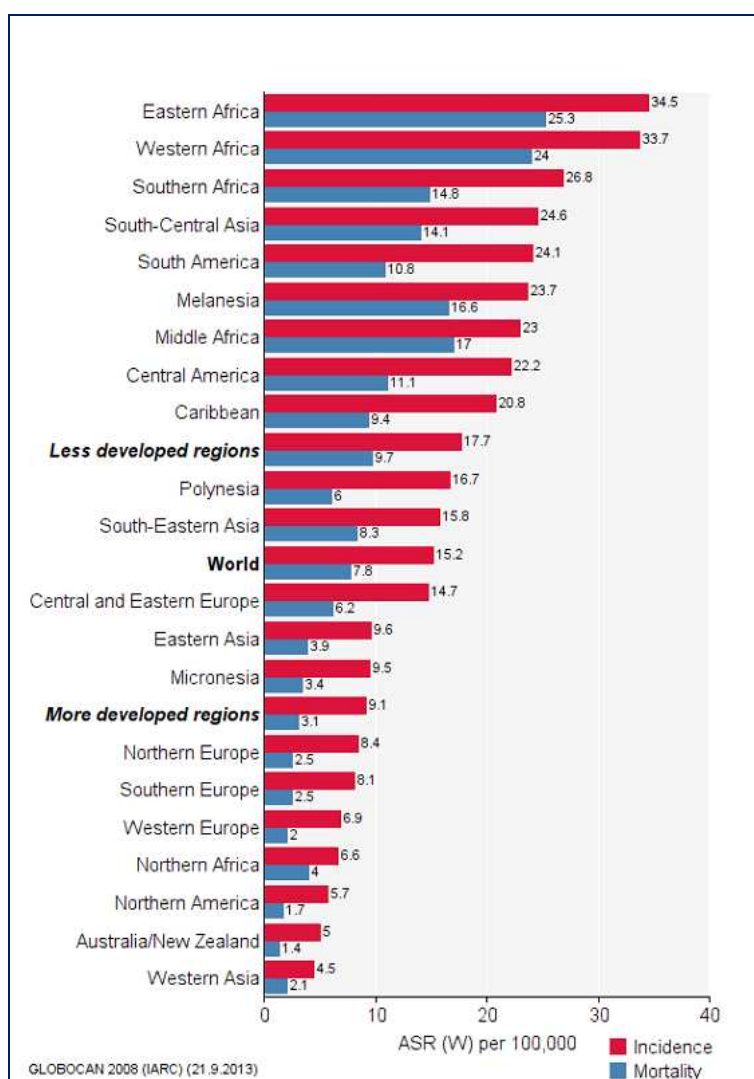


Figura 11. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix estandarizadas por edad (x100.000) (según la población mundial) (Ferlay y col., 2008).

En Europa se observan tasas muy elevadas en los países del este de Europa y tasas bajas en los países del Sur de Europa, así como en algunos nórdicos. El cáncer de cérvix en Europa es la séptima causa de mortalidad por cáncer, pero en las mujeres de 18 a 45 años, es la segunda causa.

España está incluida dentro de las poblaciones de riesgo moderado/bajo de cáncer de cuello uterino. La tasa de incidencia de cáncer de cuello uterino en España es de 7,1 casos por 100.000 mujeres/año, se estima que se diagnostican cada año unos 1948 casos de cáncer y que mueren por esta causa unas 712 mujeres al año (Ferlay col., 2008) (figura 12).

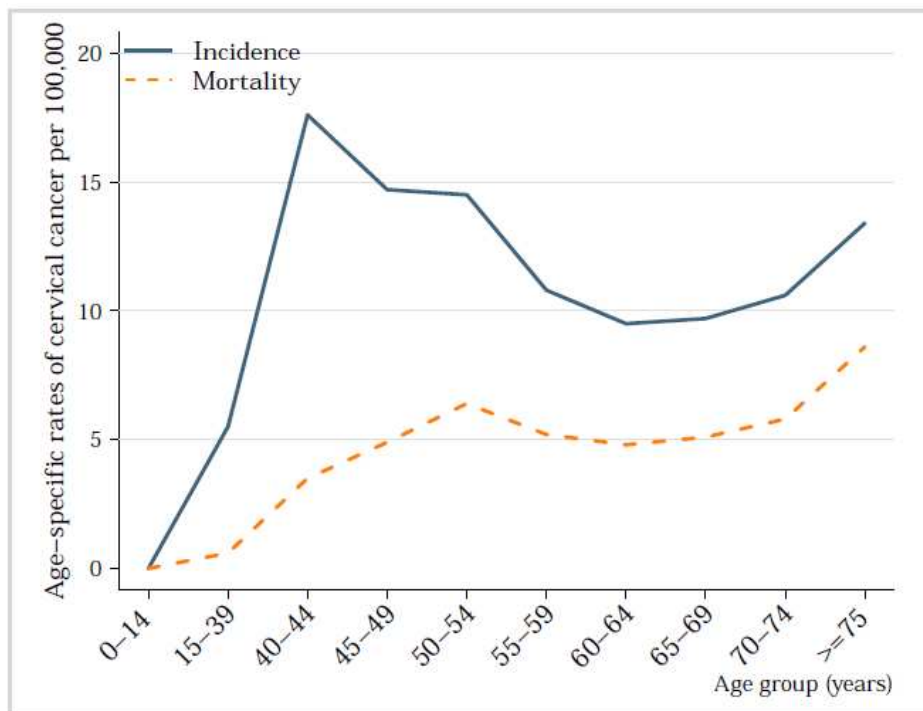


Figura 12. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix estandarizadas por edad (x100.000) en España (Ferlay y col., 2008).

Los datos disponibles en la región de Murcia (CREM, Centro regional de estadística de Murcia), indican en el año 2011 una tasa de incidencia de cáncer de cuello uterino ajustadas a la población mundial (x100.000 habitantes) de 5,98, observándose una tendencia ascendente con respecto a los dos años anteriores; 2010 (4,99) y 2009 (3,96).

3.4.- Estrategias de prevención del cáncer de cuello de útero

En Europa el cribado de cáncer sólo está indicado realizarlo en tres casos: cuello uterino, colorrectal y mama.

La prevención del cáncer cervical es uno de los aspectos más importantes de la ginecología preventiva. El objetivo del cribado para la prevención del cáncer invasivo de cérvix es la detección de lesiones escamosas de alto grado (HSIL, CIN2/3), el cáncer microinvasivo y el adenocarcinoma. Su objetivo no es detectar las lesiones escamosas de bajo grado (LSIL, CIN1), pues la gran mayoría de éstas son transitorias y carecen de potencial maligno, especialmente en mujeres jóvenes.

Actualmente disponemos de dos estrategias de prevención, primaria mediante la vacunación y secundaria mediante los programas de cribado de cáncer cervical.

3.4.1.- Prevención primaria

El desarrollo comercial de las vacunas contra el VPH empezó a plantearse seriamente en el año 1993, después de una intensa investigación con la demostración del vínculo causal entre el VPH y el desarrollo del cáncer de cuello uterino. El punto de partida de esta investigación estaba basado en la investigación de que la proteína L1 de la cápside viral podría ser ensamblada en una partícula similar al virus (VLP, *virus like particle*) cuando se expresaba como proteína recombinante en un sistema eucariota heterólogo.

Los prometedores resultados obtenidos en los estudios realizados en animales sugirieron que, como mínimo, sería necesaria una respuesta energética de anticuerpos a la proteína L1 del VPH para que la vacuna funcionara y que serían necesarios niveles sostenibles de anticuerpos en la localización de la infección primaria para asegurar una protección adecuada.

Disponemos de dos vacunas profilácticas frente al VPH (tabla 4). Estas vacunas están compuestas por partículas semejantes a los virus nativos (VLPs). Se trata de estructuras esféricas conformadas a partir de la propiedad de autoensamblaje de la proteína L1, gen estructural inmunógeno mayor de la cápside viral, obtenida por recombinación genética en el laboratorio. Las VLPs son morfológica e inmunogénicamente similares a los viriones nativos, pero carecen de capacidad infectiva, replicativa y oncogénica al no poseer ADN viral.

Tabla 4. Composición de las vacunas disponibles actualmente frente a VPH

Características	Vacuna	
	Bivalente	Tetravalente
Laboratorio	GlaxoSmithKline	SanofiPasteur/MSD
Nombre comercial	Cervarix®	Gardasil®
Principio activo	VLPs: 16,18 (20, 20ug)	VLPs: 6, 11, 16, 18 (20, 40, 40, 20 ug)
Expresión proteína L1	<i>Baculovirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Adyuvante	Formulación AS04: 500 ug de hidróxido de aluminio y 50 ug de monofosforil lípido A	225 ug de hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo

Las indicaciones clínicas de cada una de las vacunas actualmente disponibles (según ficha técnica) son:

- Vacuna bivalente (Cervarix®) está indicada a partir de los 9 años para la prevención de lesiones genitales premalignas (cervicales, vulvares y vaginales) y cáncer de cérvix causados por ciertos tipos oncogénicos.

- Vacuna tetravalente (Gardasil®) está indicada a partir de los 9 años para la prevención de lesiones genitales premalignas (cervicales, vulvares y vaginales) y cáncer de cérvix causados por ciertos tipos oncogénicos, así

como verrugas genitales (condiloma acuminado) relacionados causalmente con tipos específicos del VPH.

La duración de la protección no ha sido totalmente establecida, ni el momento ni la necesidad de dosis de recuerdo.

La vacunación no es un sustituto del cribado rutinario del cuello de útero, ya que ninguna de las vacunas es efectiva al 100%, no proporciona protección frente a todos los tipos de VPH, o frente a infecciones por VPH ya existentes, de ahí la importancia del cribado rutinario habitual.

Probablemente pasarán décadas antes de poder evaluar el impacto de la vacunación contra el VPH en la incidencia del cáncer de cuello de útero utilizando datos empíricos.

Los modelos matemáticos predicen que una vacuna para los tipos 16 y 18 reducirá, pero no eliminará, el riesgo de cáncer de cuello de útero. En los países que ya tienen un programa de cuello de útero, estas vacunas pueden reducir significativamente las lesiones CIN 2/3 y el cáncer de cuello de útero atribuibles a estos tipos oncogénicos, aunque la magnitud potencial de los beneficios clínicos dependerá de la efectividad asociada al programa de cribado. En Estados Unidos y algunos países europeos, el coste-efectividad de la vacunación dependerá sustancialmente de si será aceptable aplazar el inicio del cribado citológico hasta una edad más avanzada, espaciar más los cribados y adoptar un enfoque conservador en el manejo de resultados ambiguos en el cribado. La edad de la vacunación probablemente influirá en los beneficios y costes relativos de la prevención primaria.

3.4.2.- Prevención secundaria

El cribado mediante citología cérvico-vaginal, introducido hacer más de 50 años, ha representado uno de los mayores éxitos en la historia de la prevención del cáncer. En países desarrollados, su implantación ha permitido una reducción, en las últimas décadas, del 70-80% de la incidencia del cáncer de cuello uterino.

Las estrategias de prevención secundaria pueden ser:

- ✓ **Modelos de cribado:** poblacional y oportunista
- ✓ **Modelo de asistencia**

Los modelos de cribado son iniciativas de Salud Pública por la que se aplica a personas asintomáticas un test previamente validado. Debe ser sencillo, cómodo y reproducible, no debe esperarse un diagnóstico. El objetivo es reducir la mortalidad causada por la enfermedad.

El cribado poblacional tiene estructura propia, utiliza una base censal para la captación activa de las mujeres diana, tiene sistema de rellamada a las no asistentes y cuenta con circuitos propios de derivación y tratamiento de los casos detectados. Los cribados poblacionales están basados en la Asistencia Primaria.

El cribado oportunista no tiene estructura propia, utiliza la consulta del personal sanitario para la captación, con lo que penaliza la equidad y crea confusión, al mezclar asistencia con cribado. Este sistema no es eficiente (reitera exploraciones) y difícilmente es eficaz (70% cobertura).

El modelo asistencial está concebido para ofrecer una garantía de diagnóstico a la persona que solicita una revisión preventiva de salud, usando el nivel de asistencia personal exigida por la buena práctica, el cual, por razones de eficiencia, no es abordable en el cribado. El criterio básico es la eficacia.

Varios estudios de coste-efectividad demuestran que el cribado oportunista es más caro y menos eficaz que cualquier estrategia poblacional (Kim y col., 2004; Adab y col., 2004). Si por razones de baja incidencia la eficacia de un cribado poblacional es dudosa y se decide organizar un cribado oportunista, es imprescindible prever sistemas activos de corrección que permitan captar a las mujeres que no consultan al sistema sanitario, estaríamos hablando de un modelo de cribado mixto.

3.4.3.- Actualización de guías de cribado de cáncer de cérvix

El desafío actual es encontrar estrategias coste-efectivas que combinen una vacunación universal frente al VPH y nuevos métodos de cribado con el objetivo de trabajar con mayor eficiencia.

Aun teniendo en cuenta la baja incidencia del cáncer de cérvix en España, no se puede obviar que afecta a mujeres jóvenes dando lugar a una morbilidad y una mortalidad innecesariamente prematura y evitable, que pone en evidencia la efectividad de nuestro sistema sanitario.

Es suficientemente conocido que la prevención secundaria del cáncer de cérvix mediante citología disminuye la mortalidad (IARC, 2005), ya que la identificación y tratamiento de las lesiones precancerosas, dado el largo periodo de latencia (10-15 años) que se da entre éstas y su evolución a carcinoma invasivo, es una eficaz herramienta de prevención.

No existe acuerdo unánime sobre la edad a la que las mujeres deben comenzar a someterse al cribado, así como la periodicidad en que debe realizarse. La edad de inicio de cribado es variable, así 18 años en Austria, 30 años en Holanda y entre 20 y 25 años en el resto de países. La periodicidad del cribado también es diferente en cada país, así es cada 3 años en Francia, Italia, Bélgica. Cada 5 años en Holanda o Finlandia. Respecto a lo que sí existe acuerdo generalizado en la literatura es que el cribado debe finalizar a los 65 años.

En España, en el año 2006, se alcanzó el primer consenso para el cribado del cáncer cervical, en el que participaron varias sociedades científicas, Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO, Citología (SEC), Anatomía Patológica (SEAP) y Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC) (Puig-Tintoré y col., 2006). No obstante, en el año 2010 este protocolo fue modificado (Cortés J y col., 2010) (figuras 13 y 14).

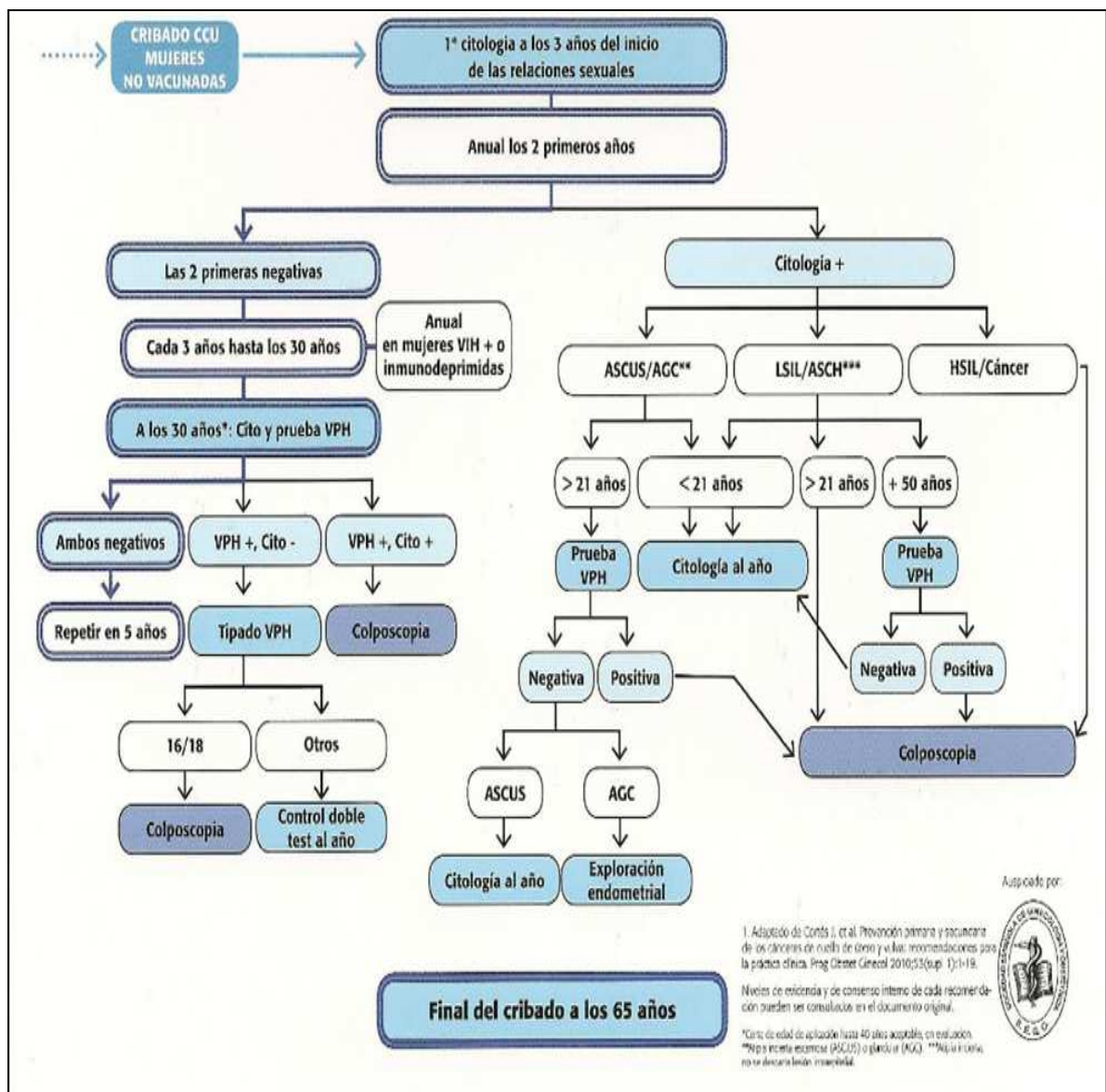


Figura 13. Recomendaciones actuales de la SEGO 2010 para cribado poblacional en mujeres no vacunadas

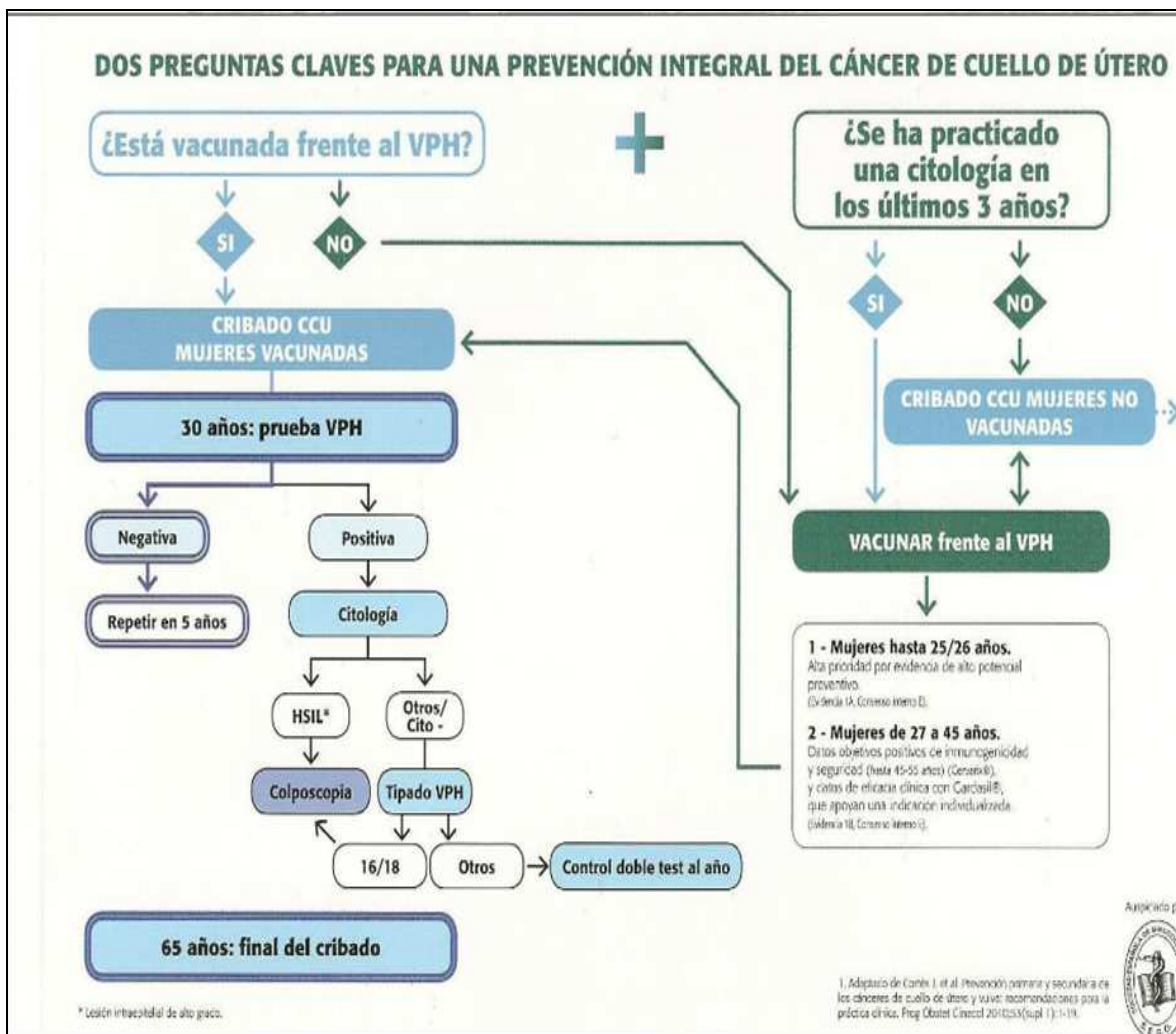


Figura 14. Recomendaciones actuales de la SEGO 2010 para cribado poblacional en mujeres vacunadas

Las recomendaciones de cribado de cáncer de cuello uterino varían entre los distintos países, así en Estados Unidos se han publicado las recomendaciones para cribado de cáncer de cuello uterino, auspiciadas por la Asociación Americana de Patología Cervical y Colposcopia (ASCCP), la Asociación Americana de Cáncer (ACS) y la Asociación Americana de Patólogos Clínicos (ASCP) (Saslow y col., 2012). El inicio del cribado sería en todos los casos a los 21 años, con control citológico cada 3 años hasta los 30 años y a partir de esta edad un estudio de VPH y citología combinado hasta los 65 años.

Otras sociedades científicas americanas USA Task Force (USPSTF 2012) y la Sociedad Americana de Ginecología y Obstetricia (ACOG 2009) han elaborado otras recomendaciones para el cribado de cáncer de cérvix. En la tabla 5 se detalla de forma resumida las recomendaciones recomendadas por las distintas sociedades americanas.

Tabla 5. Recomendaciones de cribado de VPH recomendado por distintas sociedades científicas americanas.

EDAD/ Grupo	ASCCP/ ACS/ ASCP 2011	ACOG 2009	USPSTF 2011
Inicio 2 citologías consecutivas normales	21 años	21 años	21 años
21-29 Citología	Cada 3 años	Cada 2 años	Cada 3 años
30-65 Citología	Cada 3 años	Cada 3 años	Cada 3 años
30-65 Citología y VPH	Recomendado máximo cada 5 años	Permitido máximo cada 3 años	No datos suficientes
Vacunadas	Control similar a no vacunadas	Control similar a no vacunadas	No referido

3.5.- Tratamiento de las lesiones intraepiteliales cervicales

3.5.1.- Métodos escisionales y destructivos

Desde la descripción del tratamiento de las neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN) mediante el asa de diatermia (Prendiville y col., 1989), ésta se ha convertido en pocos años en la técnica de elección para el tratamiento de neoplasias cervicales, ya que reúne en sí misma las ventajas de la inocuidad comparable a la de las técnicas destructivas locales, así como la de permitir el estudio histológico del tejido.

Toda lesión de alto grado diagnosticada por biopsia debe ser tratada para evitar su progresión. Sin embargo, no hay un acuerdo total sobre cual es la mejor conducta, observación o tratamiento, en las mujeres jóvenes con diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (CIN1). Existen distintos tipos de tratamiento, que se dividen en dos grupos:

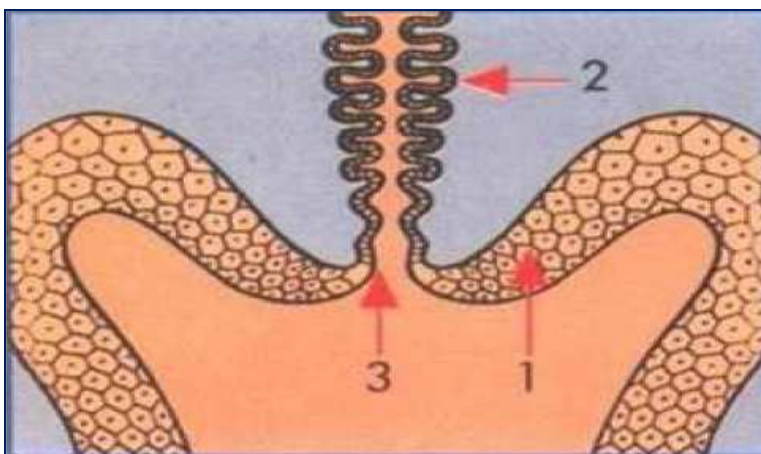
- Destructivos: producen una destrucción física de la lesión, por tanto no se puede obtener tejido para posterior estudio histológico. Dentro de este grupo se encuentran la termocoagulación, electrocoagulación, criocoagulación y vaporización con láser de CO₂.
- Escisionales: extirpan la lesión y se puede obtener muestra para estudio histológico, por tanto permite descartar la presencia de microinvasión o invasión cervical. Dentro de este grupo se encuentran la conización y la histerectomía.

Hay algunas razones que justifican elegir uno u otro tipo de tratamiento, destructivo o escisional, en un caso concreto. En general, en las mujeres con diagnóstico histológico de una lesión de alto grado (CIN 2/3) se aconseja un tratamiento escisional, preferentemente mediante asa de diatermia, para descartar así una eventual microinvasión inesperada, presente en el 1% de los casos. Por otra parte, el riesgo de enfermedad

persistente se relaciona con el tamaño de la lesión y no con su grado, por ello las lesiones que afectan más de dos cuadrantes del exocérnix deben ser tratadas mediante conización y realizar un seguimiento adecuado.

Asimismo, la histerectomía no está, en absoluto, justificada como tratamiento primario de las lesiones intraepiteliales. Sólo se indicaría cuando hay patología asociada, en general miomas o prolapso uterino. Una indicación poco frecuente en la postmenopausia es la atrofia vaginal con útero pequeño, en la cual puede ser dificultoso realizar una conización, descartado a ser posible un eventual carcinoma invasor mediante legrado (SEGO, 2002).

La conización con asa de diatermia se considera uno de los métodos escisionales más utilizados actualmente en la práctica clínica. Consiste en la exéresis de toda la zona de transformación cervical (zona límite entre el epitelio escamoso y columnar), incluyendo la lesión (figura 15). Se considera un método seguro y eficaz.



1. Epitelio escamoso 2. Epitelio columnar 3. Zona de transformación

Figura 15. Zona de transformación cervical (unión escamocolumnar).

Modificado de Proyecto Eurocitología:

<http://www.eurocytology.eu/static/eurocytology/esp/cervical/LP1ContentAcontD.html>

La escisión con asa de diatermia se utiliza desde 1984 para la toma de biopsias con fines diagnósticos, pero no fue hasta 1989 cuando se propuso la técnica con finalidad terapéutica al incorporar asas de mayor tamaño que permiten la exéresis de toda la zona de transformación (LLETZ, *large loop excision of the transformation zone*) (Prendiville y col., 1989).

Un estudio reciente (Urdaneta-Machado y col., 2011), compara la efectividad de la conización en lesiones cervicales mediante escisión quirúrgica con dos procedimientos, asa de Trucone y asa de diatermia, si bien ambas son efectivas, se observaron diferencias significativas a favor del asa de Trucone, en cuanto a menor tiempo quirúrgico, menor afectación de los bordes y menor frecuencia de recidivas.

Conociendo la historia natural de las lesiones intraepiteliales, las opciones a realizar dependerá del tipo de lesión.

- CIN 1: la mayoría de estas lesiones regresan espontáneamente, por ello el tratamiento recomendado es la observación y seguimiento. Deben cumplirse los siguientes requisitos: edad inferior a 40 años, citología concordante, colposcopia satisfactoria con cambios menores, ausencia de inmunosupresión, no sospecha de lesión glandular y garantía de seguimiento. El control de los pacientes se realiza mediante monitorización de citología cada seis meses y detección de VPH anual, para detectar la presencia o no de infección persistente. Los casos persistentes requieren un seguimiento individualizado.

- CIN 2/3: se realiza un tratamiento escisional. Solamente aquellos casos que reúnan los siguientes requisitos deben ser candidatos a un tratamiento destructivo: citología, colposcopia y biopsias concordantes, lesión totalmente visible, estudio endocervical negativo, invasión y alteraciones glandulares no sospechadas y garantía de seguimiento. El seguimiento de los pacientes se realiza siempre mediante estudio cito-colposcópico, además se realiza la detección de VPH a los 6 meses postratamiento como marcador predictor de recidiva.

3.5.2.- Seguimiento postratamiento de lesiones

Aunque los porcentajes de éxito de los tratamientos actuales son superiores al 95%, el seguimiento postratamiento es necesario. Las mujeres tratadas por cualquier lesión intraepitelial cervical (CIN) presentan un riesgo de desarrollar un cáncer invasor 5 veces mayor que el de la población general, y éste puede aparecer en un periodo de 10 a 20 años después del tratamiento (Soutter y col., 1997, 2006).

El riesgo de recurrencia es mayor durante los dos primeros años postratamiento, si bien este riesgo se incrementa en las dos siguientes décadas (Strander y col., 2007).

Se han propuesto diferentes protocolos de seguimiento postratamiento, si bien en la mayoría de ellos se recomienda hacer citología y colposcopia cada 6 meses, y determinación de VPH a los 6-12 meses. En caso de dos citologías consecutivas negativas, el paciente puede volver al cribado normal (Wright y col., 2007).

La sensibilidad del test de VPH para detectar lesión persistente o recurrente alcanza el 90% a los 6 meses postratamiento y se mantiene así hasta los 24 meses (Chan y col., 2009). Los pacientes con persistencia de VPH (especialmente el VPH 16) después de la conización tienen un riesgo del 40% de CIN 2+ en los dos años siguientes (Kreimer y col., 2006).

Diferentes factores se han asociado a un mayor riesgo de persistencia o recurrencia de la infección postratamiento, entre los que destacan: tamaño de la lesión, estado inmunológico, edad del paciente, persistencia de infección por VPH y afectación de los márgenes quirúrgicos.

La afectación de los márgenes quirúrgicos no es sinónimo de enfermedad residual, ya que en muchos casos pueden ser consecuencia de la respuesta inflamatoria de la herida o por el efecto de la temperatura durante el procedimiento escisional del asa de diatermia (Paraskeivaidis y col., 2003). La conducta ante márgenes afectados es el seguimiento mediante controles citológicos y test de VPH. En caso de persistencia o recidiva está indicada una segunda conización. En mujeres mayores de 50 años con

efectación del margen endocervical, está indicado hacer un tratamiento inmediato, una reconización o la histerectomía, ya que son un grupo de pacientes de alto riesgo de recurrencia (Paraskeivaidis y col., 2003).

4- Métodos utilizados para el diagnóstico precoz del cáncer de cérvix

4.1.- Métodos basados en el diagnóstico citológico

Breve reseña histórica

El frotis cervical fue introducido como método para identificar mujeres con riesgo de desarrollar cáncer cervical a principios del siglo XX por dos investigadores: Aureli Babes en Rumanía (1927) y Georges Papanicolau en EEUU (1928). El impacto de las investigaciones realizadas por Papanicolau fue enorme en la sociedad de la época, donde recibió honores en distintas universidades y de sociedades científicas, llegando a publicar más de 150 trabajos.

El gran éxito de las investigaciones realizadas por Papanicolau se basaba en la sistematización de la citología, aportando una metodología muy reproducible y válida para el estudio de un gran volumen de muestras. Su método incluye: toma de la muestra (pipeta), tinción (de Papanicolau) y criterios para evaluar las extensiones (clasificación de Papanicolau). Los resultados iniciales de su trabajo, en colaboración con un profesor de Obstetricia y Ginecología, Herbert Traut, se plasmaron en 1943 en un libro, imprescindible en la historia de la citología: “Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear” (Traut y Papanicolau).

Los estudios iniciales de Papanicolau no manejaba criterios anatomopatológicos en su clasificación, se utilizaban una clasificación numérica basada en cinco categorías o grado. Esta clasificación se ha modificado a lo largo de los años, debido al conocimiento sobre la patogénesis de la neoplasia cervical y al papel del virus de papiloma humano como agente etiológico .

El concepto de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) fue introducido por Richart en 1967, describe el conjunto de alteraciones progresivas del epitelio escamoso como consecuencia del proceso de maduración y diferenciación. Se clasifican en tres grados, según la alteración afecta al tercio basal (CIN 1), entre uno y dos tercios (CIN 2) o más de dos tercios del grosor del mismo (CIN 3) (figura 16).

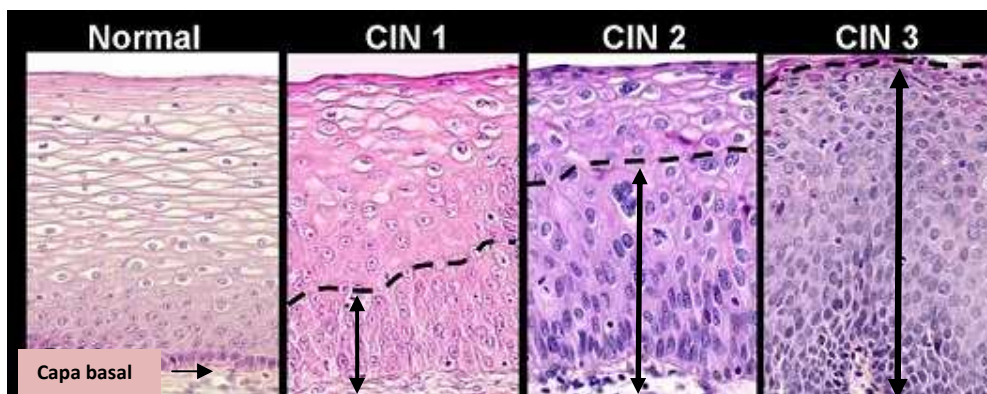


Figura 16. Clasificación de neoplasias intraepitelial cervical (Richart 1973)

En el año 1988, el Instituto Nacional del Cáncer en Estado Unidos (NCI 1989), conocido sistema de clasificación citológica “Sistema Bethesda (TBS) sustituyó a la antigua clasificación de Richart y de Papanicolau. Este sistema ha sido adoptado por la mayoría de los países del mundo para el informe de las citologías cérvico-vaginales. Este sistema combina la atipia coilocítica y la displasia leve (CIN 1) en la categoría de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL). Otra novedad importante de este sistema de clasificación es que se determina que las atipias que no puedan incluirse de forma fiable dentro de límites normales pero que tampoco sean claramente anómalas sean categorizadas con una nueva categoría de células escamosas atípicas de significado interminado (ASCUS).

En el año 2001 tuvo lugar la 3ª Conferencia del National Cancer Institute de los EEUU en la que se incorporaron los últimos avances de la neoplasia cervical de los últimos 10 años. De esta reunión se estableció la

actual clasificación vigente y normalizada utilizada por la mayoría de laboratorios de citología cérvico-vaginal del mundo, la denominada clasificación de Bethesda (Solomon y col., 2002). Destaca especialmente un apartado de calidad de la muestra, en el que se debe reflejar si el extendido es o no satisfactorio para su evaluación y, en este caso, especificar el motivo (tabla 6).

Tabla 6. Clasificación del sistema Bethesda (2001)

Tipo de muestra	<ul style="list-style-type: none"> - Extendido convencional - Muestras de citología líquida
Idoneidad de la muestra	<ul style="list-style-type: none"> - Satisfactoria - Insatisfactoria (especificar motivo) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Muestra rechazada, no procesada ▪ Muestra procesada y examinada
Categorización general (Opcional)	<ul style="list-style-type: none"> - Negativo para lesión intraepitelial o malignidad - Células epiteliales anormales - Otras normales en mujeres
Interpretación/ resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Negativo para lesión intraepitelial o malignidad - Células epiteliales anormales: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Células escamosas atípicas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ ASC-US (de significado incierto) ▪ ASC-H (no puede excluir HSIL) ▪ Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) ▪ Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) ▪ Carcinoma escamoso (CEC) - Células glandulares: <ul style="list-style-type: none"> ▪ AGC (atípicas), especificar endocervical, endometrial ▪ AGC-N (atípicas, posible neoplasia) ▪ AIS (adenocarcinoma in situ endocervical) ▪ Otros ▪ Células endometriales en mujer de 40 años
Notas (Opcional)	

En la tabla 7 se detalla de forma resumida las distintas clasificaciones revisadas en este apartado.

Tabla 7. Diferentes clasificaciones utilizadas en citologías cérvico-vaginal

Papanicolau (1920)	OMS (1950)	CIN (1967)	Bethesda (1980)	Bethesda (2001)
Grado I			ASC AGUS	ASC-US/ ASC-H AGC*
Grado II	Displasia leve	CIN 1	LSIL	LSIL
Grado III	Displasia modera Displasia severa	CIN2 CIN3	HSIL	HSIL
Grado IV	Carcinoma in situ			
Grado V	Carcinoma microinfiltrante Carcinoma infiltrante	Carcinoma infiltrante	Carcinoma infiltrante	Carcinoma escamoso Adenocarcinoma in situ endocervical

*Distinguir células glandulares atípicas endocervicales /endometriales

Para el cribado de cáncer de cérvix, se utilizan dos tipos de citologías: citología convencional y citología líquida.

La citología convencional presenta algunos inconvenientes como: el proceso manual de extensión de las células en el portaobjeto hace imposible la estandarización, las células se distribuyen de manera desigual, hay superposiciones difíciles de interpretar debido a presencia de moco cervical, sangre o células inflamatorias.

La citología líquida, al ser una citología en capa fina, evita muchos de estos inconvenientes, y se reducen el número de resultados falsos positivos y falsos negativos (Klinkhamer y col., 2003, Siebers y col., 2008). Los dos sistemas de citología líquidas más utilizados en EEUU y Europa son, el sistema ThinPrep (Cytic, Boxborough, MA) y el SurePath (Tripath Imaging, Burlington, NC), ambos sistemas han sido aprobados por la FDA para el cribado primario.

El sistema más utilizado en la actualidad para clasificar las lesiones detectadas en los extendidos citológicos es el sistema Bethesda, que incluye las siguientes interpretación de los resultados:

- Negativo para lesión intraepitelial / malignidad
- Para células escamosas: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL y CE
- Para células glandulares: AGC y AIS

En la figura 17 se muestran algunos ejemplos de resultados citológicos clasificados según el sistema de Bethesda.

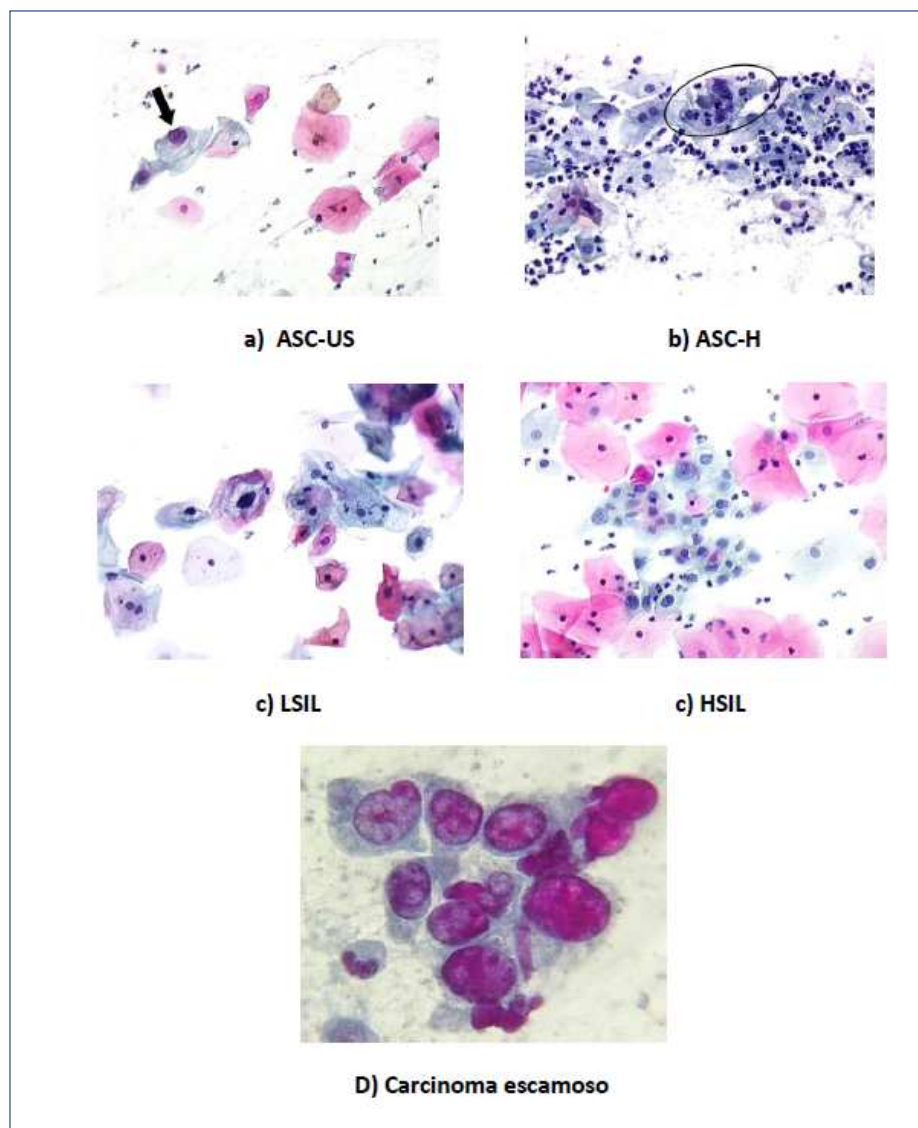


Figura 17. Citologías anormales según clasificación Bethesda (2001)

4.2.- Métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos

Hasta la aparición de las nuevas técnicas de detección de ácidos nucleicos, el diagnóstico de la infección por VPH se había basado fundamentalmente en la evaluación morfológica de los efectos citopáticos causados por el virus en muestras de citología cérvico-vaginal y en biopsias cervicales. Los procedimientos de detección del ADN viral han revolucionado el diagnóstico, mejorando la sensibilidad del diagnóstico y posibilitando el conocimiento de los diferentes genotipos que ocasionan las infecciones cervicales (Stoler, 2000).

La detección de ácidos nucleicos del VPH puede realizarse mediante diferentes técnicas de biología molecular, sin embargo dos métodos fundamentales se han convertido en referentes a nivel diagnóstico. El primero de ellos es la detección, en solución, de híbridos del ADN viral son sondas de ARN sintético complementario y posterior revelado con fluorescencia, es la denominada captura de híbridos, considerada como la técnica de referencia más extendida en los programas de cribado, siendo además la primera prueba de detección de ADN aprobada por la FDA. La segunda de las técnicas, y con múltiples formatos de aplicación, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), también muy generalizada.

Numerosos estudios han establecido los límites de sensibilidad y especificidad de cada una de las técnicas y variantes descritas. Al igual que ocurre con la citología, la calidad del análisis de ADN está condicionada por una serie de factores técnicos y de conservación de la muestra que en ocasiones son determinantes para el resultado.

En la tabla 8 se expone de forma resumida las diferentes metodologías utilizadas en la detección de VPH, diferenciando las técnicas basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos de aquellas cuyo fundamento es la amplificación de la señal.

Tabla 8. Resumen de la metodología utilizada para detección de VPH (modificado de Sneijders y col., 2010)

Categoría	Diana	Principio de la prueba	Método
Amplificación de dianas (Grupo 1)	ADN	PCR formato variable, lectura por hibridación	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PGMY-Linear array (Roche) ▪ SPF10-Lipa (Innogenetic) ▪ GP5+/6+- PCR-EIA ▪ MGP PCR (Luminex) ▪ BSGP5+/6+ PCR-MPG ▪ Digene HPV genotyping RH test (Qiagen) ▪ Digene HPV genotyping LQ test (Qiagen) ▪ Amplicor (Roche) ▪ PapilloCheck (Greiner-Bio-one) ▪ CLART HPV2 (Genomica)
			PCR tiempo real
	ARNm	RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HPV 16 E6*I RT-PCR-EIA
		NASBA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nuclisens easyQ HPV v1 (Biomerieux) ▪ PreTect HPV Proofer assay (Norchip)
		TMA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aptima HPV Assay (Gen-Probe)
	Amplificación de señales (Grupo 2)	ADN	Fase líquida
<i>In situ</i>			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ventana Inform HPV (Ventana) ▪ Dako Gen point (Dako)

4.2.1.- Métodos de amplificación de secuencias diana

Sistemas basados en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR es el método de amplificación de secuencias diana más frecuentemente utilizado. En la detección y tipado de VPH se han utilizado diferentes diseños de sistemas de PCR que incluyen los específicos de tipo y los sistemas denominados de amplio espectro o consenso.

La PCR específica de tipo utiliza cebadores que han sido diseñados para detectar un tipo determinado del VPH; por tanto, la detección de diferentes tipos implica la realización de múltiples reacciones de PCR. Los diseños de PCR múltiple (múltiples cebadores específicos de tipo en una única reacción) simplifican la realización de la técnica, pero la estandarización del método suele ser compleja.

Este método está basado en el diseño específico de cebadores para regiones diferenciales entre los diferentes VPHs, y en ella hay que destacar su extremada sensibilidad ya que se pueden amplificar específicamente, por ejemplo los oncogenes virales (E6/E7) de un determinado tipo, subtipo o variante viral. El uso de estos “cebadores específicos” permite ajustar las condiciones de la reacción a sensibilidades de femtogramo (10^{-15} g) con especificidades que rondan el 100%. Por otra parte permite la realización de análisis de integración viral, detección de variantes, cuantificación normalizada frente a genes constitucionales, etc.

Los sistemas de **PCR de amplio espectro o “consenso”** son los más utilizados en la detección del VPH y la mayoría están diseñados en la región L1, dado que es una de las regiones más conservadas dentro del genoma del virus (Coutlée y col., 2002).

En la figura 19 se muestran los diferentes sistemas de cebadores utilizados en la detección de VPH.

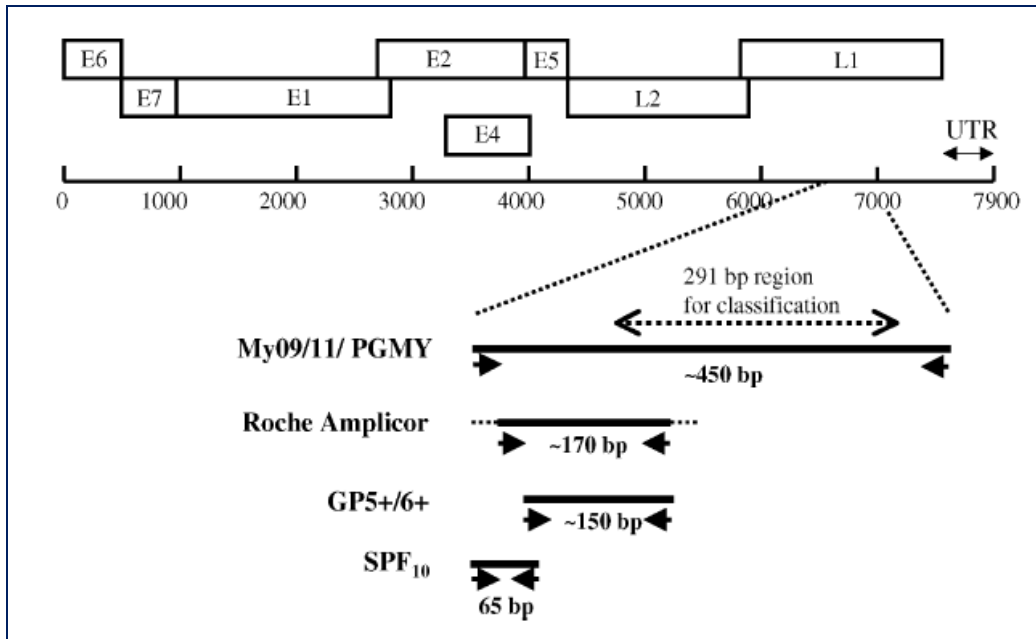


Figura 19. Localización de los diferentes cebadores utilizados en la detección de VPH mediante PCR (Molijn y col., 2005)

Existen tres diseños diferentes de cebadores consenso. En primer lugar aquellos que incluyen una pareja única de cebadores, diseñados sobre una región conservada, pero que sólo se “aparean” con algunos tipos de VPH. Para compensar los desapareamientos, la PCR se realiza a bajas temperatura de alineamiento (annealing). Un ejemplo de este tipo son los cebadores Primer General (GP) P5+/6+ (de Roda Husman y col., 1995).

El segundo tipo de cebadores consenso incorpora varias parejas de cebadores, que contienen una o más posiciones degeneradas para compensar las variaciones intertípicas en los lugares de la secuencia a los que se unen los cebadores. No necesitan una temperatura baja de alineamiento. Entre ellos cabe destacar el sistema MY09/11 (Hildesheim y col., 1994).

El tercer diseño consiste en combinar una serie de parejas de cebadores diferentes que se unen en las mismas posiciones del genoma. Estos cebadores no contienen posiciones degeneradas pero suelen contener inosina que puede unirse a cualquier nucleótido. Ejemplos de este tipo de cebadores son PGMY09/11 (Gravitt y col., 2000) y SPF10 (Kleter y col., 1998).

Por regla general, parece que los sistemas de PCR que utilizan cebadores múltiples como PGMY09/11 y SPF10 son más eficientes para la detección de infecciones múltiples en comparación con los sistemas que utilizan cebadores de consenso únicos como el GP5+/6+.

La sensibilidad y la especificidad analítica de las pruebas de detección de VPH varían ampliamente, en función de las características de la técnica, el tipo y la calidad de la muestra, así como la calidad de los reactivos utilizados. Es necesario disponer de métodos y protocolos estandarizados con el fin de asegurar el mejor rendimiento de las pruebas (Clifford y col., 2006).

La técnica de **PCR en tiempo real** se ha introducido en los últimos años en el diagnóstico molecular del VPH. La detección de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble como el SYBR® Green o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas: sondas *Taqman*, moléculas *Beacons* y sondas de hidrólisis. La utilización de sondas de hidrólisis aumenta la especificidad de la reacción.

La detección del ARN viral mediante una **PCR-transcripción inversa** (RT-PCR) es una herramienta de gran utilidad desde el punto de vista clínico, ya que permite evaluar la expresión de algunos genes con potencial transformador (E6 y E7). Existen métodos comerciales que utilizan la tecnología de amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) combinada con detección mediante PCR en tiempo real o mediante hibridación (ver tabla 8).

Finalmente, con la intención de encontrar pruebas cada día más sensibles y específicas, a menor coste y más rapidez en la obtención de los resultados, se han validado métodos basados en tecnología de *DNA chips* o *microarrays* (An y col., 2003; Choi y col., 2005) para identificar la mayoría de tipos de VPH anogenitales. Mediante secuencias de oligonucleótidos de diferentes tipos específicos de VPH fijadas sobre una membrana de celulosa incrustada en un soporte, permite la detección simultánea de diferentes tipos virales. Es necesario incorporar controles positivos y negativos, así como controles de ADN genómico humano para validar los resultados obtenidos.

4.2.2.- Métodos de amplificación de la señal

Hibridación en solución (captura de híbridos)

La captura de híbridos es un método de amplificación de la señal basado en la hibridación del ADN del VPH con sondas de ARN marcadas. Los híbridos ADN-ARN se detectan con un anticuerpo monoclonal específico y un sustrato quimioluminiscente, lo que proporciona una medida semicuantitativa del ADN del VPH.

Los modernos métodos comerciales como el denominado Hybrid Capture 2® (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) a diferencia de las versiones anteriores, tienen una adecuada relación entre sensibilidad y especificidad si se establecen puntos de corte adecuados (1 pg de ADN; equivalentes a 100.000 copias del genoma viral). La utilización de un “cocktail” de 13 sondas de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otro grupo de bajo riesgo que incluye 5 tipos (6, 11, 42, 43 y 44), permite la detección de cualquiera de estos tipos en la reacción, si bien no permite la identificación de VPH específicos. Este ensayo fue el primero aprobado por la FDA en el cribado de cáncer de cuello uterino.

Presenta como ventaja la posibilidad de semicuantificar la carga viral, aunque esta cuantificación solamente indica número de copias virales y no puede ser corregida en función de número de células obtenidas en la toma.

El inconveniente principal es que no permite distinguir entre los diferentes tipos virales ni la presencia de infecciones múltiples, así como la posibilidad de reacciones inespecíficas entre sondas de alto riesgo y ciertos tipos virales de bajo riesgo que pueden superar el 10% de los casos.

4.3.- Detección de marcadores de progresión oncogénica

Uno de los principales inconvenientes que presentan los métodos de detección de VPH es su falta de especificidad, sobre todo en mujeres menores de 30 años, ya que la mayoría de estas mujeres presentarán infección transitoria por VPH pero nunca desarrollarán lesiones neoplásicas.

A partir de los mecanismos bioquímicos implicados en la transformación neoplásica, y con el objetivo de diferenciar la infección transitoria de la infección persistente, se han evaluado nuevos biomarcadores que identifican las células en proceso de carcinogénesis.

4.3.1.- Detección de la proteína p16^{INK4a}

La proteína p16^{INK4a} es una fosfoproteína con una función crucial en la regulación del ciclo celular eucariótico al actuar como un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Estas quinasas tienen como función principal regular la actividad supresora de la pRB (proteína del retinoblastoma) sobre el factor de transcripción E2F que estimula la expresión de genes requeridos en la fase S del ciclo celular (Serrano 1997). Existe, entonces, una relación inversa entre la expresión de p16^{INK4a} y la presencia de pRB activa. La p16^{INK4a} se detecta cuando la pRB está alterada (mutada, delecionada o inactivada) y, se reduce o está ausente en células que contienen pRB con actividad normal.

Como se ha comentado en el apartado 2.4.1, durante el proceso de oncogénesis, la oncoproteína viral E7 interactúa con numerosas proteínas celulares, siendo la proteína pRB la más relevante de todas ellas,

interfiriendo así en el control de la transición G1/S del ciclo celular, con la consiguiente aceleración del mismo. La unión entre pRB y E7 de VPH-AR da lugar a la liberación de E2F y como consecuencia a la progresión no regulada a través del ciclo celular (Berezutskaya y col., 1997).

La sobreexpresión de p16^{INK4a} es fácilmente detectable en muestras histológicas y citológicas por tinción inmunohistoquímica, siendo un marcador excelente de progresión neoplásica, que mejora la especificidad diagnóstica y soluciona los problemas existentes de variabilidad inter e intra-observador (Klaes y col., 2001).

Algunos estudios han validado la proteína p16^{INK4a} como marcador de progresión neoplásica, así un estudio con 292 mujeres incluidas en el estudio Guanacaste (Wang y col., 2004) con un seguimiento durante 5 a 7 años con un diagnóstico inicial de LSIL, mostraron que de las que presentaron inicialmente una positividad difusa de la p16^{INK4a}, el 44% progresaron a HSIL.

No obstante, la frecuente presencia de células normales positivas para la proteína p16^{INK4a} obliga a utilizar criterios morfológicos (Denton y col., 2010). Por ello, recientemente se ha propuesto que la detección simultánea de la proteína p16^{INK4a}, marcador de antiproliferación, y la proteína Ki-67, un marcador de proliferación, en una misma célula epitelial cervical podrían ser, en citología, marcadores subrogados de la desregulación del ciclo celular secundaria a la infección transformante por VPH. La principal ventaja de esta tinción dual p16/Ki-67 es que no precisa de interpretación morfológica de las características nucleares, y se considera como positiva para el test cualquier citología con al menos una célula con positividad dual (tinción marrón citoplasmática para p16 y tinción roja nuclear para Ki-67).

4.3.2.- Detección de la expresión de los genes E6/E7

La expresión de los oncogenes virales E6/E7, son requeridos para la inhibición de la función de las proteínas celulares p53 y pRB en la

transformación maligna del epitelio cervical, como se ha explicado en el apartado 2.4.1. Se ha encontrado una elevada expresión de estos oncogenes en las lesiones de alto grado (CIN 2/3) y en el carcinoma cervical invasivo.

La cantidad de proteína oncogénica, traducida *in vivo* en la célula, es dependiente de múltiples factores: tipo viral, carga viral, tasa de transcripción de ARN, presencia de moduladores de transcripción (corticoides, hormonas,..), integridad del ADN y activación o inhibición de promotores y reguladores.

La detección de las proteínas tempranas del VPH es difícil debido a los bajos niveles de expresión que se observan en los tejidos infectados por VPH, así como por la facilidad de degradación del ARNm en comparación con la estabilidad del ADN.

Se han realizado multitud de estudios de expresión génica que demuestran que la producción de proteínas oncogénicas E6 y E7, en aquellos casos en que el virus permanece íntegro, es decir episomal, está invariablemente conservada con independencia del tipo viral que la codifique y que se modifica únicamente en respuesta a señales moduladoras de sus promotores dependientes de la fase de infección. De este modo, salvo algunas excepciones, la forma no integrada del virus expresa cantidades constantes de proteínas E6 y E7 una vez que la infección se hace persistente. Muy distinto ocurre cuando el ADN del VPH se encuentra integrado, ya que en esa circunstancia, la interrupción de la región E2 del VPH-AR, actúa sobre los promotores de E6 y E7 desregulándolos positivamente e incrementando la producción de ARNm y la traducción a proteínas oncogénicas.

Varios estudios publicados sobre la determinación de ARNm de E6/E7, sugieren una sensibilidad equivalente a la detección de ADN de VPH pero un mayor valor predictivo positivo para la detección de lesiones de alto grado (CIN 2+) (Dockter y col., 2009; Tropé y col., 2009; Ratnam y col., 2010).

II. OBJETIVOS

La prevalencia de la infección por el virus de papiloma humano en la población general se correlaciona muy bien con las tasas de incidencia del cáncer de cuello uterino en todas las regiones del mundo, así las tasas ajustadas por edad son más altas en los países con mayor incidencia de carcinoma de cérvix.

El objetivo principal de esta tesis es:

- ✓ Determinar la prevalencia global de la infección por VPH y estudiar los genotipos en mujeres con lesión intraepitelial cervical en las distintas áreas de salud de nuestra comunidad.

Analizado el objetivo principal de este trabajo, consideramos oportuno realizar estudios adicionales sobre los métodos virológicos y citológicos, así como estudiar la infección por VPH en el seguimiento clínico de pacientes tratados mediante métodos escisionales. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Estudio comparativo de dos técnicas de detección de VPH en el marco del diagnóstico asistencial
- ✓ Evaluación de dos biomarcadores celulares de progresión oncogénica, proteína p16/Ki-67 y ARNm E6/E7
- ✓ Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante conización por lesión cervical de alto grado

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras clínicas utilizadas en el estudio

Para el presente estudio se utilizaron muestras clínicas procedentes de 3.752 pacientes, que fueron remitidas al laboratorio de Virología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, centro de referencia para toda el área sanitaria de la región de Murcia.

Este estudio se realizó en un contexto asistencial, dado que no existe en nuestra comunidad un protocolo de cribado poblacional para la prevención de cáncer de cuello uterino. Los pacientes en los cuales, tras la exploración ginecológica tenían un resultado citológico anormal, fueron citados por el ginecólogo de su área correspondiente para la toma de muestra cervical.

Se utilizó un modelo único de petición que previamente había sido consensuado con un grupo de ginecólogos expertos en patología cervical, en el que se hacía constar los datos de filiación del paciente, tipo de muestra remitida, motivo de la petición y último resultado citológico.

Los datos de procedencia de los pacientes se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Procedencias de pacientes por áreas sanitarias

Área sanitaria	Nº pacientes	Porcentaje (%)
I-Murcia/Oeste	799	21,3
III-Lorca	789	21
IV-Noroeste	203	5,4
V-Altiplano	241	6,4
VII-Murcia/Este	1.067	28,4
VIII-Mar Menor	271	7,2
IX-Vega Alta del Segura	382	10,2
TOTAL de pacientes	3.752	

Muestras clínicas:

Para este trabajo se remitieron un total de 4.449 muestras clínicas procedentes de pacientes de las distintas áreas sanitarias de la región de Murcia durante un periodo de 5 años (2008-2012).

La distribución de las muestras clínicas remitidas por cada área sanitaria se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Distribución de muestras clínicas por áreas sanitarias

Área sanitaria	Nº muestras	Porcentaje (%)
I-Murcia/Oeste	917	20,6
III-Lorca	789	17,7
IV-Noroeste	212	4,8
V-Altiplano	315	7,1
VII-Murcia/Este	1432	32,2
VIII-Mar Menor	315	7,1
IX-Vega Alta del Segura	469	10,5
TOTAL de muestras	4.449	

Toma de muestras:

Las muestras de exudado cervical se obtuvieron en las distintas unidades de patología cervical (UPC) o en unidades ginecológicas de apoyo (UGA) de las diferentes áreas sanitarias de la región de Murcia.

Todos los centros enviaron las muestras siguiendo un procedimiento normalizado, previamente consensuado con todas las unidades responsables de realizar la toma de muestras (figura 20).

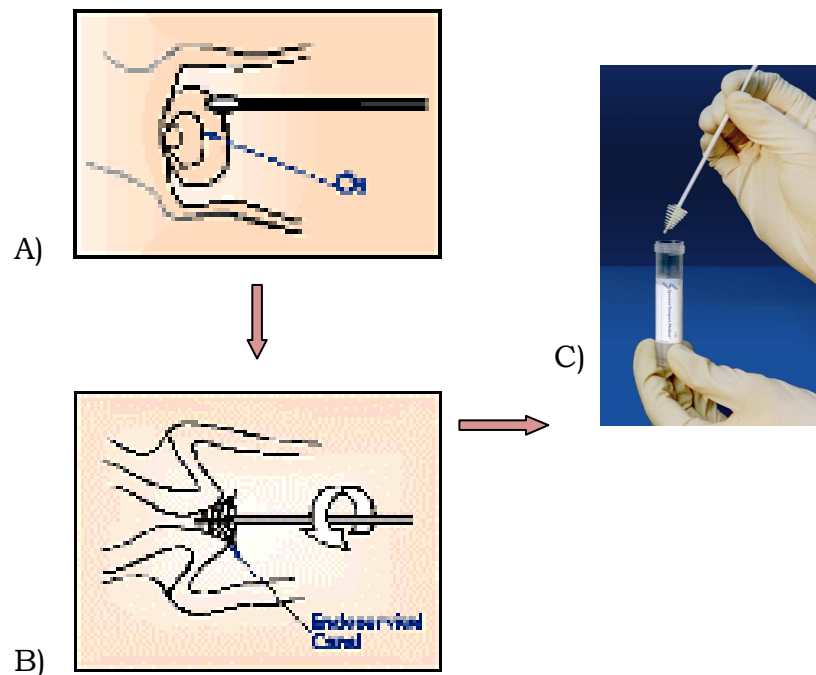


Figura 20. Procedimiento de toma de muestras mediante cepillado cervical. **A)** Elimine el exceso de moco del orificio cervical y del exocérnix circundante mediante una torunda de algodón o de Dacron®. **B)** Introduzca el escobillón de 1-1.5cm dentro del orificio cervical hasta que las cerdas exteriores toquen el exocérnix. Dar tres vueltas en sentido contrario a las agujas del reloj. NO introducir completamente el escobillón dentro del canal endocervical. **C)** Introduzca el cepillo cervical DNAPap® en el medio de transporte especial (Digene Cervical Sampler®) donde se puede conservar a temperatura ambiente un máximo de 2 semanas y enviarse al laboratorio sin refrigerar.

Las muestras fueron remitidas en su medio de transporte al laboratorio de virología donde se conservaron en nevera de 2 - 8°C hasta un máximo de 7 días (en caso de no poder procesarlas de forma inmediata se congelaron a -20°C).

Todas las muestras fueron procesadas en el siguiente orden:

1º- Estudio de ADN de VPH de alto riesgo mediante la técnica de captura de híbridos (hc2 High-Risk HPV DNA test®, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), que detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo (ver apartado 1.1)

2º- Todas las muestras positivas mediante captura de híbridos se caracterizaron y tiparon mediante la técnica de PCR *microarray* (CLART® HPV2, Genomica, Madrid, Spain) que detecta 35 tipos de VPH (ver apartado 1.2)

Para conseguir los objetivos marcados en el presente trabajo, se ha realizado una clasificación de las muestras clínicas y los pacientes en 4 grupos diferentes que se muestran en la tabla 11.

Análisis estadístico del estudio

El estudio de la relación entre las variables cualitativas se realizó empleando el test chi-cuadrado. Los resultados se ordenaron en una tabla de contingencia 2x2 y se calcularon los índices diagnósticos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se determinó el índice kappa (κ) para evaluar la concordancia entre los resultados.

Para estudiar la asociación entre el grado de lesión citológica con las distintas variables cualitativas, se utilizó el test chi-cuadrado y se realizó un estudio de residuos tipificados corregidos para ver la dirección de las asociaciones. Todos los resultados se consideraron significativos para un nivel $\alpha < 0,05$.

El análisis estadístico se realizó con los programas estadísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 18.0 para Window (SPSS Inc., Chicago IL) y GraphPad Prism versión 5.0 para Window.

Tabla 11. Resumen del número de pacientes y/o muestras incluidas en cada uno de los estudios realizados en el presente trabajo

Estudio realizado	n° de pacientes y/o n° de muestras	Selección de pacientes o muestras
1. Estudio de prevalencia de la infección y genotipos de VPH en mujeres con lesión intraepitelial cervical	3.752 4.449	Pacientes que acuden a la consulta ginecológica para revisión habitual, en un contexto de un cribado asistencial para prevención de cáncer de cuello de útero
2. Estudio comparativo de la técnica de captura de híbridos frente a la técnica de PCR- <i>microarray</i>	- 210	Estudio prospectivo aleatorio de muestras de cepillado cervical enviadas de forma consecutivas durante un periodo de 4 meses
3. Evaluación de dos biomarcadores de progresión oncogénica, marcador citológico (p16/Ki-67) y marcador virológico (ARNm E6/E7)	- 151	Estudio retrospectivo de citología cérvico-vaginales de mujeres mayores de 25 años con alteración citológica ASCUS o LSIL
4. Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante conización por lesión cervical de alto grado	130 -	Estudio prospectivo de una cohorte de pacientes mayores de 21 años procedentes del área VII-Murcia/Este tratadas por conización debido a lesión cervical alto grado (CIN2+)

1. Estudio de prevalencia de la infección y genotipos de VPH en mujeres con lesión intraepitelial cervical.

Durante el periodo 2008-2012, en nuestro laboratorio se procesaron un total de 4.454 muestras, pertenecientes a 3.752 pacientes que presentaron un resultado citológico anormal.

La población estudiada se considera de bajo riesgo epidemiológico, ya que todos los casos procedían de consultas ginecológicas asistenciales, y no de una población específica con mayor riesgo de infecciones de transmisión sexual.

Los pacientes fueron estratificados por rangos de edad de 5 años, desde los 25 hasta los 55 años, siguiendo las recomendaciones de la mayoría de estudios nacionales e internacionales para el seguimiento de la infección por VPH.

Los resultados citológicos se clasificaron según el sistema de Bethesda 2001, clasificando las muestras con alteración citológica en ASCUS, LSIL y HSIL (ver introducción, apartado 4.1). Para el estudio de los genotipos de VPH se utilizó la clasificación de riesgo oncogénico basada en Muñoz y col. 2003.

1.1.- Detección de ADN de VPH mediante captura de híbridos

1.1.1.- Fundamento

La técnica de captura híbrida (hc2 High-Risk HPV DNA test®, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal y detección por quimioluminiscencia.

Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda de ARN específica del VPH. Los híbridos de ADN-ARN resultantes se capturan en la superficie de los pocillos de una microplaca, recubiertos con anticuerpos específicos para los híbridos de ADN-ARN. A continuación, los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, y se detectan mediante un sustrato quimioluminiscente. A medida que la fosfatasa alcalina unida degrada el sustrato, se emite luz, que se mide en unidades relativas de luz (RLU) en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del ADN diana en la muestra (figura 21).

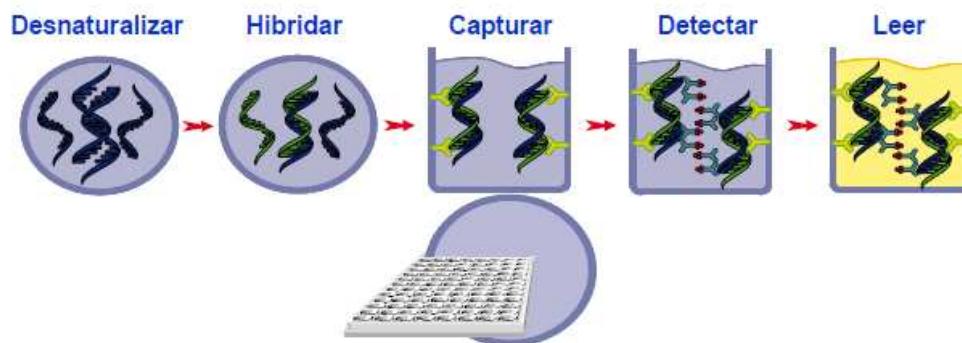


Figura 21. Descripción de la técnica de captura híbrida

1.1.2.- Realización del ensayo

La muestra remitida mediante cepillado cervical DNAPap® debe homogeneizarse mediante agitación. Posteriormente se realizan los siguientes pasos:

- Desnaturalización: se introducen las muestras en un baño de agua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 ± 2 minutos, asegurando que el agua cubre completamente toda la muestra. Se agita brevemente en vortex (15-30 segundos) y se coloca de nuevo en un baño de agua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 ± 3 minutos

- Hibridación: se utiliza una microplaca de hibridación específica para este procedimiento (siguiendo las indicaciones del fabricante):
 - Con una micropipeta se añade $75 \mu\text{l}$ de los calibradores, controles de calidad y cada una de las muestras

 - Se tapa la microplaca de hibridación y se incuba durante 10 minutos a una temperatura entre 20 y 25°C

 - Se transfieren $25 \mu\text{l}$ de la mezcla de sondas de VPH alto riesgo (que ha sido preparada previamente) a cada uno de los pocillos que contienen los calibradores, controles y muestras

 - Se tapa la microplaca de hibridación y se coloca en un agitador rotatorio a una velocidad de 1100 ± 100 rpm durante 3 ± 2 minutos (tras la agitación todos los pocillos deben virar a un color amarillo, de no ser así debe añadirse de nuevo $25 \mu\text{l}$ de la mezcla de sondas de VPH)

 - Se introduce la microplaca en un incubador precalentado a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 60 ± 5 minutos

- Captura de los híbridos: se utiliza para ello la microplaca de captura que viene dentro del kit de reactivos
 - Con una micropipeta multicanal, se transfiere el contenido completo de cada uno de los pocillos de la microplaca de hibridación a la microplaca de captura

 - Se tapa la microplaca de captura y se coloca en un agitador rotatorio a una velocidad de 1100 ± 100 rpm a una temperatura entre 20 y 25°C , durante 60 ± 5 minutos

- Detección de los híbridos: cuando finalice el paso de captura, se retira la microplaca del agitador y se elimina todo el líquido de los pocillos
 - Se añade con una micropipeta multicanal, 75 µl *del reactivo de detección 1* a cada uno de los pocillos
 - Se tapa la microplaca y se incuba a una temperatura entre 20 y 25°C durante 30 a 45 minutos
 - Se lava la microplaca y posteriormente se deja secar completamente
 - Se añade con una micropipeta multicanal, 75 µl *del reactivo de detección 2* a cada uno de los pocillos. Se tapa la microplaca y se incuba a una temperatura entre 20 y 25°C durante 15 minutos, evitando la exposición directa a la luz
 - Se lee la microplaca en el luminómetro DML 2000 (Digene®)

1.1.3.- Interpretación de resultados

Las muestras con un cociente de RLU/CO $\geq 1,0$ se consideran positivas para los 13 tipos de VPH estudiados (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y las muestras con un valor de RLU/CO $< 1,0$ se consideran negativas. La sensibilidad de la técnica es de 1 pg/ml de ADN de VPH por mililitro de muestra, lo que equivale a 100.000 copias de VPH/ml o 5.000 copias de VPH por ensayo (según indicaciones del fabricante)

1.1.4.- Controles de calidad

La validación del procedimiento requiere la utilización en cada serie de 3 calibradores positivos y 3 calibradores negativos, así como una muestra de control positivo para VPH de alto riesgo y una muestra de control negativa (utiliza sondas de bajo riesgo).

En el caso de que no se cumplan los criterios de calidad interno establecidos previamente en el software del sistema DHCS V.2 (Digene), y alguno de los resultados de calibradores y controles internos estén fuera del rango de validación, se ha de repetir de nuevo todo el procedimiento.

Como controles de calidad externos se han utilizado una serie de muestras procedentes de un programa externo de intercomparación, QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostic, Glasgow, Scotland, UK)

1.2.- Detección y tipado de VPH mediante PCR *microarray*

1.2.1.- *Fundamento*

El método está basado en la amplificación de un fragmento específico de 450 pares de bases (pb) de la región L1 de la cápside viral y posterior hibridación con sondas específicas para cada tipo de VPH.

La región L1 del virus es una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH. Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo viral son sondas específicas. De esta manera, se asegura la especificidad de la detección.

La detección del producto amplificado por PCR se lleva a cabo mediante una plataforma tecnológica basada en *microarrays* de baja densidad denominado CLART® HPV2 (Genómica, Madrid, Spain), lo que simplifica todo el proceso de hibridación y visualización frente a otros sistemas de *arrays* clásicos.

El sistema CLART® HPV2 detecta la presencia de un total de 35 tipos de VPH, ya que incluye 20 sondas de VPH de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58,59, 66, 68, 70, 73, 82 y 85) y 15 sondas de VPH de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 y 89). La clasificación del riesgo oncogénico de esta técnica está basada en Dunne y col., 2007.

1.2.2 Realización del ensayo

1.2.2.1 Extracción de ADN a partir de cepillado cervical en el medio de transporte cervical sampler®

Se agita la muestra invirtiendo varias veces y se transfieren 500 µl de la muestra a un pocillo de la cubeta de lisis del sistema automatizado Nuclisens EasyMag® (bioMérieux, Marcy Etoile, France). Se realiza un procedimiento de lisis interna y extracción de ADN siguiendo las indicaciones del sistema, identificando en el programa que el volumen final de elución es de 110 µl . Cuando finalice la extracción, se cogen 5 µl de este eluido para la reacción de amplificación y se guarda el resto a -20°C.

1.2.2.2. Amplificación de ADN mediante PCR

Se utilizan cebadores que amplifican una región de 450 pb de la región L1 de la cápside viral.

- Se descongela un tubo de reacción (contiene cebadores, nucleótidos y enzimas) por cada muestra que se va a estudiar y se mantiene en hielo. No se deben usar temperaturas superiores a 37°C para la descongelación.
- Se centrifugan los tubos de reacción durante unos segundos en la microcentrífuga para que quede todo el líquido en el fondo del tubo.
- Se añade 5 µl de ADN extraído de las muestras a los tubos de reacción y se resuspende varias veces con una micropipeta. Se dejan los tubos en hielo.
- Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperatura para tubos de 200 µl:

1 ciclo	95°C 5 min
40 ciclos	94°C 30 seg 55°C 60 seg 72°C 90 seg
1 ciclo	72°C 8 min
20°C continuo hasta la recogida de tubos (opcional)	

1.2.2.3. Visualización del producto amplificado en CLART-CS®

- Desnaturalización: se utiliza el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso, se colocan los tubos amplificados en el termociclador y se incuban a 95°C durante 10 minutos. Se programa en el termociclador 15 minutos, para que una vez transcurridos los primeros 10 minutos los amplificados sigan a 95°C y se colocan inmediatamente en un recipiente con hielo.

- Se realiza el procedimiento de visualización siguiendo el esquema indicado (figura 22)

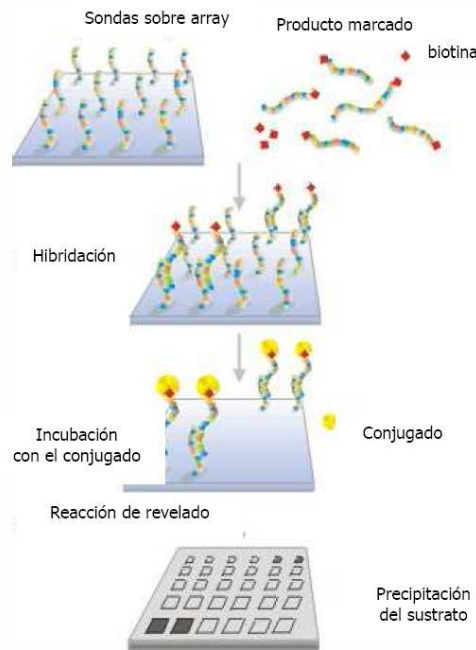
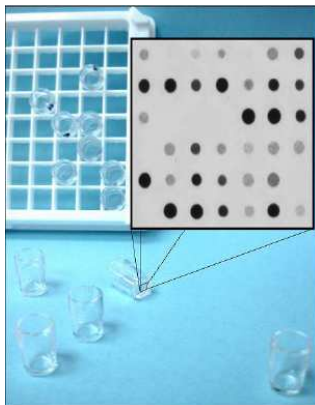


Figura 22: Esquema del método de visualización mediante PCR *microarray*. Las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano, **HorseRadish Peroxidase**). El sustrato o-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

1.2.3.- Interpretación de resultados

La lectura de los resultados del kit CLART® HPV2 se basa en una matriz de puntos que se forma al precipitar sobre un *microarray* de sondas de ADN viral una sustancia insoluble y coloreada (figura 23). La disposición de estas sondas ha sido establecida previamente a la fabricación de los *microarrays*, por lo que es reconocida por un lector automatizado (Alere Technologies GmbH, Alemania), conociéndose el tipo de VPH presente en la muestra.



	70	71	72	73	81	82	83	84	85	89	
51	52	53	54	56	58	59	61	62	66	68	
	18	26	31	33	35	39	40	42	43	44	45
	81	82	83	84	85	89	CA	CG	6	11	16
54	56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73
31	33	35	39	40	42	43	44	45	51	52	53
82	83	84	85	89	CA	CG	6	11	16	18	26
56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73	81
	39	40	42	43	44	45	51	52	53	54	
	CA	CG	6	11	16	18	26	31	33	35	

Figura 23. Formato y disposición de las sondas en el *microarray*

1.2.4.- Controles de calidad

Uno de los principales inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN (degradación por incorrecta conservación o pérdida durante el proceso de extracción), o bien la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (hemoglobina, restos de parafina, sales,..).

Para evitar estos problemas, en cada reacción de PCR se incluyen dos controles internos:

- Un par de oligonucleótidos que actúan como cebadores para un fragmento de 892 pb del gen CFTR humano (CG, control genómico). La no amplificación de este gen pondría de manifiesto la ausencia de ADN del paciente.
- Un par de oligonucleótidos que actúan como cebadores para un plásmido modificado de 120 pb (CA, control de amplificación). La no amplificación de este plásmido indicaría una inhibición del proceso de PCR.

Como controles de calidad externos se han utilizado una serie de muestras procedentes de un programa externo de intercomparación, QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostic, Glasgow, Scotland, UK)

2. Estudio comparativo de la técnica de captura de híbridos frente a la técnica de PCR *microarray*

La técnica de captura híbrida se considera actualmente la técnica de referencia “gold estándar” para estudios de validación clínica de métodos de diagnóstico virológico.

Para la evaluación de la técnica de PCR *microarray*, se seleccionaron de forma prospectiva y aleatoria un total de 210 muestras clínicas recibidas de forma consecutivas en el laboratorio de virología durante un periodo de 4 meses.

Todas las muestras se remitieron mediante cepillado cervical en medio de transporte específico (DNAPap Cervical sampler®, Digene).

La extracción de ADN se realizó en el sistema automatizado Nuclisens EasyMag® (bioMérieux, Marcy Etoile, France) siguiendo las indicaciones del fabricante, a partir de 500 µl de la suspensión celular contenida en el medio de transporte.

Los resultados discrepantes entre la técnica de captura de híbridos y la PCR *microarray* fueron procesados mediante dos métodos alternativos, un sistema de detección y tipado de VPH (InnoLipa® HPV Genotyping extra, Innogenetics, Belgium) y mediante un método de secuenciación (ABBI PRISM 310® Genetic Analyzer (Perkin Elmer, AppliedBiosystems).

2.1. Captura de híbridos (HC2®)

La técnica de captura híbrida (hc2 High-Risk HPV DNA test®, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal y detección por quimioluminiscencia. La técnica se ha realizado siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 1.1.2.

Mediante esta técnica se detectan 13 tipos de VPH de alto riesgo, que incluyen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Las muestras se consideran positivas cuando el valor de RLU/CO \geq 1.0 y negativas cuando es $<$ 1.0.

2.2. PCR *microarray* (CLART HPV2®)

El método está basado en la amplificación de un fragmento específico de 450 pares de bases (pb) de la región L1 de la cápside viral. La técnica se ha realizado siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 1.2.2.

Este método permite la detección de 35 tipos de VPH, de los cuales 20 tipos son de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 y 85) y 15 son de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 y 89). La clasificación del riesgo oncogénico de esta técnica (según indicaciones del fabricante) está basada en Dunne y col., 2007.

2.3. PCR hibridación reversa (INNOLIPA HPV®)

2.3.1.- *Fundamento*

El método está basado en la detección de un fragmento de 64 pb del gen L1 de la cápside viral mediante un procedimiento de hibridación reversa.

Los productos de amplificación, marcados con biotina, son desnaturalizados en condiciones alcalinas e hibridados con sondas específicas en una tira de nitrocelulosa. Después de la hibridación y tras varios procesos de lavado, se añade una solución de conjugado (estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina). Posteriormente se añade el sustrato cromogénico, dimetilformamida, 4-nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) que reacciona con el complejo del conjugado para formar un precipitado de color violeta, con un patrón de banda visible en la tira (figura 24).

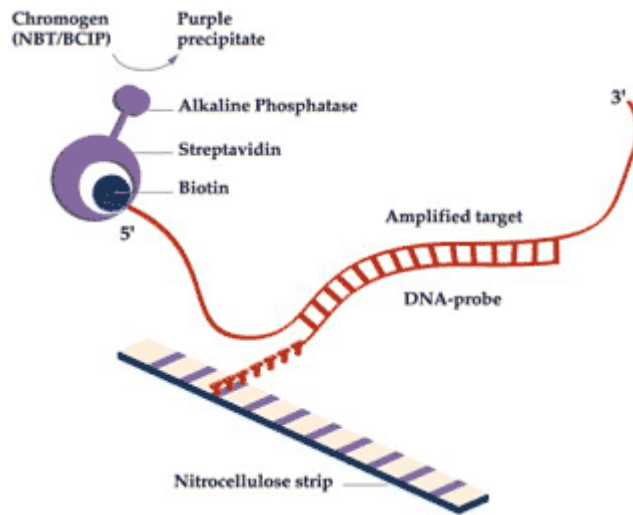


Figura 24. Esquema de la reacción de PCR hibridación inversa (manual instrucciones de Innolipa® HPV)

2.3.2.- Realización del ensayo

EL procedimiento consta de 3 etapas: extracción de los ácidos nucleicos, amplificación mediante PCR e hibridación inversa.

- Extracción de ácidos nucleicos: Se agita la muestra invirtiendo varias veces y se transfieren 200 µl de la muestra a un pocillo de la cubeta de lisis del sistema automatizado Nuclisens EasyMag® (bioMérieux, Marcy Etoile, France). Se realiza un procedimiento de lisis interna y extracción de ADN siguiendo las indicaciones del sistema, identificando en el programa que el volumen final de elución es de 55 µl . Cuando finalice la extracción, se cogen 10 µl de este eluido para la reacción de amplificación y se guarda el resto a -20°C.
 - Amplificación de ácidos nucleicos: Se utilizan cebadores (SPF10) que amplifican una región de 64 pb de la región L1 de la cápside viral.
- Se añaden 10 µl de ADN extraído de las muestras y de un control negativo (10 µl de agua estéril) a cada tubo que contienen 40 µl de master mix (que contienen los cebadores, nucleótidos y enzimas) y se

resuspende varias veces con una micropipeta. Se dejan los tubos en hielo.

- Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperatura para tubos de 200 µl:

1 ciclo	37°C 10 min
1 ciclo	94°C 9 min
40 ciclos	94°C 30 seg 52°C 45 seg 72°C 45 seg
1 ciclo	72°C < 120 min
Al finalizar el proceso almacenar a -20°C ± 5°C o continuar con el proceso	

Al finalizar el proceso de amplificación preparar un gel de agarosa al 3% y visualizar la presencia de una banda de 65pb que indica la presencia de ADN viral.

- Hibridación reversa: Para este proceso se utilizó el sistema automatizado Auto-Lipa 48 (Innogenetics NV) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Se colocan las tiras de hibridación en cada bandeja correspondiente, y se añaden 10µl de solución de desnaturalización y 10µl de producto amplificado. Los controles positivos y negativos se procesan igual que el resto de muestras clínicas.
- Al finalizar el proceso, se dejan secar bien las tiras y se pegan sobre una tarjeta de lectura mediante escáner.

2.3.3.- Interpretación de resultados

Los patrones de bandas deben compararse con el diagrama de interpretación suministrado por el fabricante (lectura manual). En nuestro caso la lectura se realizó mediante un software específico (LiRAS® LiPA HPV, Innogenetics) que permite reconocer la posición de cada uno de las sondas inmovilizadas en las tiras.

Las tiras se componen de una serie de bandas específicas de control necesarias para llevar a cabo la interpretación. Una línea marcador, una línea de control de conjugado, una línea de control celular hDNA (gen humano HLA-DBP1) y dos líneas control de VPH (figura 25)

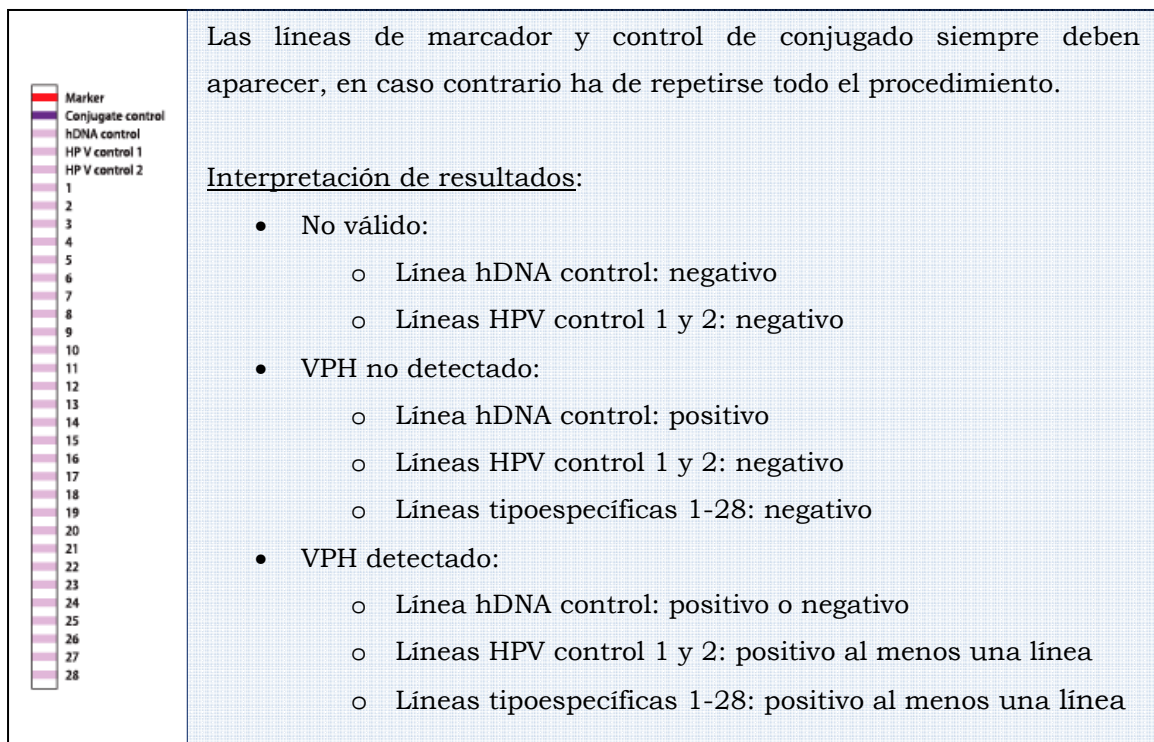


Figura 25. Composición de las tiras de reacción de Innolipa® HPV

Este sistema permite la detección de 28 genotipos, 15 de alto riesgo, 3 de probable alto riesgo, 7 de bajo riesgo y 3 tipos no clasificados, según la clasificación de algunos autores, como Fontaine y col., 2007, Safaeian y col., 2007.

2.3.4.- Control de calidad

En el procedimiento descrito se incluye siempre un control de amplificación positivo que contiene VPH 6 y el gen humano HLAA-DPB1, y debe reaccionar en las siguientes líneas de la tira: control de conjugado, control celular de ADN humano, control de VPH 1 y la línea 1 tipospecífica. Además, también se incluye un control negativo que se procesa simultáneamente con las muestras del paciente en el paso de extracción y de amplificación, de esta forma controlamos la presencia de cualquier contaminación durante todo el proceso.

En la interpretación de los resultados obtenidos mediante los dos métodos de PCR utilizados en este estudio, se observan diferentes criterios en la clasificación del riesgo oncogénico (según se indica en las instrucciones del fabricante). El método de PCR *microarray* clasifica los tipos de VPH en dos grupos (alto y bajo riesgo), mientras que el método de la PCR hibridación reversa clasifica los tipos de VPH en cuatro grupos (alto riesgo, probable alto riesgo, bajo riesgo y no clasificados).

En la tabla 12 se muestran los tipos de VPH detectados por cada una de las técnicas utilizadas en el presente trabajo.

Tabla 12. Tipos de VPH detectados por los métodos estudiados

Genotipos detectados			
Técnica	Alto riesgo	Probable alto riesgo	Bajo riesgo
HC2 (13 tipos)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68		
HPV2 (35 tipos)	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85		6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 89
LIPA (28 tipos)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	26, 53, 66	6, 11, 40, 43, 44, 54, 70 No clasificados: 69, 71, 74
HC2: captura de híbridos	HPV2: PCR <i>microarray</i>	LIPA: PCR-hibridación reversa	

2.4. PCR-secuenciación

Las muestras en las que se observaron discrepancias entre el método de captura híbrida y el método de PCR *microarray*, se estudiaron también mediante una PCR y posterior secuenciación de los productos amplificados.

El protocolo a seguir fue el siguiente:

- Se realizaron reamplificaciones de VPH en cada uno de las muestras discrepantes utilizando como cebadores consenso MY09 (CGTCCMARRGGAWACTGATC) y MY11 (GCMCAGGGWCATAAYAATGG) que amplifican un fragmento de la región L1 del virus (450 pb).

Brevemente, añadimos 2µl del amplificado obtenido en la visualización de la técnica habitual de PCR *microarray* (ver apartado 1.2.2.3), a un volumen final de 50 µl de la master mix (conteniendo mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP9), cebadores MY09 y MY11, Taq DNA polimerasa, Taq DNA polimerasa) y 2,5 mM de MgCl₂ (Roche).

La amplificación se realizó en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystem) con un programa de amplificación que consta de un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 64°C durante 60 segundos y 72°C durante 90 segundos), y un ciclo final de extensión a 72°C durante 8 minutos.

Se realizó de nuevo una 2ª PCR-*seminested* a cada una de las muestras, según el genotipo que se había detectado en la 1ªPCR, para ello se amplificó un fragmento de la región L1 específica de cada tipo detectado. Esto se consigue utilizando un cebador de la amplificación inicial (sense-MY11) y uno o más cebadores (antisense, Genomica SAU, Madrid, Spain), internos de la región a amplificar.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa, Conda) a una concentración del 2% y tampón

TBE 0,5x (Tris-clorhídrico [Tric-HCl] 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM PH 8,4) en cubetas de desarrollo horizontal. La solución se calentó en microondas hasta total disolución y se dejó solidificar en la cubeta de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel con ayuda del tampón de carga (6x) (Sigma, USA). Para determinar el tamaño del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 1.114 pb (“DNA molecular weight marker VIII”, Roche). La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones: 120 voltios, 60 minutos.

Por último los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 10-15 minutos y se visualizaron en un transiluminador de ultravioleta conectado a un equipo de captura de imágenes (U: Genius, Syngene).

Para evitar cualquier problema de contaminación, todos los pasos de la reacción se realizaron en habitaciones separadas, empleando material y reactivos destinados exclusivamente para cada fase.

Se utilizaron controles negativos (agua), clon (el producto de amplificación, teniendo como molde un plásmido con un fragmento clonado de cada uno de los tipos virales y con los oligonucleótidos correspondiente a cada tipo estudiado) y un control positivo (reamplificación del clon).

Los productos de amplificación obtenidos en la PCR-*seminested* se enviaron a secuenciar a un laboratorio externo (Unidad de Biología Molecular de la UAH, Alcalá de Henares). Para ello se recortó la banda del gel correspondiente a la muestra analizada y se purificó mediante el sistema QIAquick Gel Extraction kit® (Qiagen). La secuenciación en el laboratorio externo se realizó utilizando el sistema 3130XL Genetic Analyzer (Perkin Elmer, AppliedBiosystems).

3. Evaluación de dos biomarcadores de progresión oncogénica, marcador citológico (p16/Ki-67) y virológico (ARNm E6/E7).

Se seleccionaron de forma prospectiva y aleatoria un total de 166 muestras citológicas procesadas en el medio líquido BD SurePath™ (Tripath/BD) remitidas al Servicio de Anatomía Patológica procedentes de la consulta de patología cervical.

Las muestras fueron procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica por un citotécnico e interpretadas por el patólogo de la unidad de citologías cérvicovaginales. En la figura 26 se muestra el esquema de procesamiento.



Figura 26. Esquema general de procesamiento de citologías líquidas

En el servicio de Anatomía Patológica se realizaron los siguientes procedimientos:

1°- Preparación de muestras de citología líquida en láminas

2°- Lectura e interpretación de las láminas de citología cérvico-vaginal

3°- Conservación de las muestras residuales, según el criterio siguiente:

- ✓ Muestras de pacientes mayores de 25 años con resultado citológico de ASCUS o LSIL
- ✓ Muestras de pacientes de cualquier edad recogidas de forma aleatorias con resultado citológico de HSIL (utilizadas como control positivo)

Las muestras del sedimento celular residual se conservaron en nevera entre 2-8°C durante un tiempo máximo de 30 días. Durante este periodo se enviaron al laboratorio de virología para su procesamiento.

3.1. Técnica de inmunocitoquímica (Anatomía Patológica)

3.1.1. Método de tinción p16^{ink4a}/Ki-67 (CINtec® PLUS, Roche mtm Laboratories, Heidelberg, Germany).

La tinción doble p16/Ki-67 detecta y tiñe dos biomarcadores simultáneamente, la proteína p16^{ink4a} reguladora del ciclo celular y ampliamente validada, y la proteína Ki-67, un marcador de proliferación celular. La detección simultánea de ambas proteínas en la misma célula es un indicador de la desregulación del ciclo celular que ocurre cuando se produce la transformación oncogénica inducida por VPH de alto riesgo y proporciona un criterio objetivo para identificar aquellas mujeres con más probabilidad de albergar una lesión de alto grado.

Las células positivas con doble reactividad (o tinción dual) muestran una tinción citoplasmática marrón (significa sobreexpresión de p16) y una tinción nuclear roja (expresión de Ki-67) (figura 27).

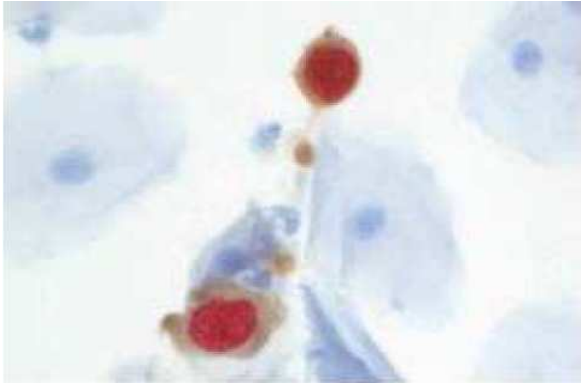


Figura 27. Tinción positiva mediante tinción dual CINTEC® Plus

La interpretación de los resultados de la citología, así como de la tinción p16-Ki67, se realizó por el patólogo experto de la unidad de citologías ginecológicas.

Cuando los resultados de la tinción no fueron concluyentes, se realizó de nuevo todo el procedimiento. Como control de calidad interno se utilizó cada vez que se realizaba la técnica, una muestra citológica con un diagnóstico confirmado de HSIL.

3.2. Método de detección de ARNm E6/E7 (Aptima® HPV, Gen-Probe)

3.2.1.- Fundamento

El método de detección de ARNm (Aptima ® HPV, Gen-Probe) es un método de amplificación de diana por sondas de ácidos nucleicos para la detección cualitativa *in vitro* del ARN mensajero (ARNm) E6/E7 procedente de los 14 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). Este método no discrimina entre los diferentes tipos de VPH.

Los genes de expresión temprana (E6/E7) regulan la replicación vírica del VPH, y son reconocidos como genes que alteran la replicación celular (oncogenes virales). Las proteínas que se expresan a partir del ARNm policistrónico E6/E7 alteran las funciones de las proteínas del

retinoblastoma y la proteína p53 celular, ocasionando la interrupción de los puntos de comprobación del ciclo celular y la inestabilidad del genoma celular.

3.2.1.- Realización del ensayo

Este método consta de tres pasos principales, que tienen lugar en un solo tubo: captura seleccionada, amplificación mediada por transcripción (Transcription-Mediated Amplification, TMA) y detección de los productos de la amplificación mediante el ensayo de protección de la hibridación (Hybridation Protection Assay, HPA). El ensayo incorpora un control interno para supervisar la captura, la amplificación y la detección del ácido nucleico, así como los errores del usuario o del instrumento.

3.2.1.1.- Etapas de captura seleccionada: las muestras se transfieren a un tubo con medio de transporte de muestras, una solución que lisa las células, libera el ARNm y lo protege de la degradación durante la conservación. Para aislar el ARNm diana de la muestra se utilizan oligómeros de captura unidos a micropartículas magnéticas. Los oligómeros de captura contienen secuencias complementarias de regiones específicas de las moléculas diana de ARNm del VPH, así como una cadena de residuos de desoxiadenosina.

- Se añaden 100 µl del reactivo de captura (incluye el control interno) a cada tubo de reacción
- Se añaden 400 µl del calibrador positivo (x3), calibrador negativo (x3) y de cada una de las muestras
- Se tapan los tubos de reacción y se incuban en baño de calor seco a 62°C durante 35 minutos y a 23°C durante 17 minutos.
- Se colocan los tubos de reacción en una base magnética durante 5 minutos. Mediante una bomba de aspiración y vacío, se aspira todo el contenido de los tubos y se añade 1 ml de la solución de lavado a cada tubo.
- Se tapan bien los tubos, se agitan y se ponen en una base magnética durante 5 minutos. Se aspira todo el líquido y se comprueba que en la pared del tubo aparece un sedimento de

partículas magnéticas, en caso contrario se repite el procedimiento de aspiración y lavado.

3.2.1.2.- Amplificación mediada por transcripción (TMA):

La amplificación mediada por transcripción utiliza dos enzimas, la transcriptasa inversa y la ARN polimerasa, para producir millones de copias de ARN diana.

La transcriptasa inversa se utiliza para generar una copia de ADN a partir del ARN diana. La actividad de ribonucleasa H de la transcriptasa inversa degrada el ARN diana original. El segundo cebador se une a la nueva copia de ADN y la transcriptasa inversa crea un dúplex de ADN bicatenario. La ARN polimerasa, a través de la transcripción, crea varias copias de ARN de la plantilla de ADN. Este proceso se repite hasta que todo el reactivo de la reacción se haya agitado. El ARN amplificado, llamado “amplicón” está preparado para hibridarse con la sonda de ácido nucleico marcada. Los pasos seguidos para esta reacción son:

- Se añaden 75 µl de reactivo de amplificación a cada tubo de reacción. Las mezclas de reacción deben dar un color rosado.
- Se añaden 200 µl de aceite mineral y se cubren los tubos con tarjetas de sellado.
- Se colocan los tubos en un baño de calor seco a 62°C durante 10 minutos.
- Se añaden 25 µl de reactivo enzimático (contiene las dos enzimas descritas anteriormente) y se tapan con tarjeta de sellado. Se produce un viraje de color rosado a naranja, en caso contrario se añade de nuevo el reactivo enzimático.
- Se incuban en baño de calor seco a 42°C durante 60 minutos.

3.2.1.3.- Ensayo de protección de la hibridación (HPA):

Para la detección del producto amplificado se utilizan sondas de ácidos nucleicos monocatenarias marcadas que hibridan de forma

específicas con el amplicón. El reactivo de selección diferencia las sondas hibridadas de las no hibridadas, inactivando el marcador de las sondas no hibridadas. Durante la detección, la luz emitida por los híbridos de ARN:ADN marcados se mide con señales de luz expresado como unidades relativas de luz (RLU) en un luminómetro. Los resultados finales del ensayo se interpretan en función del punto de corte como un valor (S/CO).

- Se añaden 100 µl de las sondas de hibridación a cada tubo de reacción. Todas las mezclas de reacción deben pasar a un color amarillo.
- Se tapan con una tarjeta de sellado y se incuban en baño seco a una temperatura de 62°C durante 20 minutos
- Se sacan del incubador y se dejan a temperatura ambiente durante 5 minutos (tiempo crítico).
- Se añaden 250 µl de reactivo de selección a cada tubo. Todas las mezclas de reacción deben pasar a color rosa.
- Se tapan los tubos y se incuban en baño seco a 62°C durante 10 minutos y 23°C durante 2,5 minutos.
- Se retiran los tubos de reacción del incubador y se dejan a una temperatura entre 18°C y 28°C.
- Se prepara el luminómetro LEADER HC+ siguiendo las indicaciones del fabricante.

En la figura 28 se muestra de forma resumida el esquema general de la técnica descrita.

Interpretación de resultados:

El software del lector calcula automáticamente los resultados del estudio. Sólo si se cumplen todos los requisitos de validación interna y de la calibración se interpretan los resultados de las muestras.

Los valores de corte (S/CO) superiores a 0,5 se consideran positivos. En caso de resultados no válidos por inhibiciones del proceso de amplificación, ha de repetirse de nuevo.

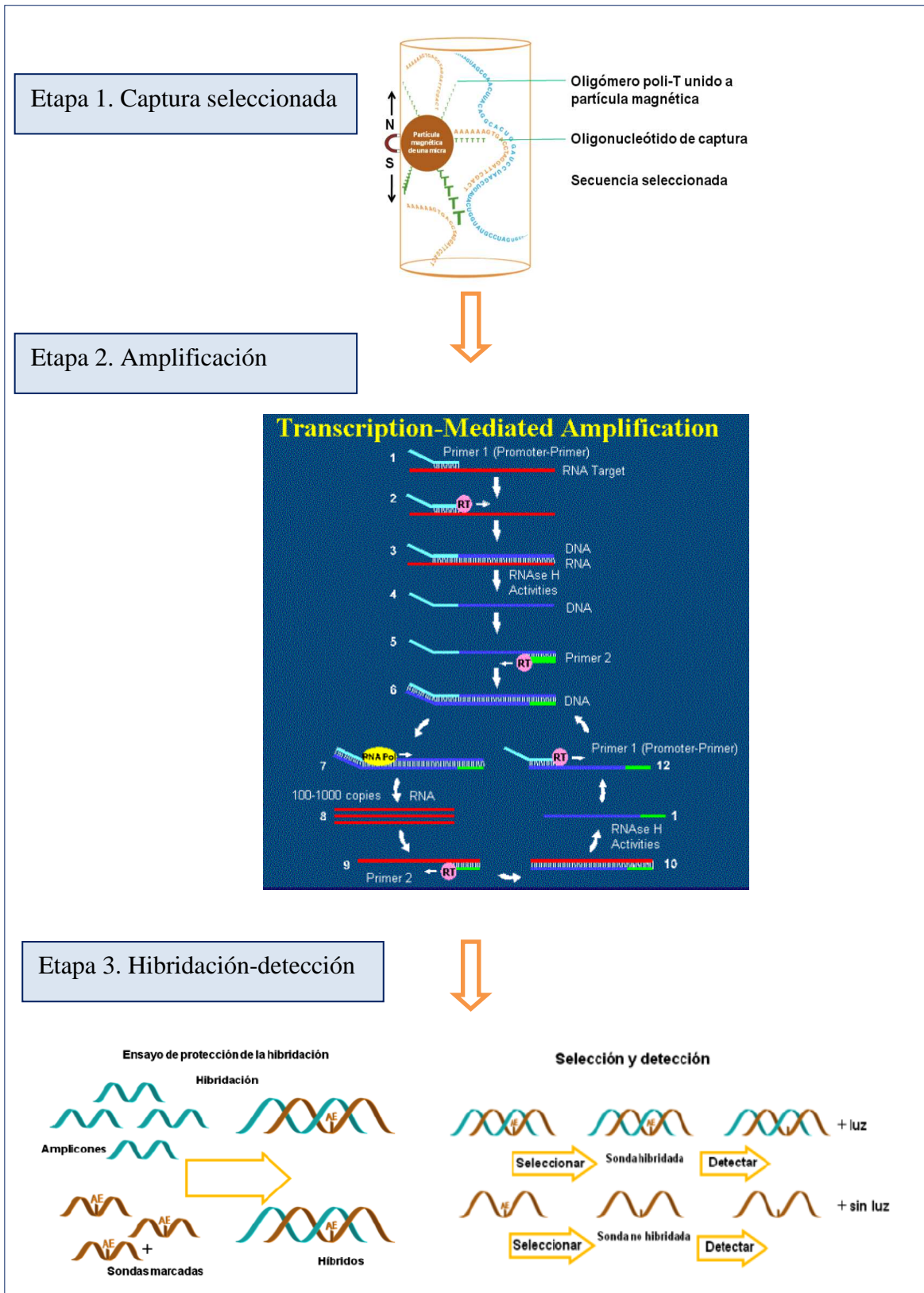


Figura 28. Esquema general de la técnica de detección de ARNm E6/E7

4. Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante conización por lesión cervical de alto grado.

4.1.- Diseño del estudio: selección de pacientes

Se realizó un estudio prospectivo de una cohorte de 130 pacientes seleccionadas de forma consecutivas procedentes del área VII (Murcia/Este).

Criterios de inclusión: mujeres mayores de 21 años sometidas a un tratamiento excisional mediante asa de diatermia por lesión intraepitelial de alto grado.

Criterio de exclusión: mujeres mayores de 21 años con sospecha o evidencia de carcinoma invasivo de cérvix.

El estudio realizado fue aprobado por el Comité Ético hospitalario y todos los pacientes del estudio firmaron el consentimiento informado previo al estudio.

4.2.- Control y seguimiento de pacientes

El seguimiento de los pacientes se realizó en las unidades de patología cervical por ginecólogos especializados. El control y seguimiento de los pacientes tras el tratamiento se realizó a los 6, 12 y 24 meses, y anualmente después de este periodo. En el caso de afectación de márgenes quirúrgicos, el primer control se realizó a los 3 meses.

El control de los pacientes se realizó mediante citología cérvico-vaginal y detección de VPH, así como colposcopia y biopsia en aquellos casos con alguna prueba patológica (figura 29).

En la figura 29 se muestra un esquema resumido del procedimiento de control y seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio.

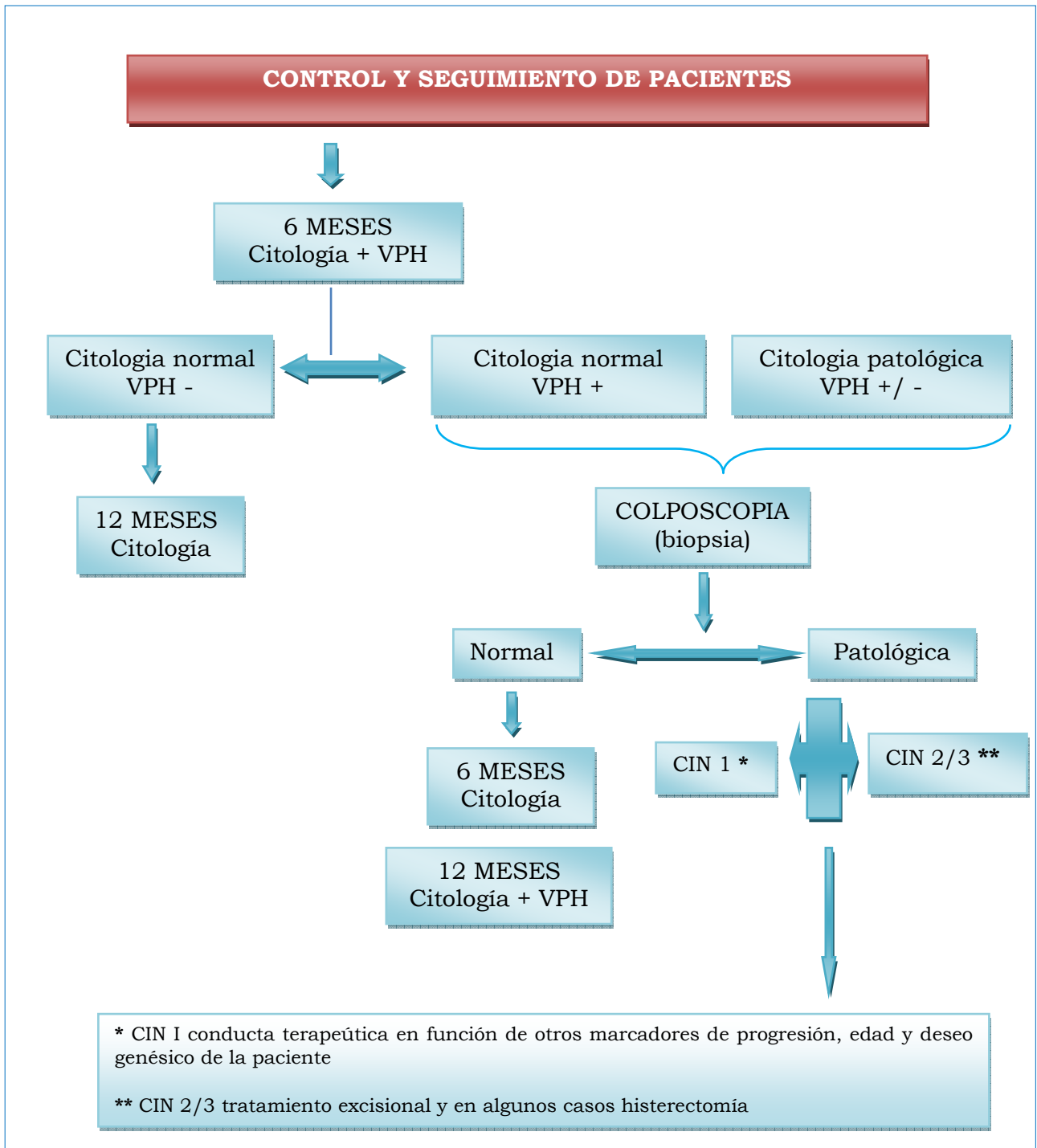


Figura 29. Esquema resumido del seguimiento de pacientes tratadas mediante conización

Consideramos **enfermedad residual** si durante el primer año del seguimiento había una citología patológica y/o VPH positivo, y/o biopsia cervical indicativa de lesión. Las mujeres con dos muestras de citología normales consecutivas, test de VPH negativo y colposcopia normal se consideraron negativas para enfermedad residual, mientras que una citología de HSIL con un resultado histológico de CIN2+ se consideró como una progresión de la enfermedad.

Consideramos **enfermedad recurrente o recidivas** aquellos casos de lesión que aparecen después del primer año de seguimiento, durante el cual habían tenido resultados citológicos normales, test de VPH y/o biopsia negativos.

Los resultado citológicos se clasificaron siguiendo los criterios de Bethesda 2001. Los resultados colposcópicos fueron evaluados siguiendo la clasificación de Rio de Janeiro de 2011 de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia (IFCPC).

Las muestras para el estudio de VPH se recogieron utilizando el cepillo cervical (Digene Cervical Sampler kit®). La detección de VPH se realizó mediante la técnica de captura híbrida (ver apartado 1.1).

IV. RESULTADOS

1. Estudio de prevalencia de infección y genotipos de VPH en mujeres con lesión intraepitelial cervical

Se procesaron un total de 4.449 muestras, procedentes de 3.752 pacientes que fueron remitidos para estudio de infección por VPH durante un periodo de 5 años (1998-2012). Un total de 2.566 muestras (57,7%) fueron negativas en la detección de VPH y 1.883 (42,3%) fueron positivas.

Para el estudio de la detección de VPH y posterior determinación de los genotipos, se excluyeron 80 muestras (4,2%), por presentar un resultado de “inhibición” en la técnica de PCR realizada.

1.1.- Infección y genotipos de VPH según resultado citológico

De un total de 1.803 muestras positivas para VPH, en el presente estudio se han considerado sólo aquellas muestras con resultados citológicos anormales con criterios de ASCUS, LSIL y HSIL. Se han excluido aquellas muestras con resultados de NILM (177 muestras), ASC-H (27 muestras) y AG-US (8 muestras), así como las muestras donde no constaba la información citológica (213 muestras), por no ser representativas del objetivo final del presente estudio (tabla 13).

Para la interpretación del diagnóstico citológico se ha utilizado la clasificación de Bethesda 2001 (ver introducción, apartado 4.1)

La edad media de los pacientes incluidos en el estudio fue de $36,4 \pm 11,1$ años (rango 16-74).

En la tabla 13 se describe la relación de muestras procesadas para el estudio de VPH en relación al resultado citológico, así como las muestras excluidas del estudio. Se han evaluado un total de 2.111 muestras, clasificadas como: 949 (44,9%) ASCUS, 843 (39,9%) LSIL y 319 (15,1%) HSIL.

Tabla 13. Relación de muestras estudiadas según el resultado citológico

Diagnóstico citológico (n)	Muestras VPH	
	Positivas	Negativas
ASCUS (949)	508	441
LSIL (843)	617	226
HSIL (319)	252	67
Otros resultados*: ✓ ASC-H (27) ✓ AGC (8) ✓ NILM (177) ✓ No consta (213)	No evaluado *	

* Muestras excluidas del estudio

ASCUS= células escamosas atípicas de significado incierto
 ASC-H= células escamosas atípicas que no excluyen una lesión de alto grado
 LSIL= lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
 HSIL= lesión escamosa intraepitelial de alto grado
 AGC= células glandulares atípicas
 NILM= negativo para lesión intraepitelial o malignidad

La prevalencia de la infección por VPH se incrementa con el grado de la lesión citológica, pasando del 53,5% en el caso de citología ASCUS hasta el 78,9% en el caso de citología HSIL, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (figura 29).

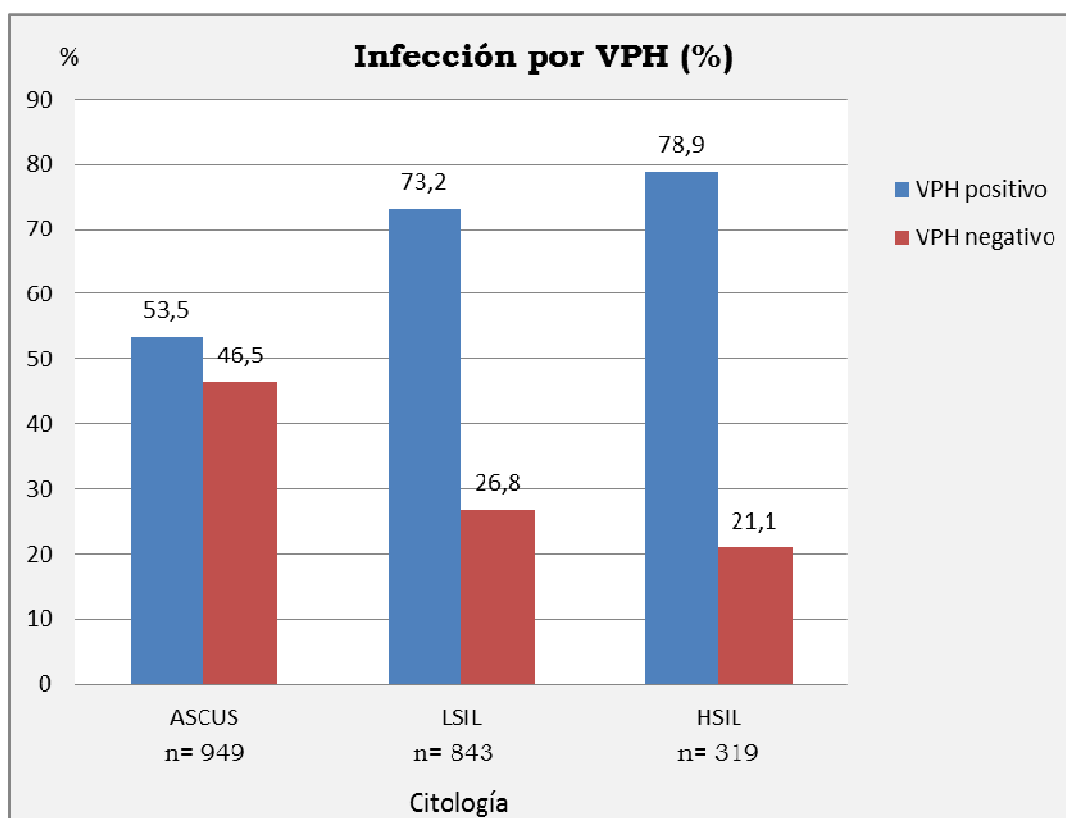
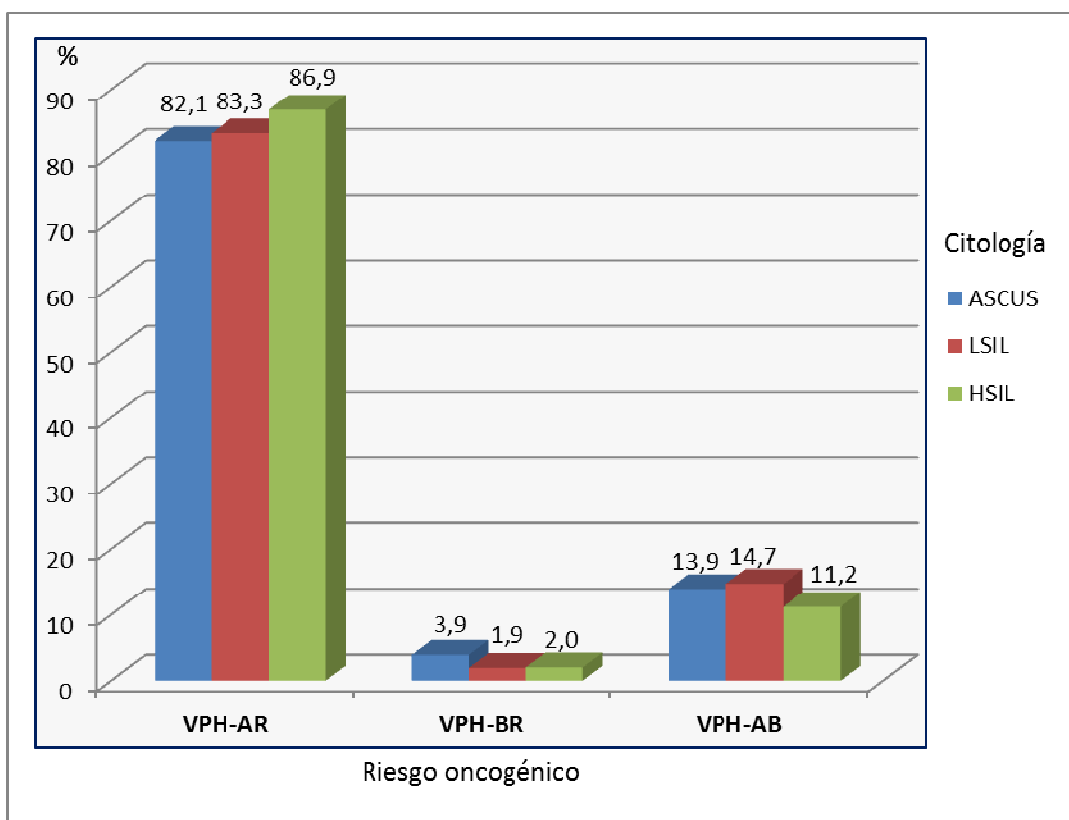


Figura 29. Prevalencia de la infección por VPH según el resultado citológico

En cuanto a la prevalencia de las infecciones por VPH según su clasificación del riesgo oncogénico (ver apartado 2.3 Introducción), se puede observar que el número de infecciones por VPH de alto riesgo (AR), bajo riesgo (BR) o de alto y bajo riesgo (AB), no varían de forma estadísticamente significativas con el grado de lesión citológica ($p>0,15$) (figura 30)



VPH-AR= alto riesgo VPH-BR= bajo riesgo VPH-AB= alto y bajo riesgo

Figura 30. Prevalencia de la infección por VPH según el riesgo oncogénico y el grado de alteración citológica.

Como puede observarse en la figura 30, la presencia de genotipos virales de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR) son poco frecuentes en la mayoría de lesiones citológicas, y generalmente cuando estos genotipos se detectan suelen asociarse a infecciones mixtas con otros genotipos de alto riesgo (VPH-AB).

Se estudiaron las infecciones por VPH según éstas fueran producidas por un solo tipo (infección simple o única) o si eran producidas por más de un tipo de VPH (infección múltiple o coinfección). En nuestro estudio, la infección múltiple representó el 44,5% del total de las infecciones por VPH.

Las infecciones múltiples fueron más frecuentes en lesiones LSIL que en el resto de lesiones, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (figura 31).

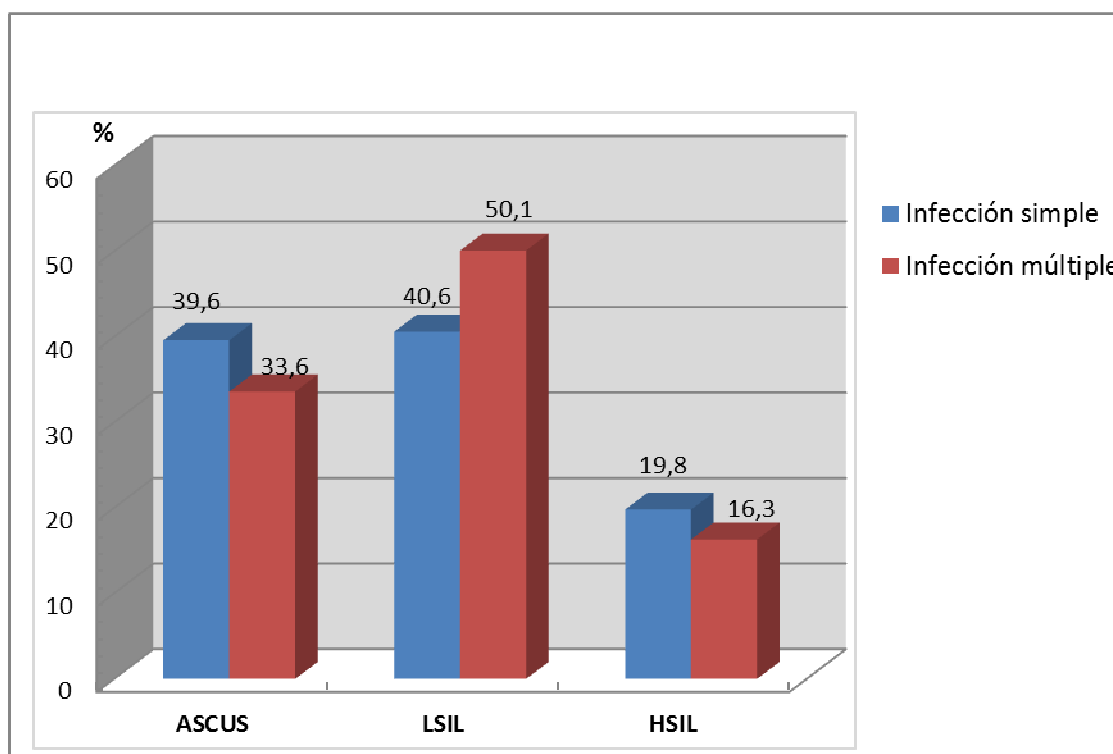


Figura 31. Frecuencia de infección simple o múltiple de VPH según grado de lesión citológica

Entre las infecciones múltiples, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del número de tipos de VPH implicados (2, 3 o más de 4 tipos) y el grado de lesión citológica ($p>0,51$) (figura 32).

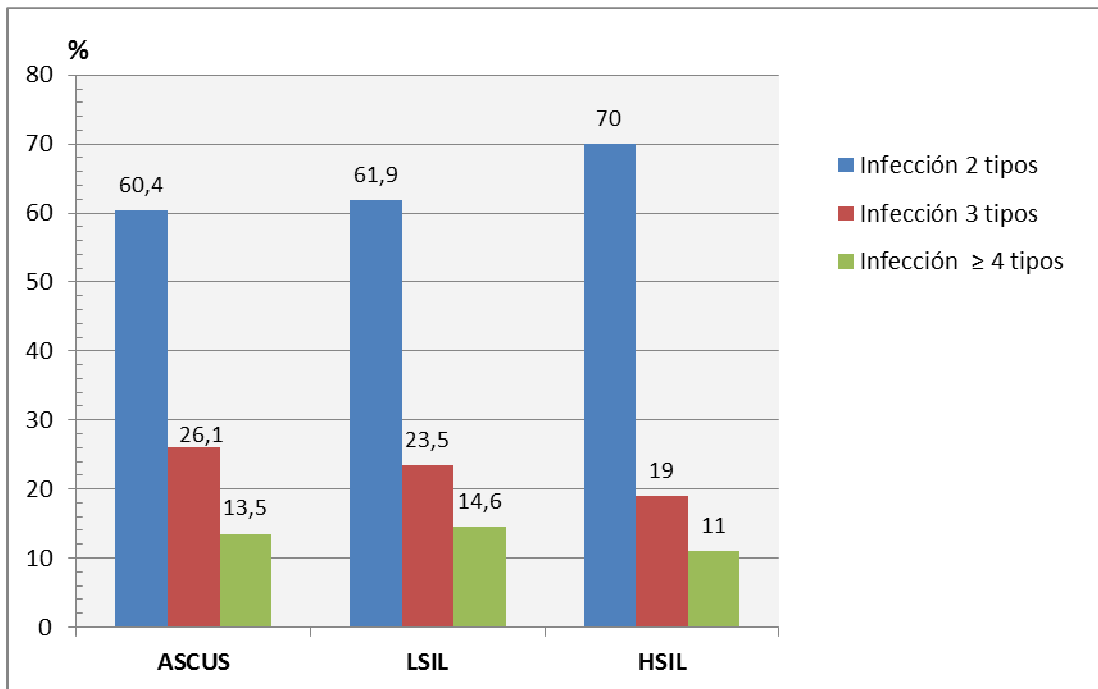


Figura 32. Frecuencia de infecciones múltiples por VPH según el grado de lesión citológica

La frecuencia de distintos genotipos de VPH de alto riesgo según el grado de alteración citológica se muestran en la tabla 14. En el caso de citologías ASCUS los dos genotipos más prevalentes fueron el 16 y el 51, con un 28,4% y un 14,1% respectivamente. En citologías LSIL, los genotipos 16 y 53 con un 27,5% y un 16,5% y en el caso de citologías HSIL los tipos 16 y 31 con un 45,5% y un 15,4% respectivamente.

En el caso de algunos de los genotipos estudiados (16, 53, 56 y 66) se observaron asociaciones estadísticamente significativas según el grado de lesión citológica ($p < 0,0001$) (tabla 14). El genotipo 16 es más frecuente en lesiones HSIL, mientras que los genotipos 53, 56 y 66 son más frecuentes en lesiones LSIL.

Tabla 14. Prevalencia de genotipos de alto riesgo según resultado citológico

Genotipos	ASCUS n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	p
16	139 (28,4)	166 (27,5)	112 (45,5)	p < 0,0001
18	33 (6,7)	32 (5,3)	12 (4,9)	NS
31	62 (12,7)	81 (13,4)	38 (15,4)	NS
33	30 (6,1)	45 (7,4)	18 (7,3)	NS
35	19 (3,9)	15 (2,5)	9 (3,7)	NS
39	26 (5,3)	25 (4,1)	9 (3,7)	NS
45	14 (2,9)	9 (1,5)	6 (2,4)	NS
51	69 (14,1)	83 (13,7)	28 (11,4)	NS
52	56 (11,5)	72 (11,9)	21 (8,5)	NS
53^a	44 (9,1)	100 (16,5)	14 (5,7)	p < 0,0001
56	28 (5,7)	55 (9,1)	5 (2,1)	p < 0,0001
58	59 (12,1)	59 (9,8)	27 (11,1)	NS
66^a	47 (9,6)	81 (13,4)	11 (4,5)	p < 0,0001

^a Probable alto riesgo (según Muñoz y col., 2003)

NS: no asociación significativa

Para evaluar el potencial impacto preventivo de las dos vacunas comercializadas frente al VPH, y teniendo en cuenta la protección cruzada (descrita por el fabricante) frente a distintos tipos virales relacionados genéticamente, se ha realizado un estudio de prevalencia basado en la combinación de la clasificación filogenética (Villiers y col., 2004) y la clasificación del riesgo oncogénico propuesta por Muñoz y col., 2003 (figura 33). La “especie 9” (denominado “grupo VPH16”) es más frecuente en lesiones HSIL que en el resto de lesiones, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). La “especie 7” (denominado “grupo VPH18”) es más frecuente en lesiones ASCUS que en lesiones LSIL y HSIL, sin embargo no observamos diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,06$).

Observamos que la “especie 6”, que incluye dos tipos de VPH de probable alto riesgo, el tipo 53 y el 66 (Muñoz y col., 2003), es más frecuente en lesiones LSIL que en el resto de lesiones, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

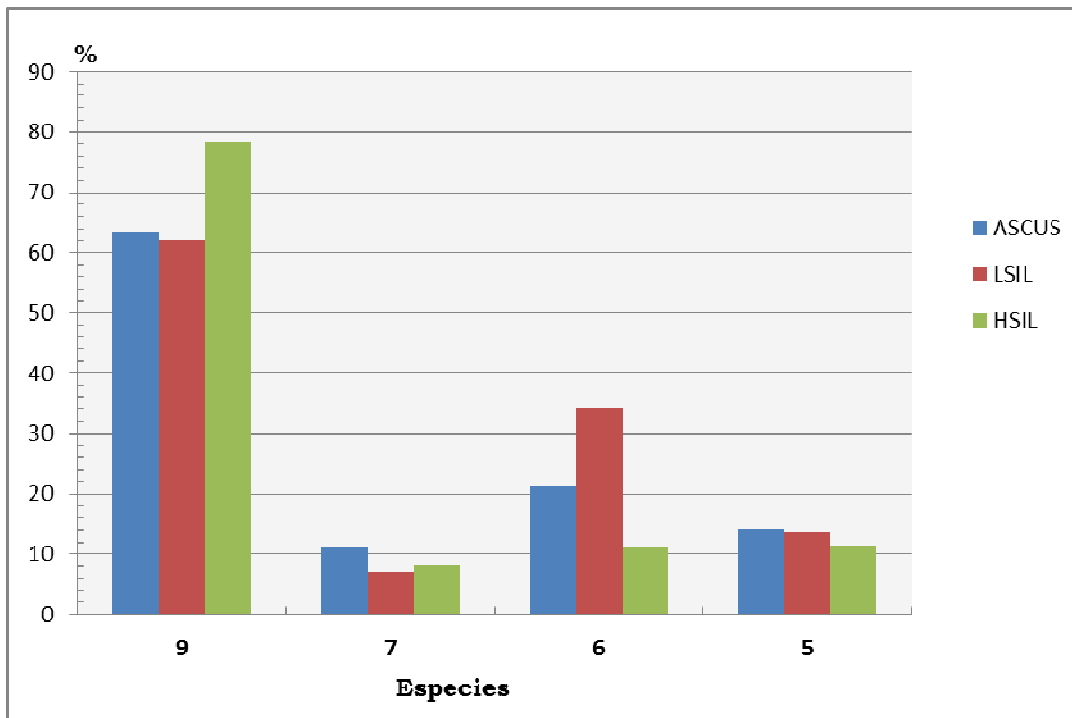


Figura 33. Prevalencia de grupos filogenéticos de VPH de alto riesgo según citología

Especie 9: tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58

Especie 7: tipos 18, 39, 45

Especie 6: tipos 53, 56, 66

Especie 5: tipo 51

La técnica de captura híbrida utilizada en el presente trabajo, presenta una sensibilidad de 1 picogramo de ADN/ml y se corresponde con el punto de corte establecido en dicha metodología $RLU/CO \geq 1,0$. Estos valores relativos son proporcionales a la cantidad de ADN viral presente en la muestra, lo que aporta una medida semicuantitativa de la carga viral.

Para poder establecer si existe alguna correlación entre los valores de lectura obtenidos y el grado de lesión citológica, se han establecido 4 categorías:

Categorías	Punto de corte (RLU/CO)
A) Carga viral baja	1,0 – 10
B) Carga viral moderada	10 – 100
C) Carga viral alta	100 – 1.000
D) Carga viral muy alta	> 1.000

Los resultados obtenidos en las diferentes categorías y el grado de alteración citológica se muestra en la figura 34.

Los niveles de carga viral bajos (categoría A) son más frecuentes en ASCUS que en lesiones LSIL y HSIL, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Los niveles de carga viral altos (categoría C) son más frecuentes en HSIL que en el resto de lesiones, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Los niveles de carga viral muy altos (categoría D) son más frecuentes en lesiones LSIL que en HSIL que en ASCUS, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,06$) (figura 34)

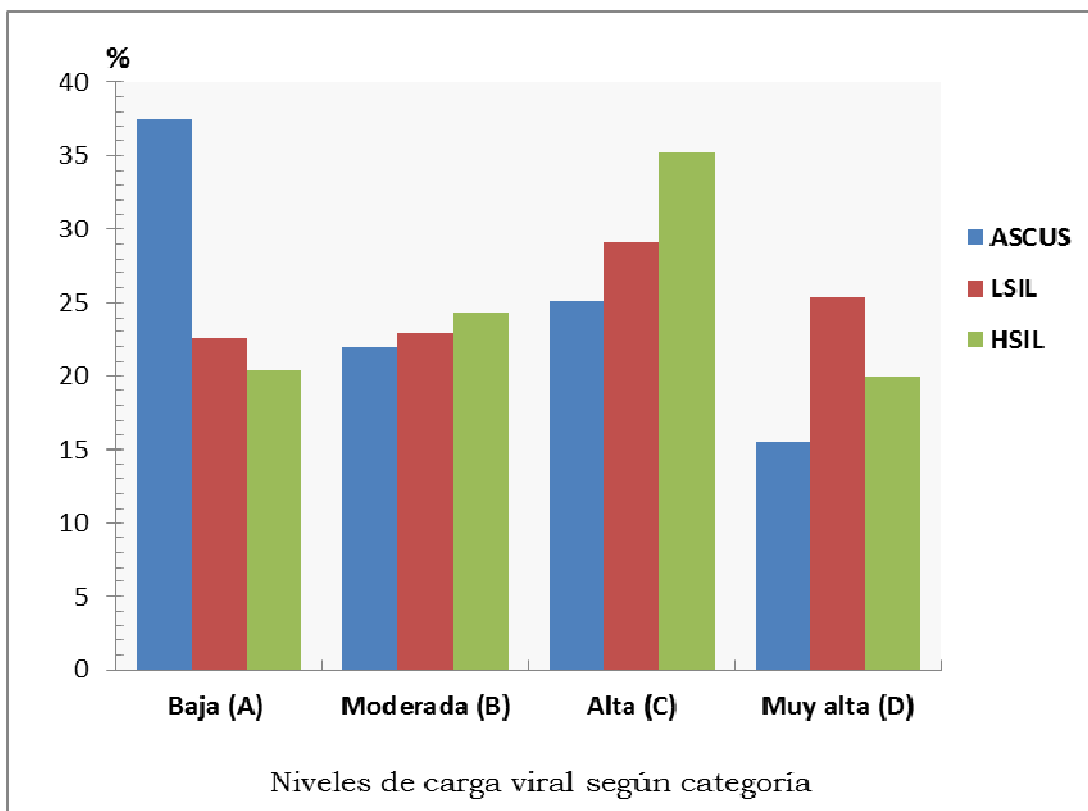


Figura 34. Correlación entre distintos niveles de carga viral y lesión citológica

1.2.- Infección y genotipos de VPH por rangos de edad

Para realizar este estudio los pacientes se estratificaron por grupos de edad, desde menores de 25 años hasta mayores de 55 años. Se observó una mayor prevalencia de infecciones por VPH de alto riesgo en el rango de edad de menores de 34 años. Las infecciones por VPH de bajo riesgo fueron poco frecuentes, desde valores del 15,7% en menores de 25 años hasta el orden de 6% en mayores de 55 años (figura 35).

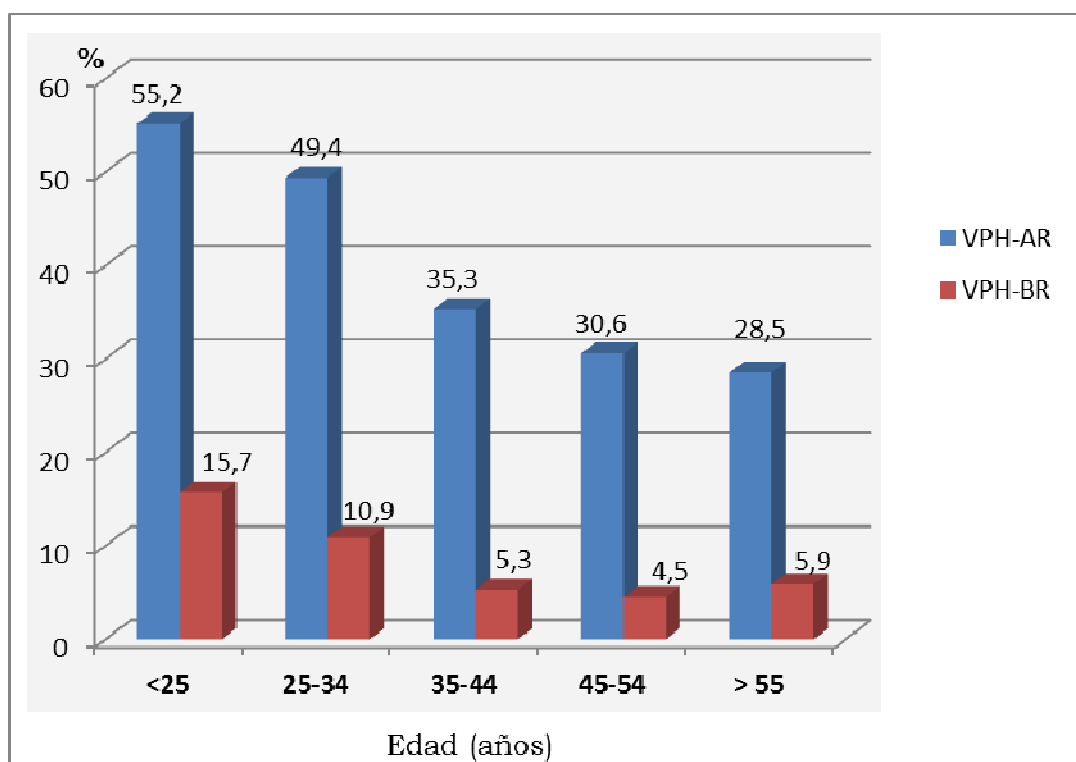


Figura 35. Prevalencia de infección por VPH según rangos de edad

Se estudiaron las infecciones por VPH según éstas fueran producidas por un solo tipo (infección simple o única) o por más de un tipo de VPH (infección múltiple o coinfección). Las infecciones múltiples fueron más frecuentes en el grupo de edad de 25-34 años, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (figura 36).

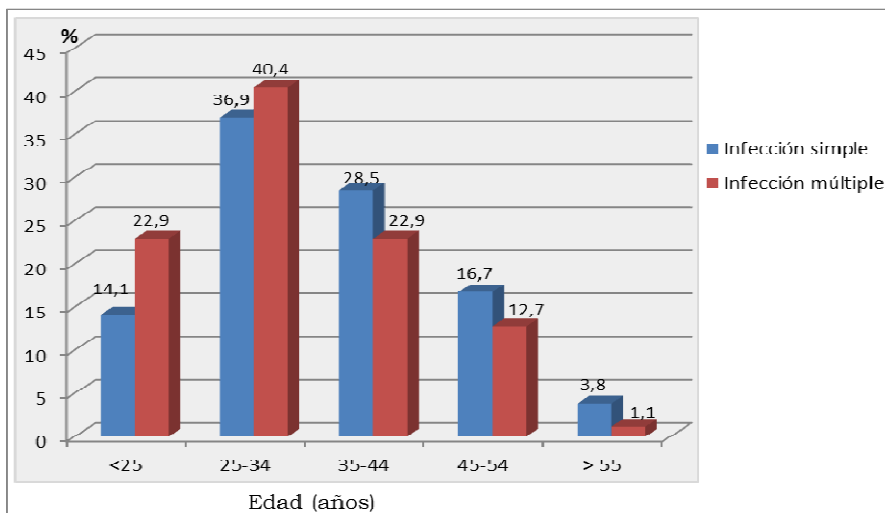


Figura 36. Frecuencia de infecciones múltiples por VPH según la edad

Entre las infecciones múltiples, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del número de tipos de VPH implicados (2, 3 o más de 4 tipos) y el rango de edad ($p > 0,51$) (figura 37).

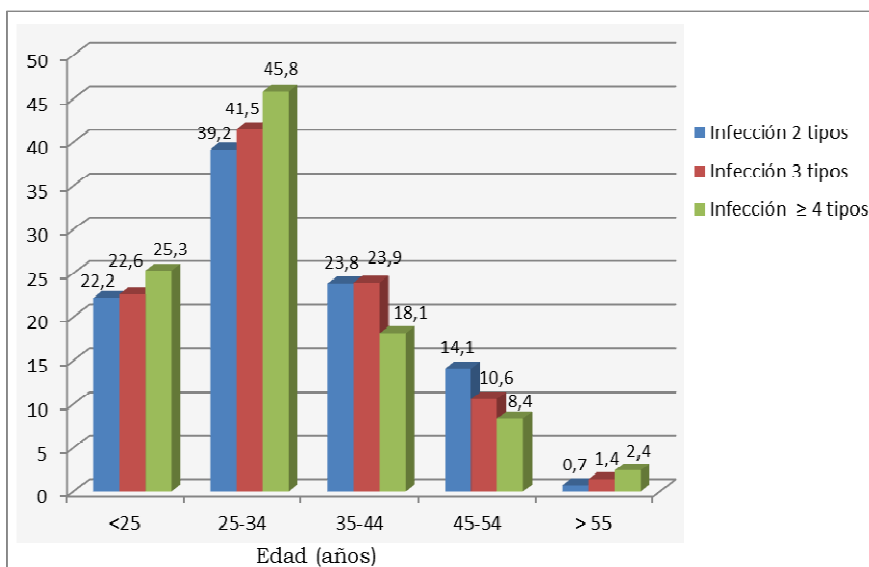


Figura 37. Prevalencia de infecciones múltiples por VPH según edad

El genotipo más prevalente en todos los grupos de edad fue el tipo 16 (promedio: 30,4%). Entre los genotipos vacunales de alto riesgo (16/18), destacamos la baja prevalencia del genotipo 18 (promedio: 5,7%) en todos los grupos de edad (tabla 15).

No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de los distintos genotipos por rangos de edad, a excepción de los genotipos 56 y 66.

El genotipo 56 se detectó con más frecuencia en el grupo de mayores de 55 años (15,9%), siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p < 0,02$). El genotipo 66 se detectó con más frecuencia en menores de 25 años (17%), siendo esta asociación estadísticamente significativo ($p < 0,004$).

Tabla 15. Distribución de genotipos de VPH alto riesgo por grupos de edad

Genotipos	Porcentaje (%)					p
	< 25 (n=235)	25-34 (n=513)	35-44 (n=350)	45-54 (n=196)	> 55 (n=44)	
16	27,7	31	35,7	28,1	29,5	NS
18	6,4	6,2	3,4	8,2	4,5	NS
31	17,4	12,6	12,6	14,3	4,5	NS
33	7,7	8,4	6,9	3,6	2,3	NS
35	2,6	3,3	3,4	4,1	0	NS
39	3,8	5,1	5,4	2	4,5	NS
45	3	1,9	1,7	2,6	2,3	NS
51	12,8	13,6	12,9	13,9	18,2	NS
52	9,8	10,7	11,4	12,8	13,6	NS
53	14,5	11,7	10,3	11,2	11,4	NS
56	6,4	6,8	4	8,7	15,9	p < 0,02
58	13,2	10,3	8,9	13,8	6,8	NS
66	17	10,1	7,7	7,7	9,1	p < 0,004

NS: no significación estadística ($p > 0,05$)

1.3.- Infección y genotipos de VPH por áreas sanitarias

Los resultados del estudio de la detección de VPH según el área sanitaria de procedencia de las muestras clínicas se muestran en la tabla 16. Los resultados positivos obtenidos en la detección de VPH varían desde un 32,8% en el área VII, a un porcentaje del 49,8% en el área I.

Tabla 16. Resultados de la detección de VPH por áreas sanitarias

Área sanitaria	Nº muestras VPH +/total	Porcentaje (%)
I-Murcia/Oeste	452/907	49,8
III-Lorca	330/771	42,8
IV-Noroeste	73/210	34,7
V-Altiplano	151/302	50
VII-Murcia/Este	461/1.405	32,8
VIII-Mar Menor	172/310	55,5
IX-Vega Alta del Segura	164/462	35,5
TOTAL	1.803/4.367	41,3

Para el estudio del genotipo de VPH se utilizó la clasificación de Muñoz y col. 2003, si bien incluimos en el estudio los genotipos clasificados como probable alto riesgo (26, 53, 66) dentro del grupo de alto riesgo. Los resultados globales de prevalencia de genotipos se muestran en la figura 37.

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que los 4 genotipos más prevalentes son el tipo 16, 31, 51 y 53, que corresponde a un 70% del total (figura 37).

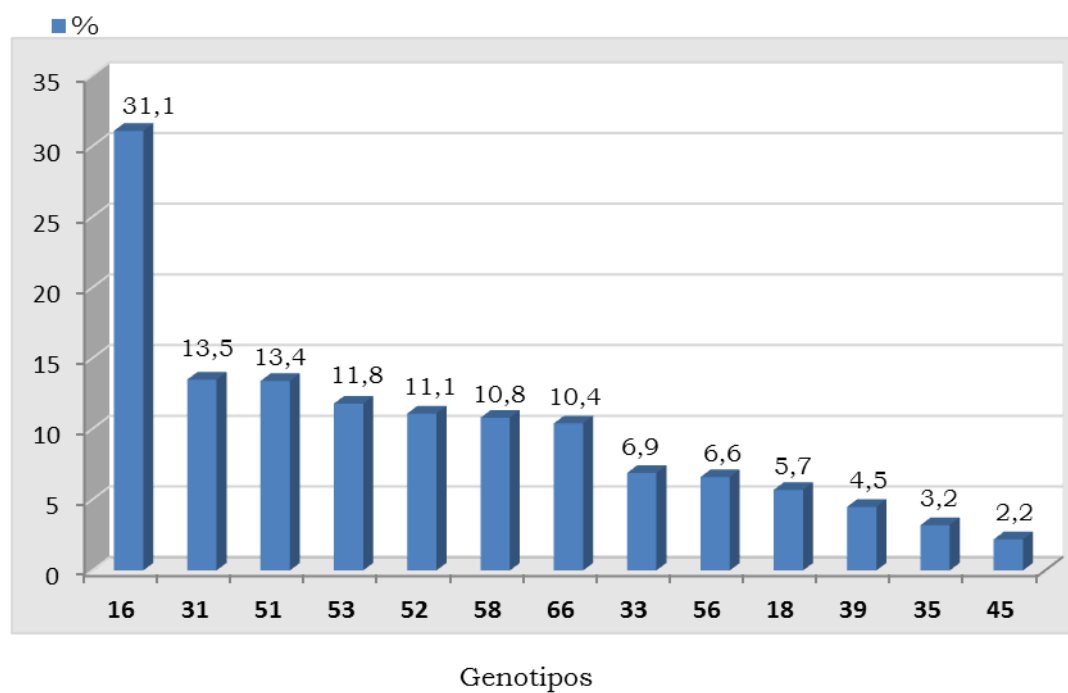


Figura 37. Prevalencia global de genotipos de VPH en todas las áreas

La distribución de genotipos en las distintas áreas sanitarias se muestran en la tabla 17. En todos los casos predomina el genotipo 16, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas áreas sanitarias ($p > 0,05$).

No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de ninguno de los genotipos estudiados entre las distintas áreas sanitarias, excepto en la distribución del genotipo 45 que fue más prevalente en el área sanitaria III-Lorca ($p < 0,006$).

Tabla 17. Prevalencia de genotipos por áreas sanitarias de Murcia

Genotipos	Porcentaje (%)							p
	Área I	Área III	Área IV	Área V	Área VII	Área VIII	Área IX	
16	33,7	28,5	40,7	27,7	28,9	34,6	33,3	NS
18	8,1	3,7	3,4	5,4	6,6	5,6	3,8	NS
31	12,5	13,5	8,5	17,7	13,1	15	13,8	NS
33	10,1	8,2	3,4	3,1	6,9	6,5	3,1	NS
35	2,4	2,6	3,4	3,1	4,3	3,7	3,1	NS
39	4,4	3	3,4	5,4	5,4	6,5	3,1	NS
45	0,7	4,9	3,4	0	2,6	0	2,3	p < 0,006
51	16,2	13,5	16,9	9,2	11,7	8,4	18,5	NS
52	10,1	13,5	13,6	8,5	11,4	7,5	12,3	NS
53	11,8	10,9	6,8	13,8	11,7	14	12,3	NS
56	6,7	7,1	5,1	6,2	7,1	6,5	4,5	NS
58	10,1	12,7	8,5	11,5	10	7,5	13,8	NS
66	10,8	9	10,2	7,7	12	10,3	10,8	NS

*En color sombreado se indican los 4 tipos más frecuentes en cada área

NS: no significación estadística ($p > 0,05$)

2. Evaluación del método de PCR-*microarray* frente a la técnica de captura de híbridos.

Realizamos un estudio aleatorio con 210 muestras clínicas recibidas de forma consecutiva durante un periodo de 4 meses procedentes de la rutina asistencial.

Para el estudio comparativo de la técnica de PCR-*microarray* (CLART HPV2®, Genómica) y la técnica de captura de híbridos (HC2®, Qiagen), se tuvieron en cuenta los genotipos detectados por cada una de ellas, siguiendo las indicaciones del fabricante.

La técnica de captura híbrida detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y se considera positiva cuando el valor de RLU/CO ≥ 1.0 .

La técnica de PCR-*microarray* detecta 35 tipos, de los cuales 20 son VPH de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 y 85) y los otros 15 tipos de bajo riesgo. Se considera positiva cuando se cumplen los requisitos establecidos por el software del lector automatizado.

Para efectuar el estudio comparativo entre ambos métodos, hemos realizado una subclasificación dentro de la PCR-*microarray* en 2 tipos, uno de ellos que incluiría los mismos 13 tipos de alto riesgo detectados en la captura de híbridos (**CLART-AR13**) y la otra clasificación que incluiría a los 20 tipos de alto riesgo incluidos habitualmente (**CLART-AR20**).

Del total de muestras remitidas, un 48.1% (101) presentaban un resultado citológico de ASCUS, un 36.2% (76) un resultado de LSIL y un 15.7% (33) un resultado de HSIL.

2.1.- Resultados de concordancia entre los métodos estudiados

Los índices de concordancia (κ) de las diferentes técnicas evaluadas variaron entre 0,89 y 0,99. Los resultados de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados comparativos entre los métodos evaluados en el estudio

	HC2		Concordancia (% ± SD)	Indice K (IC 95%)	Sensibilidad (%) (IC 95%)	Especificidad (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
	P 100	N 101						
CLART-AR13								
P	89	0	94,7 ± 3,1	0,89 (0,83 – 0,95)	89,0 (81,2 – 94,4)	100 (96,7 – 100)	100 (95,9 – 100)	90,9 (84,3 – 95,4)
N	11	110						
CLART-AR20								
P	99	0	99,5 ± 1,0	0,99 (0,97 – 1,0)	99,0 (94,6 – 100)	100 (96,7 – 100)	100 (96,3 – 100)	99,1 (95,1 – 100)
N	1	110						

HC2: Captura híbrida

CLART-AR13: PCR-*microarray* 13 tipos alto riesgo (similares a HC2)

CLART-AR20: PCR-*microarray* 20 tipos alto riesgo incluidos en la técnica

2.2.- Resultados de discrepancias entre los métodos estudiados

Las discrepancias observadas entre los métodos estudiados se han evaluados mediante 2 métodos alternativos, una técnica de PCR-hibridación reversa (INNOLipa®, Innogenetics, Belgium) (ver apartado 2.3) y mediante PCR secuenciación (ver apartado 2.4)

Los resultados discrepantes se muestran en la tabla 19. Se observa que la mayoría de estas discrepancias (9/11) son debidas a reacciones cruzadas o inespecíficas entre algunos tipos de alto riesgo (53, 66, 73, 82) y las sondas específicas utilizadas en la captura de híbridos. En la mayoría de los casos discrepantes, el resultado citológico era de ASCUS (7/11).

Tabla 19. Resultados discrepantes entre captura híbrida y PCR-*microarray*

Muestra	Citología	Metodos confirmatorios				
		HC2 (RLU/CO)	PCR-AR13 (Tipos)	PCR-AR20 (Tipos)	Innolipa (Tipos)	Secuenciación (Tipos)
23	ASCUS	POS 4,75	NEG	POS VPH 70	POS VPH 70	POS VPH 70
26	ASCUS	POS 757	NEG	POS VPH 53/82	POS VPH 53/82	POS VPH 53/82
52	ASCUS	POS 4,63	NEG	NEG	NEG	POS VPH 6
83	ASCUS	POS 21,77	NEG	POS VPH 82	POS VPH 82	POS VPH 82
88	LSIL	POS 250	NEG	POS VPH 53	POS VPH 53	POS VPH 53
95	ASCUS	POS 142	NEG	POS VPH 70	POS VPH 70	POS VPH 70
96	LSIL	POS 655	NEG	POS VPH 82	POS VPH 82	POS VPH 82
109	LSIL	POS 5,0	NEG	POS VPH 73	NEG	POS VPH 73
119	ASCUS	POS 50,56	NEG	POS VPH 53	POS VPH 53	POS VPH 53
138	ASCUS	POS 194,1	NEG	POS VPH 66	POS VPH 66	POS VPH 66
172	HSIL	POS 1,47	NEG	POS VPH 53	POS VPH 6/53	POS VPH 6/53

2.3.- Resultados de los métodos confirmatorios utilizados

Los resultados discrepantes entre las dos técnicas estudiadas se evaluaron mediante dos métodos alternativos: PCR hibridación reversa y mediante PCR secuenciación.

Los resultados obtenidos de las muestras discrepantes mediante la técnica de la PCR hibridación reversa se muestran en la figura 38.



Figura 38. Resultados obtenidos mediante PCR hibridación reversa

Tal y como puede observarse en la figura 38, las calles 3 y 8 que corresponden a los nºmuestras 52 y 109 respectivamente, dieron un resultado negativo, y por tanto estos resultados no pudieron confirmar las discrepancias observadas en el estudio.

En la figura 39 se muestran los resultados obtenidos en la 1ª PCR de amplificación previa al proceso de secuenciación, utilizando inicialmente los cebadores MY09 (CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC) y MY11 (GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG).

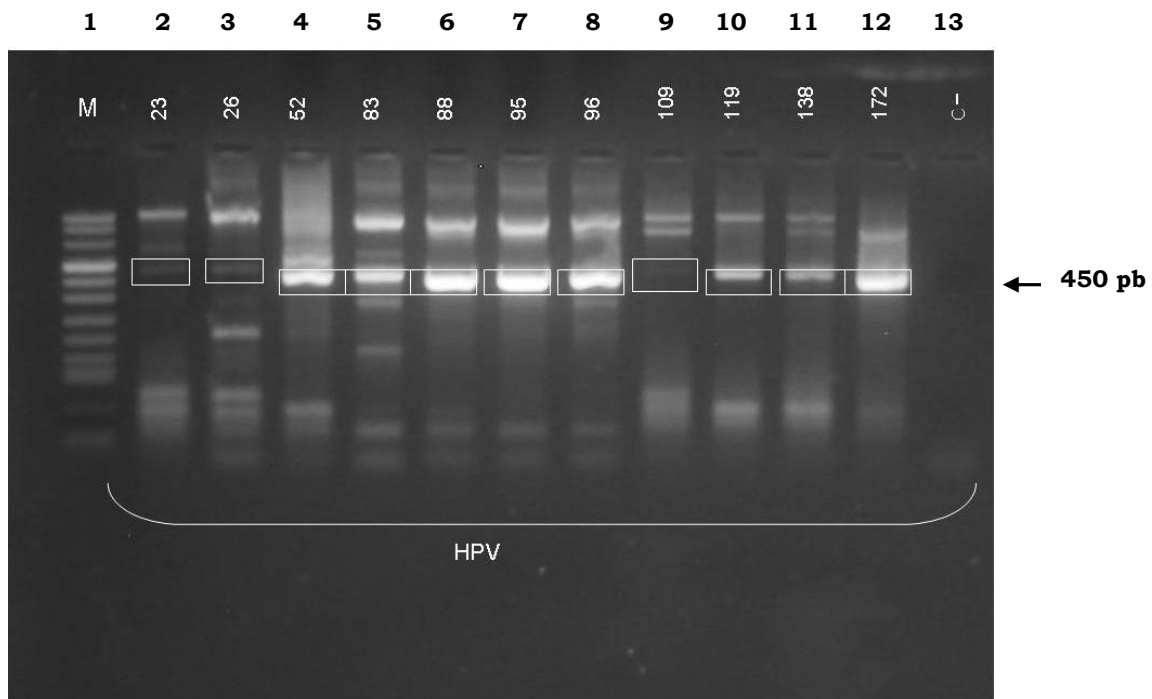


Figura 39. Resultados obtenidos en la 1ª PCR amplificación.

Calle 1 (M): marcador de peso molecular 1.114 pb

Calle 2-12: muestras de pacientes con resultados discrepantes
(debajo de cada calle se indica el número de muestra)

Calle 13 (C-): control negativo (agua)

Como se muestra en la figura anterior, las líneas 2, 3 y 9 correspondientes a las muestras 23, 26 y 109 respectivamente, presentaron una intensidad de la banda de 450 pb muy débil. En el caso de la muestra 109, el resultado obtenido mediante la PCR hibridación reversa fue negativo, posiblemente debido a una baja concentración de ADN.

A partir del amplificado utilizado en la visualización de la PCR-*microarray*, se realizó una PCR-*seminested* utilizando un cebador de la amplificación inicial (sentido, MY11) y uno o más cebadores (antisentido).

Los resultados obtenidos de la PCR-*seminested* se muestran en la figura 40. Se utilizó un control negativo (agua), control del clon (el producto de amplificación, teniendo como molde un plásmido con un fragmento clonado del virus correspondiente y con los oligonucleótidos correspondientes a cada tipo viral) y un control positivo (reamplificación del clon).

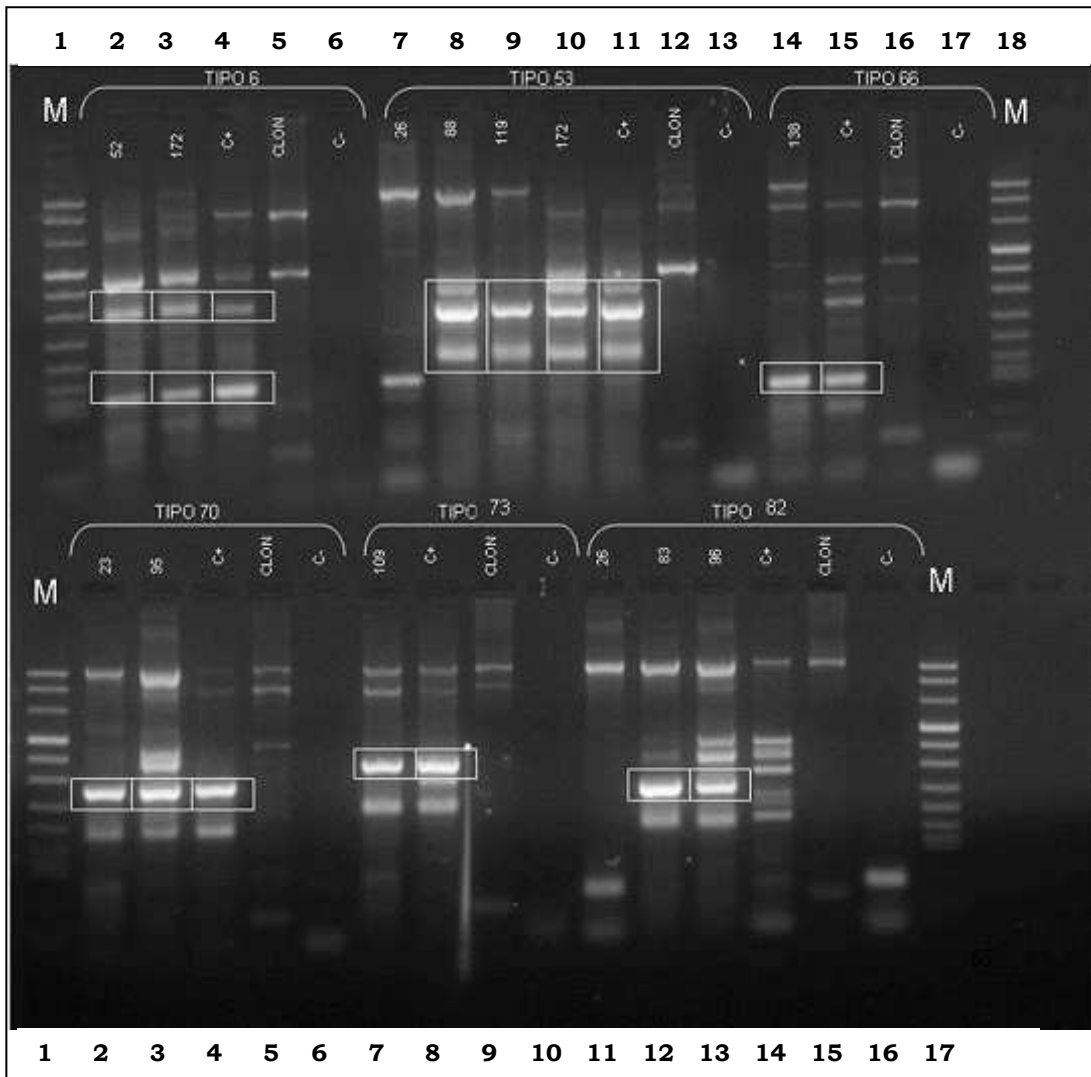


Figura 40. Resultados obtenidos en la PCR-*seminested*.

- Calle 1,18 (M): marcador de peso molecular 1.114 pb
- Calle 2-6 (superior): muestras de pacientes con VPH tipo 6
- Calle 7-13 (superior): muestras de pacientes con VPH tipo 53
- Calle 14-17 (superior): muestras de pacientes con VPH tipo 66
- Calle 2-6 (inferior): muestras de pacientes con VPH tipo 70
- Calle 7-10 (inferior): muestras de pacientes con VPH tipo 73
- Calle 11-16 (inferior): muestras de patients con VPH 82

A partir de los resultados obtenidos en la PCR-*seminested*, excepto en el caso de la muestra 26 (calle 7, superior), se procedió a cortar y purificar cada una de las bandas obtenidas y su envío a un laboratorio externo para su secuenciación. En el caso de la muestra 26, este procedimiento se hizo con la banda obtenida en la 1ªPCR de amplificación (figura 39, calle 9).

3. Evaluación de dos biomarcadores de progresión oncogénica, marcador inmunocitoquímico (p16/Ki-67) y marcador virológico (ARNm E6/E7)

Se estudiaron un total de 166 muestras consecutivas de citologías líquidas procedentes de la rutina asistencial recibidas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

Las muestras citológicas fueron remitidas desde la consulta de patología cervical por sospecha de alteración citológica compatible con infección por VPH.

La edad media de los 166 pacientes incluidos en el estudio fue de 39,8 años (rango 25-83). En 53 casos (32%) el resultado citológico correspondía a lesión ASCUS y en 113 casos (68%) fueron de LSIL.

Se realizó el estudio virológico a partir del sedimento celular residual de la citología líquida Surepath® , una vez que la muestra se había procesado para el estudio citológico.

3.1.- Resultados de concordancia entre los métodos evaluados

La concordancia global obtenida en los dos métodos evaluados fue de 86,1%, con un índice κ de 0,71. Valores de índice κ entre 0,4-0,6 se consideran moderados y entre 0,6-0,8 se consideran como buenos (tabla 20).

Tabla 20. Concordancia global entre los métodos p16/Ki-67 y ARNm E6/E7

	ARNm E6/E7	
	Positivo	Negativo
p16/Ki-67 Positivo	85	8
p16/Ki-67 Negativo	15	58

Concordancia = 86,1% Índice κ = 0,71 (IC95%:0,61-0,82)

Los resultados obtenidos por ambos métodos en el caso de resultados citológico de ASCUS y LSIL se muestran en la tabla 21 y 22 respectivamente.

Se observó una concordancia moderada ($\kappa=0,49$) para estudios de citologías ASCUS (tabla 21) y una buena concordancia ($\kappa=0,70$) en el caso de citologías LSIL (tabla 22).

3.2. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Los resultados de los distintos parámetros evaluados se muestran en la tabla 21 en el caso de ASCUS y en la tabla 22 en el caso de LSIL.

Tabla 21. Resultados obtenidos en citologías ASCUS

	__ p16-Ki67 __		S	E	VPP	VPN
	P	N	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
ARNm E6/E7						
Positivo	8	4	57,1	89,7	66,7	85,4
Negativo	6	35	(28,9-82,3)	(75,8-97,1)	(34,9-90,1)	(70,8-94,4)

Concordancia = 81,1%

Índice κ = 0,49 (IC 95%: 0,22-0,76)

Tabla 22. Resultados obtenidos en citologías LSIL

	__ p16-Ki67 __		S	E	VPP	VPN
	P	N	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
ARNm E6/E7						
Positivo	77	4	89,5	85,2	95,1	71,9
Negativo	9	23	(81,1-95,1)	(66,3-95,8)	(87,8-98,6)	(53,3-86,3)

Concordancia = 88,5%

Índice κ = 0,70 (IC 95%: 0,55-0,85)

3.3.- Estudio de discrepancias observadas en citologías ASCUS

Se observaron un total de 23 casos discrepantes entre los dos métodos evaluados, 10 casos en citologías ASCUS y 13 casos en citologías LSIL. La confirmación de los casos discrepantes se realizó mediante:

- ✓ Estudio histológico con repetición de la tinción doble (p16/Ki-67) en aquellos casos en el que existía biopsia obtenida de forma simultánea a la citología
- ✓ En caso de no existir biopsia, se realizó la determinación del genotipo de VPH en el sedimento celular citológico mediante la técnica de PCR *microarray*

El estudio de discrepancias observadas en el caso de citologías ASCUS (10 casos) se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Estudio de discrepancias en citologías ASCUS entre p16/Ki-67 y ARNm E6/E7

Casos	p16-Ki67	ARNm	BIOPSIA	PCR- <i>microarray</i> (tipos)	Resultado definitivo
1	NEG	POS	No muestra	POS 31	FN p16/Ki-67
2	NEG	POS	No muestra	POS 16/51/53	FN p16/Ki-67
3	NEG	POS	No muestra	POS 31	FN p16/Ki-67
4	NEG	POS	No muestra	POS 16	FN p16/Ki-67
5	POS	NEG	CIN 2 Tinción p16-Ki67 +	NR	FN ARNm
6	POS	NEG	NILM Tinción p16-Ki67 -	NR	FP p16/Ki-67
7	POS	NEG	NILM Tinción p16-Ki67 -	NR	FP p16/Ki-67
8	POS	NEG	NILM Tinción p16-Ki67 -	NR	FP p16/Ki-67
9	POS	NEG	CIN 1 Tinción p16-Ki67 -	NR	FP p16/Ki-67
10	POS	NEG	CIN 1 Tinción p16-Ki67 +	NR	FN ARNm

NILM: no indicativo de lesión o malignidad NR: no realizado
 FN: Falso negativo FP: Falso positivo

En el caso de ASCUS, se confirmaron como falsos positivos de la tinción doble un total de 4/10 (40%), como falsos negativos de la tinción doble 4/10 (40%) y como falso negativo de ARNm 2/10 (20%).

3.3.- Estudio de discrepancias observadas en citologías LSIL

El estudio de discrepancias observadas en el caso de citologías LSIL (13 casos) se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Estudio de discrepancias en citologías LSIL entre p16/Ki-67 y ARNm E6/E7

Casos	p16-Ki67	ARNm	BIOPSIA	PCR-microarray (tipos)	Resultado definitivo
11	NEG	POS	No muestra	PCR inhibida	No confirmado
12	NEG	POS	No muestra	NEG	FP ARNm
13	NEG	POS	No muestra	NEG	FP ARNm
14	NEG	POS	CIN 1 Tinción p16-Ki67 -	NR	FP ARNm
15	POS	NEG	No muestra	POS 33/53	FN ARNm
16	POS	NEG	No muestra	NEG	FP p16/Ki-67
17	POS	NEG	No muestra	NEG	FP p16/Ki-67
18	POS	NEG	NILM Tinción p16-Ki67 -	NR	FP p16/Ki-67
19	POS	NEG	No muestra	POS 53	FN ARNm
20	POS	NEG	No muestra	NEG	FP p16/Ki-67
21	POS	NEG	NILM Tinción p16-Ki67 -	NR	FP p16/Ki-67
22	POS	NEG	No muestra	NEG	FP p16/Ki-67
23	POS	NEG	CIN 2 Tinción p16-Ki67 +	NR	FN ARNm

NILM: no indicativo de lesión maligna NR: no realizado

FN: Falso negativo FP: Falso positivo

En el caso de LSIL, se confirmaron como falsos positivos de la tinción doble un total de 6/13 (46,1%), como falsos positivos de ARNm 3/13 (23%) y falsos negativos de ARNm 3/13 (23%). En un caso no pudo confirmarse la discordancia entre los dos métodos evaluados.

4. Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante escisión con asa de diatermia por lesión cervical de alto grado.

Se realizó un estudio prospectivo de seguimiento de 130 mujeres mayores de 21 años procedentes del área VII de Murcia, tratadas mediante escisión con asa de diatermia por lesión cervical de alto grado (CIN2+).

Se excluyó un caso para el seguimiento postconización, dado que la paciente no acudió a la consulta de seguimiento. El estudio se realizó con un total de 129 pacientes. La edad media de los pacientes en el momento de la conización fue de 35,1 años (rango 21-55 años).

Los resultados histológicos de la conizaciones realizadas se muestran en la figura 41. La mayoría de los casos (77%) corresponden a lesiones de alto grado (CIN 2/3) y carcinoma.

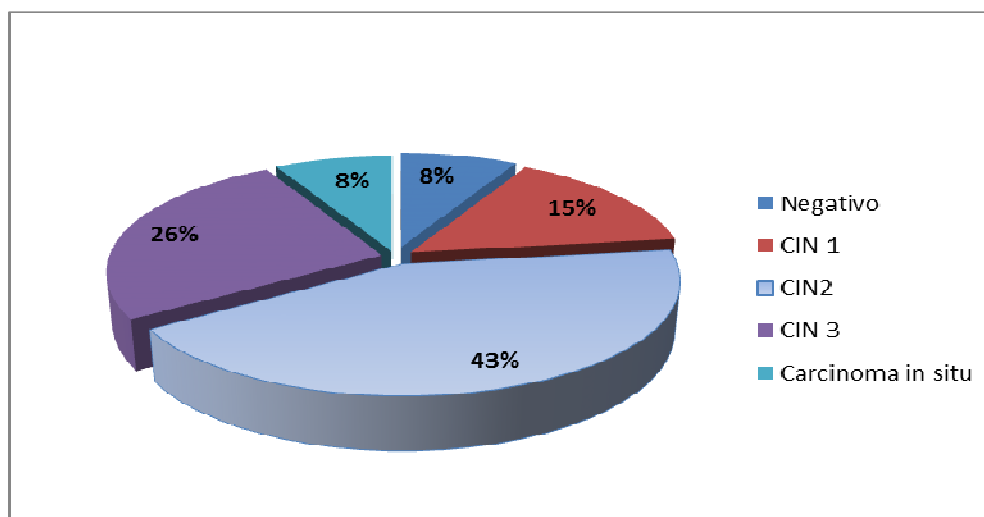


Figura 41. Resultados histológicos de las muestras obtenidas en el tratamiento excisional con asa de diatermia

Durante el primer año de seguimiento tras el tratamiento, 97 pacientes (75,2%) aclararon la infección por VPH (figura 42).

En un 24,8% se observó enfermedad residual, ya que 32 pacientes presentaron algún resultado patológico en la citología y/o test de VPH positivo.

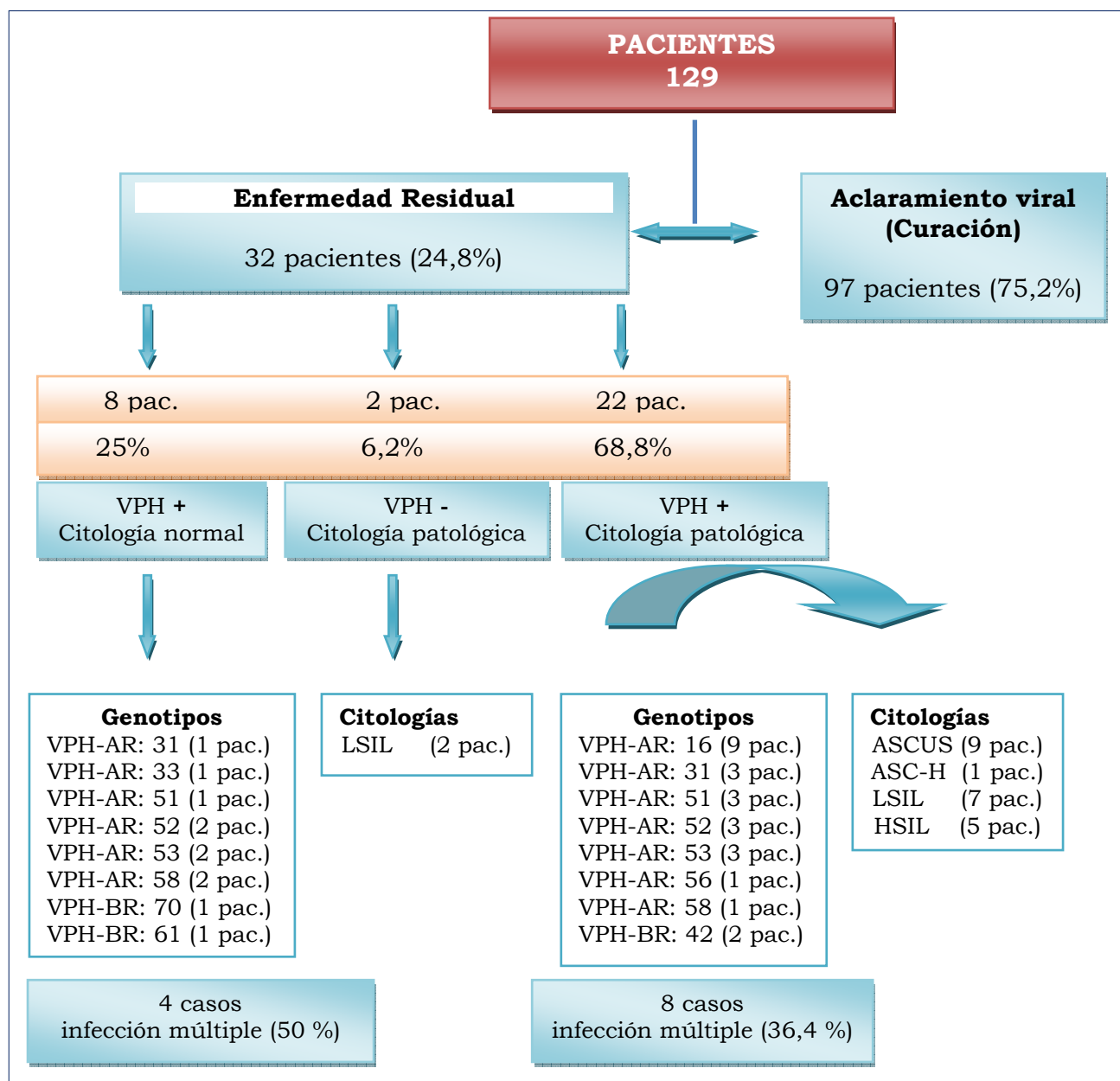


Figura 42. Resultados obtenidos en el seguimiento de los pacientes tratados mediante escisión con asa de diatermia

4.1.- Infección por VPH en pacientes con enfermedad residual

Entre los pacientes con enfermedad residual, el 93,8% (30/32) presentaron un test de VPH positivo. En estas pacientes se estudió la persistencia de la infección viral, definida como la detección del mismo genotipo viral presente en la citología previa a la conización, durante al menos 24 meses en el seguimiento postconización. Se detectaron un total del 21,9% (7/32) casos de infecciones persistentes, siendo el genotipo 53 el más prevalente (4/7).

En los pacientes en los que el test de VPH fue positivo se detectaron infecciones múltiples (más de 1 genotipo de VPH) en el 40% de los casos (12/30), siendo el genotipo 16, con un 30% (9/30) el que se detectó con más frecuencia. Además, entre los pacientes con un resultado citológico alterado (24 pacientes), se observó que presentaban una citología de ASCUS en el 37,5% (9/24), de LSIL en el 37,5% (9/24), de HSIL en el 20,8% (5/24) y de ASC-H en el 4,2% (1/24) (figura 42).

Se detectó un caso de enfermedad recurrente o recidiva (0,8%) considerando como tal aquellos casos de lesión que aparecen después del primer año de seguimiento, durante el cual habían tenido resultados citológicos, test de VPH y/o biopsia negativos. Se trataba de una mujer de 42 años, con antecedentes de una biopsia obtenida mediante colposcopia previa a la conización, con un resultado de carcinoma “in situ” e infección por VPH tipo 16.

En cuanto a la necesidad de realizar un tratamiento quirúrgico complementario a la conización (reconización o histerectomía), observamos que fue necesario realizarlo en 8 pacientes (6,2%), realizándose en 5 pacientes una reconización y en 3 casos una histerectomía.

4.2.- Evaluación del test de VPH y la citología como marcadores pronósticos de enfermedad residual.

4.2.1.- La detección de VPH como marcador pronóstico

La detección de VPH se realizó entre los 6-12 meses después del asa de diatermia (excepto en los casos de bordes quirúrgicos afectos, que fue a los 3 meses), detectándose un total de 54 casos positivos (41,9%) y de 75 casos negativos (58,1%) (figura 44)

Entre los casos que presentaron el estudio de VPH positivos, el 55,5% (30/54) desarrollaron enfermedad residual, mientras que entre los casos con VPH negativos, tan sólo el 2,6 % (2/75) presentaron dicha enfermedad residual.

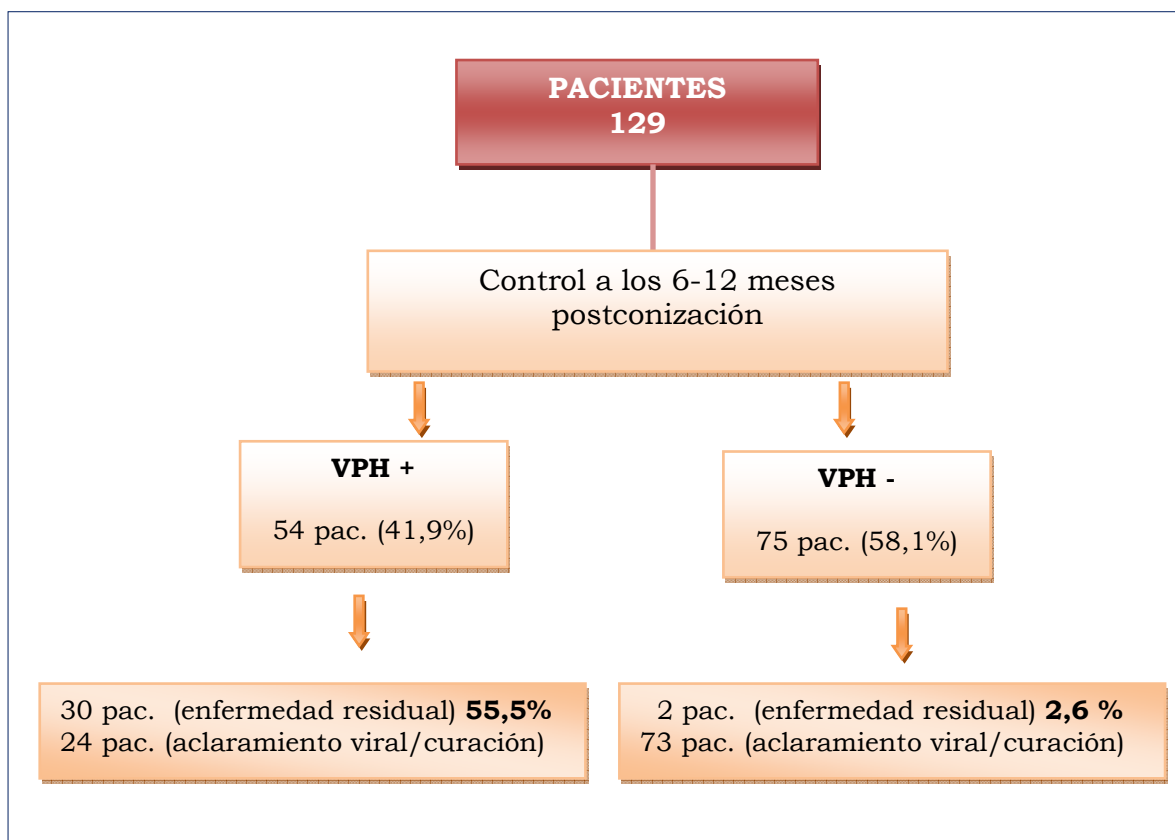


Figura 44. Resultados de VPH en el seguimiento de los pacientes tratados mediante escisión con asa de diatermia

En la tabla 25 se muestran los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del test de VPH para el diagnóstico de enfermedad residual.

Tabla 25. Evaluación del test de VPH para diagnóstico de enfermedad residual en pacientes tratados mediante escisión con asa de diatermia

	Enfermedad residual		S	E	VPP	VPN
	P	N	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
VPH						
Positivo	30	24	93,7	75,3	55,5	97,3
Negativo	2	73	(79,2-99,3)	(65,4-83,5)	(41,4-69,1)	(90,7-99,7)

Odds ratio (OR) (IC 95%)= 45,6 (10,1 - 205,3)

S= sensibilidad E= especificidad VPP= Valor predictivo positivo VPN= Valor predictivo negativo

Como puede observarse en la tabla 25, el test de VPH presenta un elevado valor predictivo negativo (97,3%), por tanto podemos afirmar que un resultado negativo del test indica con una alta probabilidad que el paciente no va a desarrollar una enfermedad residual por VPH.

4.2.2.- El estudio citológico como marcador pronóstico

En la figura 45 se muestran los resultados citológicos en el seguimiento de los pacientes. El 43,4% de los pacientes (56/129) presentaron una citología cérvico-vaginal patológica y el 56,6% (73/129) presentaron una citología normal.

Entre las pacientes que presentaron una citología patológica o anormal, el 42,8% (24/56) desarrollaron enfermedad residual, mientras que en las pacientes con citología normal, el 10,9 % (8/73) presentaron dicha enfermedad residual (figura 45).

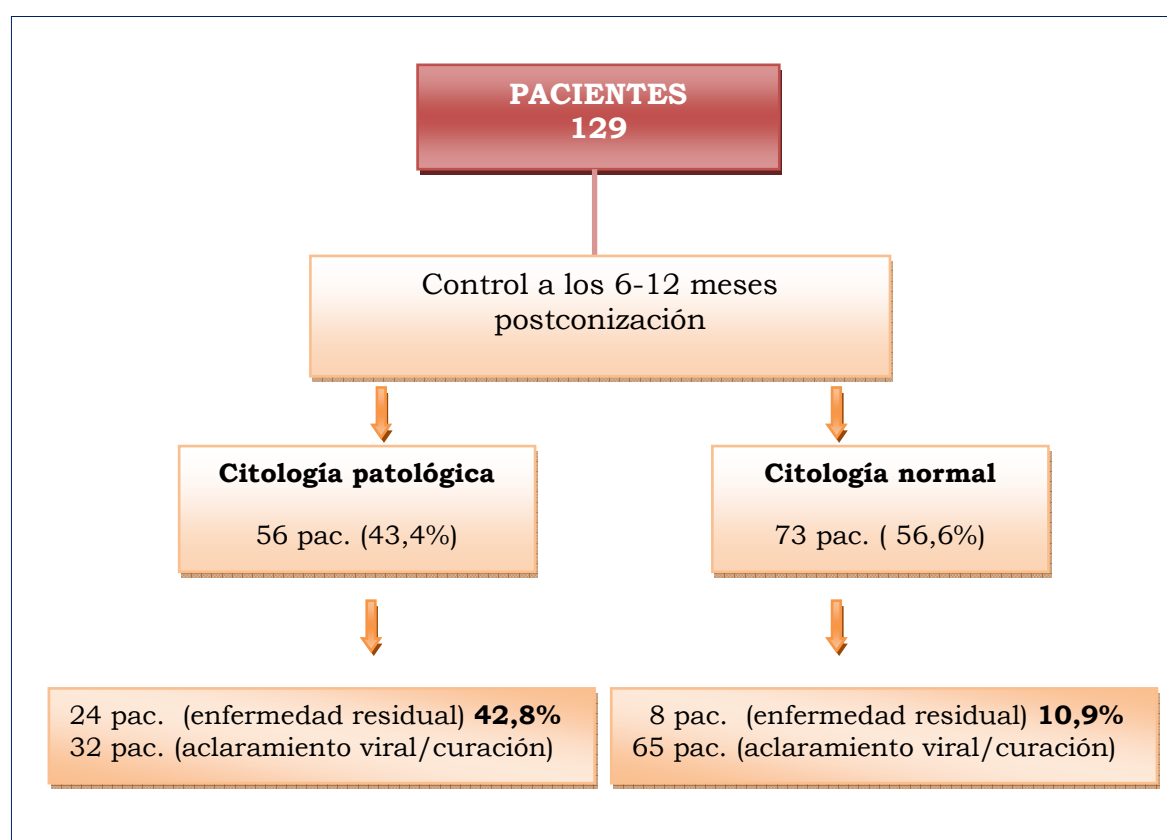


Figura 45. Resultados citológicos en el seguimiento de los pacientes tratados mediante escisión con asa de diatermia

En la tabla 26 se muestran los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la citología para el diagnóstico de enfermedad residual.

Tabla 26. Evaluación de la citología para diagnóstico de enfermedad residual en pacientes tratados mediante conización.

	Enfermedad residual		S	E	VPP	VPN
	P	N	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
Citología						
Positivo	24	32	75	67	42,9	89
Negativo	8	65	(56,6-88,5)	(56,7-76,2)	(29,7-56,8)	(79,5-95,1)

Odds ratio (OR) (IC 95%)= 6,1 (2,4 – 15,1)

S= sensibilidad E= especificidad VPP= Valor predictivo positivo VPN= Valor predictivo negativo

Si comparamos los resultados del estudio citológico y el test de VPH, podemos observar que el test de VPH presenta una mayor sensibilidad (93,7% frente al 75%) y un mayor valor predictivo negativo (97,3% frente al 89%) en comparación con el estudio citológico.

Por otra parte, el valor de Odds ratio (OR) nos indica que en los pacientes con enfermedad residual hay una mayor probabilidad de tener un resultado positivo en el test de VPH que en el caso de la citología, dado que este valor es claramente superior en el caso del test del VPH (OR=45,6) frente al estudio citológico (OR=6,1).

En resumen, podemos concluir que tanto el test de VPH como el estudio citológico son excelentes marcadores pronósticos de enfermedad residual en pacientes tratados mediante asa de diatermia, si bien el test de VPH mejora claramente al estudio citológico al presentar una mayor sensibilidad y un mayor valor predictivo negativo.

V. DISCUSIÓN

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) constituye la infección de transmisión sexual más frecuente entre las mujeres. La prevalencia mundial de la infección por el VPH en mujeres con resultados citológicos normales es del 11,7 % (Bruni y col., 2010). En general, se observan tasas de prevalencia muy dispares entre diferentes países, que varían desde niveles muy altos de prevalencia, como ocurre en determinadas zonas de África Subsahariana (24%) y zonas del Caribe (35,4%), hasta niveles muchos más bajos como ocurre en Norteamérica (4,7%) y el Oeste de Asia (1,7%). En España, la tasa de prevalencia de la infección por VPH en mujeres con resultados citológicos normales es del 9% (WHO/ICO, 2010).

El cáncer de cérvix es uno de los procesos tumorales mejor estudiados y conocidos, quizá debido a su relativamente fácil detección y abordaje terapéutico desde hace más de medio siglo. No obstante, sigue siendo el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres a nivel mundial (Anderson y col., 1992).

Cada año se diagnostican aproximadamente unos 500.000 nuevos casos en el mundo, la mayoría de ellos en los países poco desarrollados (África Subsahariana, Melanesia, Latinoamérica, Caribe, Asia Central y Sudeste Asiático), en donde se dan el 89% de los casos.

Antes de la introducción de los programas de cribado de cáncer de cérvix en la década de los 60 y 70, la incidencia en países de Europa, Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda eran similares a los que actualmente presentan los países en desarrollo (Gustafsson y col., 1997). Casi la mitad de los casos nuevos corresponden a mujeres que no se han hecho nunca una citología o no se la hicieron en los últimos cinco años (Anderson y col., 1992).

La incidencia de cáncer cervical en España es de 8,6 casos anuales por 100.000 mujeres, por debajo de las tasas de los países del Sur de Europa (11,1 casos por 100.000 mujeres por año) y del mundo (15,8 casos por 100.000 mujeres por año) (WHO/ICO, 2010).

Con respecto a las tasas de mortalidad, España presenta una de las tasas más bajas (3,2 fallecimientos por 100.000 mujeres por año), en comparación con el resto de países del Sur de Europa (4,3 casos por 100.000 mujeres por año) y del mundo (8,2 casos por 100.000 mujeres por año).

La implantación de un programa de prevención secundaria basado en un programa de citologías cérvico-vaginales, ha permitido una reducción significativa en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix. Sin embargo, es importante reconocer las limitaciones de los programas de prevención basados exclusivamente en la citología, los cuales, probablemente, han alcanzado ya su impacto máximo en la prevención global del cáncer de cérvix.

No obstante, se ha publicado recientemente (Ronco y col., 2013) la utilidad del test de VPH como método de cribado primario en programas de prevención de cáncer cervical, según el cual éste proporciona entre un 60%-70% mayor eficacia que la citología en la prevención de carcinoma cervical invasivo, durante un seguimiento de al menos 5 años.

El descubrimiento en la década de los 90, de la etiología viral del cáncer de cérvix y el desarrollo de pruebas de detección de ADN del VPH, ha permitido su incorporación en la mayoría de los programas de cribado de cáncer cervical. El VPH, se considera junto a otros agentes infecciosos, como *Helicobacter pylori* y el virus de la Hepatitis B, como agentes carcinogénicos humanos del grupo 1 (Bouvard y col., 2009; IARC, 2009). Sin embargo, a pesar de su papel reconocido en la etiología del cáncer de cérvix, actualmente en España no hay una estructura establecida y ordenada de cribado del cáncer cervical.

Existen solamente dos Comunidades Autónomas con un programa de cribado poblacional organizado, Castilla- León y La Rioja. El resto de comunidades siguen un cribado asistencial oportunista, que aprovecha la visita del paciente para el diagnóstico de las lesiones precursoras malignas, siendo este modelo muy discutible en cuanto a su eficiencia (Kim y col.,

2004; Adab y col., 2004), ya que penaliza la equidad e impide una amplia cobertura poblacional.

En algunas comunidades autónomas se han realizado diversos estudios que han mostrado datos sobre la epidemiología y las características clínicas de la infección por VPH, situación que no ha ocurrido en nuestra comunidad.

El presente estudio, se planteó con el objetivo de conocer la prevalencia de la infección por el VPH y los genotipos implicados en el desarrollo de las lesiones precursoras de cáncer cervical en la región de Murcia.

Hasta la realización del presente trabajo, no existía en la región de Murcia ningún procedimiento normalizado para el estudio de la infección por el VPH. Además, éste es el primer estudio que abarca la mayoría de mujeres de distintas áreas de la región de Murcia estudiadas por sospecha de patología cervical. Consideramos que los datos aportados en este trabajo pueden ser de gran utilidad para conocer mejor la epidemiología de la infección por el VPH y la utilidad de los métodos diagnósticos actualmente utilizados en el contexto de la infección por el VPH.

Estudio de prevalencia de infección y genotipos de VPH en mujeres con lesión intraepitelial cervical

Actualmente, las dos metodologías más utilizadas para la detección del VPH en estudios epidemiológicos son la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando cebadores de consenso, y la técnica de captura de híbridos. Ambas técnicas han sido optimizadas para detectar los tipos de VPH de mayor relevancia clínica identificados hasta la fecha, concretamente los tipos del VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

Infección por VPH según el grado de lesión citológica

En nuestro estudio, la prevalencia de la infección por VPH según el grado de la lesión citológica fue, del 53% en el caso de atípias escamosas indeterminadas (ASCUS), 73,2% en lesiones de bajo grado (LSIL) y del 79% en lesiones de alto grado (HSIL). Se observó una elevada prevalencia del genotipo 16 en todos los casos, incrementándose esta presencia con el grado de lesión citológica, pasando del 28,4% en ASCUS hasta el 45,5% en HSIL.

Un estudio clínico multicéntrico, randomizado (Castle y col., 2005) (ALTS, ASCUS LSIL Triage Study) que incluía muestras cervicales de 5.060 mujeres, y cuyo metodología fue similar a la utilizada en este estudio, evaluó la prevalencia de la infección por VPH según el resultado citológico de ASCUS y LSIL. La prevalencia de la infección por VPH aumentó del 53,1% en citologías ASCUS hasta un 84,1% en citologías LSIL. Estos datos son muy similares a los obtenidos en nuestro trabajo. Además, estos resultados están en concordancia con un estudio reciente (Guan y col., 2012), que mostraban una prevalencia de infección por VPH de 52% en ASCUS, 76% en LSIL y de 85% en HSIL.

Asimismo, un estudio italiano (Voglino y col., 2000), mostró una prevalencia de la infección por VPH del 73% en el caso de lesiones de bajo grado (LSIL), similar a la obtenida en nuestra serie que fue del 73,2%.

Por otra parte, en un estudio realizado en Barcelona (González-Bosquet y col., 2008), se obtuvo una prevalencia de infección por VPH del 46,6% en ASCUS, 60,7% en LSIL y del 84,2% en HSIL. En este trabajo, se utilizó como método de detección y tipado un método de PCR con cebadores consenso SPF10 (amplifican un fragmento de 64pb de la región L1), que puede explicar la mayor prevalencia observada, puesto que en la mayoría de estudios de cribado de infección por VPH se utilizan técnicas de PCR con distintos cebadores o bien la técnica de captura híbrida, como ocurrió en nuestro caso.

No obstante, Sneijders y col., 2003, realizaron una revisión de la sensibilidad analítica de los diferentes métodos diagnósticos utilizados en la infección por VPH, concluyendo que aquellos basados en ADN purificado, como es el caso de la PCR con cebadores consenso SPF10, PGMY y GP, presentan una mayor sensibilidad analítica y una menor sensibilidad clínica. Al contrario, aquellos basados en extracto crudo de la partícula viral, como ocurre con la técnica de captura híbrida (utilizada en nuestro estudio), presenta una mayor sensibilidad clínica para detectar lesiones precursoras de cérvix, y una menor sensibilidad analítica.

Por lo que respecta a la prevalencia de genotipos según el grado de severidad de la lesión citológica, en nuestro estudio el genotipo 16 fue el más prevalente, tanto en lesiones ASCUS (28,4%) como en LSIL (27,5%). Estos resultados fueron superiores a los indicados en el estudio ALTS (Castle y col., 2005) que detectaron el genotipo 16 en el 14,9% de ASCUS y en el 21,1% de LSIL. Datos muy similares a nuestro trabajo fueron realizados por Guan y colaboradores (2012), que obtuvieron una prevalencia del genotipo 16 del 23%, 25% y del 48%, en lesiones ASCUS, LSIL Y HSIL, respectivamente

En un estudio realizado en Bélgica (Depuydt y col., 2003), basado en un programa de cribado cervical organizado, se identificó el genotipo 16 en el 22% de ASCUS, 21,3% de LSIL y en el 50,8% de los HSIL. Datos de prevalencia inferiores a nuestro estudio, que está basado en un cribado cervical oportunista, donde la mayoría de las mujeres acuden a su ginecólogo por presentar antecedentes citológicos previos de lesión cervical asociada a la infección por VPH.

Por otra parte, en un estudio de 5.910 muestras citológicas de mujeres con resultados de lesiones LSIL (Clifford y col., 2005) se obtuvo una prevalencia del genotipo 16 del 26%, seguido de los tipos 31 (12%), 51 (11%), 53 (10%), 56 (10%), 52 (9%), 18 (9%), 66 (9%) y 58 (8%). Nuestros resultados de prevalencia fueron muy similares para los genotipos 16 (27,5%), 56 (9,1%) y 31 (13,4%), pero se detectó una mayor prevalencia para los tipos 53 (16,5%), y 66 (13,4%).

En España, los datos de prevalencia de tipos específicos según el grado de lesión citológica han sido recopilados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC). La prevalencia de infección por VPH 16/18 es del 19,9% (13,8 - 27,1) en citologías LSIL (González-Bosquet y col., 2008) y del 46,9% (41,6 - 52,1) en citologías HSIL (Bosch y col., 1993; González-Bosquet y col., 2008).

Se estima que los VPH tipos 16 y 18 son responsables del 70% de los casos de cáncer de cérvix a nivel mundial y que los ocho tipos más comunes (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) son responsables del 89% de todos los casos. Así, se ha observado que el genotipo 16 presenta una prevalencia superior a la media en el norte de África, Europa y Norteamérica, del genotipo 45 en África subsahariana y del tipo 31 en América Latina (Muñoz y col., 2004).

En nuestro caso, el genotipo 16 fue el más frecuente en todo tipo de lesiones (28,4% en ASCUS, 27,5% en LSIL y 45,5% en HSIL), sin embargo el tipo 18 se detectó en el 6,7% de ASCUS, 5,3% de LSIL y del 4,9% de HSIL. La prevalencia global de los genotipos 16/18 de nuestro estudio, fue del 35,1% en ASCUS, 32,8% en LSIL y 50,4% en HSIL, muy similar a otros estudios españoles (Bosch y col., 1993; González-Bosquet y col., 2008).

Prevalencia de genotipos de VPH

En nuestro estudio los 4 genotipos más prevalentes de forma general fueron los tipos 16 (31,1%), 31 (13,5%), 51 (13,4%) y el 53 (11,8%). Se observó una baja prevalencia del VPH 18 (5,7%), genotipo incluido en las dos vacunas actualmente comercializadas.

Datos recientes aportados por la Organización Mundial de la Salud (WHO/ICO, 2010) sobre los genotipos más prevalentes en España en mujeres con lesión citológica, muestran que en el caso de LSIL, los 4 genotipos más prevalentes fueron: 16 (17,9%), 51 (12,6%), 66 (8,6%) y 31 (5,3%). En el caso de lesiones HSIL, destacan los genotipos: 16 (44,4%), 51 (10,7%), 31 (8,5%) y el 66 (7,8%).

Según los datos aportados por este estudio (WHO/ICO, 2010), los dos genotipos de VPH de alto riesgo de mayor oncogenicidad e incluidos en la vacuna (tipos 16/18) se detectaron en el 55,9% de los casos de cáncer cervical. Estos datos son muy similares a los aportados en nuestro estudio, donde el genotipo 16 representó el 45,5% de los casos de HSIL y del 27,5% de los casos de LSIL. La frecuencia del resto de genotipos fue muy similar a los datos referidos en el estudio mencionado (WHO/ICO, 2010).

Los datos aportados en el norte de España (Delgado y col., 2012) basados en un estudio de 106 mujeres con resultados citológicos anormales, muestran una prevalencia global del VPH 16 del 29,7%, seguidos de los genotipos 51 (17,5%), 53 (16%), 52 (12%), 39 (10,8%), 18 (9,4%) y del 66 (8,1%).

En un estudio realizado en Salamanca (Otero-Motta y col., 2011) en 891 mujeres con citologías anormales, informaron que los cuatro tipos de VPH de alto riesgo más frecuentes detectados fueron: 16 (26,3%), 53 (18,2%), 51 (17,3%) y 66 (13,1%). La frecuencia del VPH 18 descrita en este estudio fue muy baja (2,7%), inferior al estudio realizado en el norte de España. Los dos estudios anteriores (Delgado y col., 2012; Otero-Motta y col., 2011) utilizaron una metodología similar en el tipado de VPH (PCR *microarray*), al igual que en nuestro caso.

En el estudio ALTS (ALTS, ASCUS LSIL Triage Study) (Castle y col., 2005), se concluyó que las mujeres con lesión citológica de ASCUS o LSIL que fueron positivas para el genotipo 16 del VPH presentaron un mayor riesgo de lesión de alto grado (CIN2/3) comparado con mujeres con resultado de VPH negativo, así como un riesgo 5 veces mayor que las mujeres con otros tipo oncogénicos distintos al VPH 16. Se acepta que la mayor prevalencia del genotipo 16 en lesiones ASCUS y LSIL tiene importantes implicaciones clínicas, dado un mayor riesgo acumulado de lesiones precursoras de cáncer cervical.

En nuestro trabajo destacamos la frecuencia de los tipos 16 (31,1%) y 31 (13,5%). Estos datos concuerdan en general con la mayoría de los estudios publicados en España (Selva y col., 2009; Otero-Motta y col.,

2011; Delgado y col., 2012) que utilizan una metodología de diagnóstico de VPH similar al nuestro (figura 46).

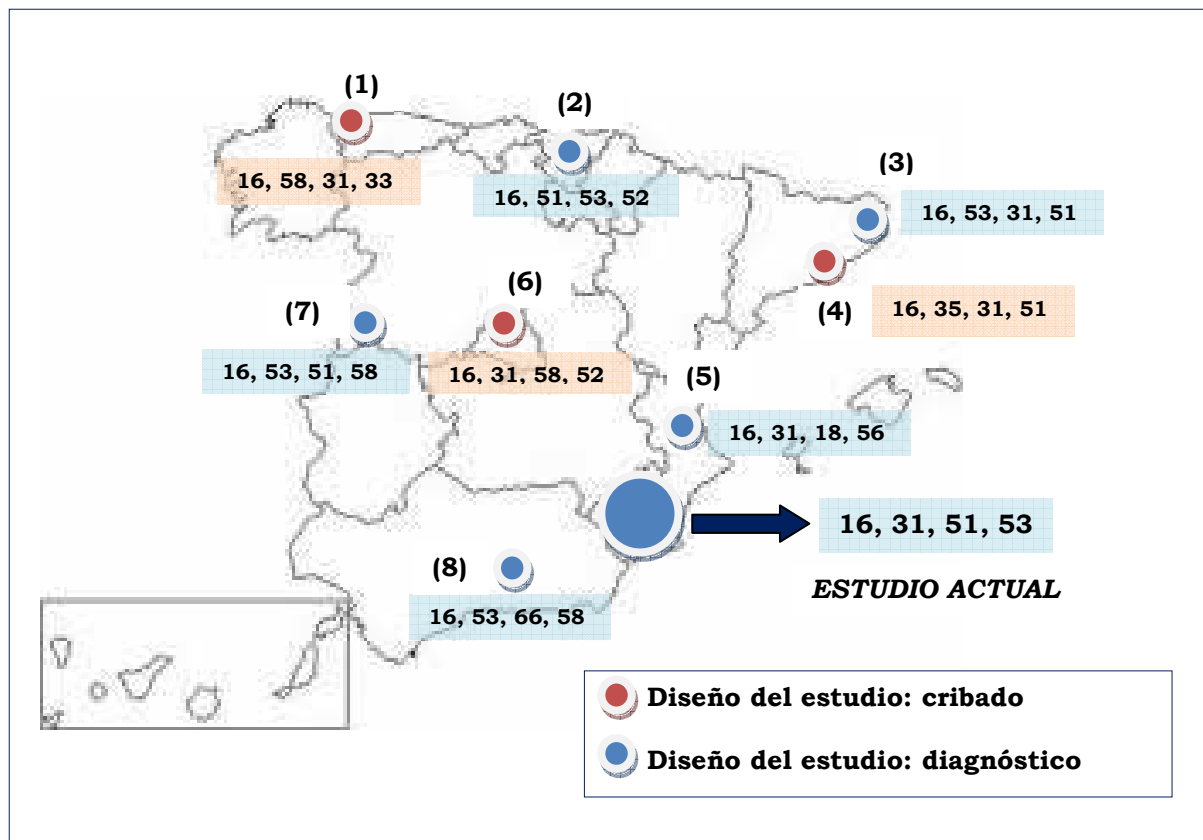


Figura 46. Frecuencia de genotipos de VPH alto riesgo más prevalentes en España según el programa de seguimiento realizado.

- (1) De Oña y col., 2010
- (2) Delgado y col., 2012
- (3) Selva y col., 2009
- (4) de Sanjosé y col., 2003
- (5) García-García y col., 2010
- (6) Ortíz y col., 2006
- (7) Otero-Motta y col., 2011
- (8) Cobo y col., 2009

En la figura 46 se muestran diferentes estudios de prevalencia realizados en España, donde se observa que la frecuencia del genotipo 31 es muy dispar en los diferentes estudios. En un metaanálisis realizado por Clifford y col., 2005, se observó que la mayor prevalencia del genotipo 31 estaba relacionada con una mayor presencia de población inmigrante procedente de Sudamérica, Centroamérica y Este de Europa.

La prevalencia elevada del genotipo 31 en algunas áreas geográficas como Madrid (7,3%), Barcelona (13,8%), Valencia (8,5%), así como en nuestro estudio (13,5%), podría explicarse por una mayor población inmigrante procedentes de Centroamérica y Sudamérica. No obstante, estudios realizados en otras regiones de España, como Salamanca (Otero-Motta y col., 2011), Álava (Delgado y col., 2012) y un estudio realizado en Cantabria/León/Burgos (Gómez-Roman y col., 2009), con bajas tasas de población inmigrante (inferiores al 3% de Centroamérica-Sudamérica), presentan prevalencias muy bajas del genotipo 31 que oscilan entre 2,5% y el 4,8%.

Por otra parte, se observa en todos estos estudios, una baja prevalencia del genotipo 18 (rango: 2,5%-5,8%) y del genotipo 45 (rango: 0,9%-2,5%), muy similar a lo que ocurre en otros países del Sur de Europa (de Sanjose y col., 2007, 2010). En nuestro trabajo, la prevalencia global de los genotipos 18 y 45 fueron, del 5,7% y del 2,2%, respectivamente. No obstante, observamos una mayor prevalencia del tipo 45 (4,9%) en el área sanitaria III-Lorca, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a otras áreas sanitarias estudiadas.

La posible explicación de esta mayor prevalencia del genotipo 45 en el área III-Lorca, se debe al mayor número de población inmigrante procedente del norte de África, donde diversos estudios (de Sanjosé y col., 2007; Bruni y col., 2010) informan una frecuencia elevada de este genotipo.

Los datos consultados en el centro regional de estadística de la Región de Murcia (CREM) de la población inmigrante durante los años del presente trabajo (2008-2012), indican que la población de origen

norteafricano (principalmente Marruecos y Argelia) en el área III de Lorca, supuso el 65% del total de población inmigrante durante los años del presente estudio.

Un estudio reciente (Conesa-Zamora y col., 2009) realizado en dos áreas de la región de Murcia (Lorca y Cartagena), destaca la frecuencia del genotipo 45 como el segundo más prevalente en lesiones de alto grado (HSIL), justificando dicha prevalencia a una posible sobreestimación por el bajo número de lesiones HSIL incluidos en el estudio (39 casos).

Impacto preventivo de las vacunas frente al VPH

El conocimiento de la distribución de tipos de VPH en las lesiones precursoras y en el cáncer de cérvix, es esencial para estimar el impacto potencial de las vacunas frente al virus del papiloma humano. Además, este conocimiento puede ayudar a investigar el reemplazo de genotipos, un fenómeno que potencialmente puede producirse en el caso que la vacuna presente una reducción drástica de los genotipos 16 y 18, en poblaciones con programas universales de vacunación de VPH.

Diferentes estudios realizados (Li y col., 2011; de Sanjosé y col., 2010) sobre los genotipos implicados en carcinomas invasivos de cérvix, indican que los tipos 16 y 18 se asocian al 70% de todos los casos, con sólo pequeñas diferencias geográficas. La variación geográfica que se observa con más frecuencia corresponde a la prevalencia relativa del VPH 16 con respecto a los otros tipos de VPH. En el estudio de prevalencia realizado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (Clifford y col., 2005) en mujeres con citologías normales, muestran una mayor prevalencia del VPH 16 en Europa que en África Subsahariana.

En el caso de cáncer cervical, se observan pocas diferencia regionales en la prevalencia del VPH 16 entre Europa, Norteamérica, América Latina y África que se estima en el 58%, 54%, 50% y 56%, respectivamente.

Si analizamos la prevalencia global de los dos genotipos de VPH de alto riesgo 16/18, incluidos en las vacunas comercializadas actualmente, se puede estimar que ambos genotipos se detectan entre el 65-77% de los casos de cáncer cervical, 41-57% de los casos de HSIL y del 15-32% de las lesiones LSIL (Clifford y col., 2006).

En nuestro estudio, la prevalencia de los tipos 16/18 representó el 32,8% de los casos de LSIL y del 50,4% de HSIL, datos similares a los aportados en estudio anterior (Clifford y col., 2006). Asimismo, estos datos, ponen de manifiesto que un elevado porcentaje de lesiones LSIL (67,2%) y HSIL (49,6%) no son potencialmente prevenibles con las vacunas actuales.

En un reciente estudio epidemiológico retrospectivo realizado en distintos países del mundo (de Sanjosé y col., 2010), los genotipos más prevalentes en los casos de cáncer cervical, después de los tipos 16 y 18, fueron los tipos 31, 33, 35, 45, 52 y 58. La inclusión de estos genotipos virales en la nueva vacuna nonavalente, que actualmente se encuentra en fase clínica avanzada, supondría una cobertura estimada aproximadamente del 90% del total de casos de cáncer cervical, lo cual supondría unos 450.000 casos prevenibles al año según algunas estimaciones (Parkin y col., 2005).

Existen datos contrastados de inmunogenicidad cruzada de las vacunas frente a tipos de VPH no incluidos en ellas, si bien esta reactividad cruzada se debe a la similitud filogenética de algunos de estos genotipos con el VPH 16 y 18 (Harper y col., 2006). Así, se ha observado reactividad cruzada parcial para el tipo 31 (especie 9 “grupo VPH16”) y completa para el tipo 45 (especie 7 “grupo VPH18”). No se han informado datos de reactividad cruzada con otros tipos muy prevalentes como los tipos 33, 52 y 58, relacionados filogenéticamente con la especie 9 “grupo VPH16”.

En nuestro trabajo, en el caso de lesiones de alto grado (HSIL) precursoras de neoplasia cervical, la prevalencia de la especie 9 (incluye a los tipos:16, 31, 33, 35, 52 y 58) fue del 78% y de la especie 7 (incluye a los tipos:18,39 y 45) fue del 8%. En el caso de que la vacuna mostrase una

inmunogenicidad cruzada total entre tipos relacionados filogenéticamente, de acuerdo con los datos obtenidos en nuestro estudio, podría, potencialmente prevenirse hasta el 86% de las lesiones precursoras de cáncer cervical (HSIL).

Datos recientes, presentados en Italia en noviembre de 2013, indican que la nueva vacuna nonavalente, que incluye adicionalmente 5 genotipos de alto riesgo con respecto a la vacuna tetravalente, los genotipos 31, 33, 45, 52 y 58, presentaría una eficacia potencial para prevenir lesiones de alto grado por VPH del 96,7% (IC 95%: 80,9-99,8) (Eurogin 2013, Joura y col., 2013, Comunicación oral)

Infección múltiple por VPH

Se han realizado varios estudios para evaluar la frecuencia de la infección múltiple por VPH, así como su posible implicación en la progresión de lesiones precursoras de cáncer cervical, por lo que se ha considerado también realizarlo en nuestro trabajo. Asimismo, la infección múltiple (más de 1 genotipo de VPH) representó el 44,5% del total de las infecciones por VPH.

De los datos revisados en la literatura, se observó que en Portugal, en un estudio con muestras cervicales de 1.057 mujeres (Pista y col., 2011), el 32% de las infecciones por VPH eran debidas a infecciones múltiples, además estas infecciones fueron más frecuentes en mujeres menores de 30 años. Este estudio detectó un aumento significativo de las infecciones múltiples con el grado de severidad de la lesión citológica, sugiriendo que estas infecciones múltiples pueden persistir durante más tiempo y presentar, por tanto, un mayor riesgo de lesiones de alto grado.

Un estudio realizado en Costa Rica con 2478 mujeres (Chaturvedi y col., 2011) detectó infecciones múltiples en el 43,2% de las infecciones por VPH. Además, en este estudio las infecciones múltiples que incluyeron algún genotipo perteneciente a la especie 9 (“grupo VPH 16”) presentaron un mayor riesgo de lesiones de alto grado (CIN2+/HSIL) en comparación

con las infecciones únicas (OR=1,6). No obstante, el riesgo de lesiones CIN2+/HSIL para estos casos de infecciones múltiples fue similar a la suma del riesgo estimado de los genotipos individualmente.

En Italia (Bello y col., 2009), realizaron un estudio con muestras cervicales procedentes de 1.323 mujeres, en el cual la prevalencia de infección múltiple representó el 44,2% de los casos de infección por VPH. Se observó una correlación entre las infecciones múltiples y un riesgo de desarrollar lesiones precursoras de cáncer cervical.

Los resultados de prevalencia de infecciones múltiples de los dos estudios anteriores (Chatuverdi y col., 2011; Bello y col., 2009) mostraron resultados muy similares a nuestra serie. En nuestro estudio, existe coincidencia en la mayor prevalencia de infecciones múltiples en mujeres menores de 34 años (rango de edad 30-34 del estudio), sin embargo no observamos un incremento significativo de las infecciones múltiples con el grado de severidad de las lesiones.

Un estudio reciente publicado en España (Delgado y col., 2012), mostró una prevalencia de infección múltiple del 58,1%, datos superiores a los detectados en nuestra serie. Este estudio utilizó como método de tipado de VPH una PCR con cebadores consenso (PGMY), diferentes a los utilizados en nuestro estudio (MY09/011), hecho que podría explicar la sensibilidad en la detección de algunos genotipos virales, como han planteado varios autores (Tucker y col., 1993; Sabol y col., 2008; Galan-Sanchez y col., 2009)

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) realizó en el año 2010 una recopilación de estudios de prevalencia de infecciones múltiples por VPH en varios países (Vacarella y col., 2010), utilizando en todos los casos, una PCR con cebadores consenso GP5+/GP6+ como método de detección y tipado de VPH. Las infecciones múltiples se detectaron en el 32,2% de mujeres con infección por VPH, con rangos de variación desde el 18,5% en Corea hasta el 46% en Argentina.

En resumen, podemos concluir que la importancia clínica de las infecciones múltiples es un tema controvertido en la mayoría de los estudios epidemiológicos. Algunos autores (Chaturvedi y col., 2005; Herrero y col., 2005), sugieren que las infecciones múltiples pueden favorecer la progresión de las lesiones precursoras de cáncer cervical, mientras que en otros casos (Bosch y col., 2002; Herrero y col., 2000; Levi y col., 2002; Selva L y col., 2009), al igual que ocurre en nuestro estudio, no se ha podido demostrar que dichas infecciones múltiples presenten mayor riesgo de lesiones precursoras que aquellos producidos por un solo tipo de VPH.

Carga viral del VPH

Existe cierta controversia sobre la utilidad clínica de la cuantificación del ADN del VPH, dado que algunos autores (Sherman y col., 2002; van Duin y col., 2002) consideran que la carga viral sería altamente efectiva para el futuro desarrollo de lesiones cervicales de alto grado, mientras que para otros no es así (Giuliano y col., 2004; Hesselink y col., 2009).

La cantidad de ADN del virus del papiloma humano en el epitelio cervical es una suma compleja del número, tamaño y estado de las lesiones asociadas al VPH. En general, las cargas virales bajas se asocian con resultados microscópicos celulares normales y un riesgo bajo de lesiones precursoras de cáncer cervical, pero en el marco clínico, la importancia pronóstica de cargas virales elevadas no se ha establecido (Lorincz y col., 2002). Así, algunas de las cargas virales más altas se asocian a lesiones de bajo grado (LSIL) que acaban regresando posteriormente debido a la respuesta inmunológica.

En nuestro estudio, los niveles de carga viral altos (100-1000 RLU/CO) fueron más frecuentes en lesiones HSIL que en el caso de ASCUS y LSIL, aunque estas asociaciones no eran estadísticamente significativa. Asimismo, no se encontró una relación clínica entre niveles de carga viral y la severidad de la lesión clínica.

Otro factor que complica aún más la medición de la carga viral es la presencia de infecciones por múltiples tipos del VPH debido a la co-transmisión sexual. El cáncer cervical suele ser un evento monoclonal asociado a un solo tipo de VPH. Sin embargo, es posible que el epitelio cervical circundante esté infectado por otros tipos de VPH. Según algunos estudios realizados con técnicas de detección de VPH muy sensibles, en más del 20-30% de las mujeres con infecciones cervicales, se detecta la presencia de más de un tipo de VPH, independientemente del grado de la lesión citológica (Moscicki y col., 2004).

Además, la carga viral total presente en la muestra clínica depende de varios factores: el número de células totales presentes en la muestra, distribución de las partículas virales en la superficie de la lesión, de la tasa de infección por cada célula y de la conservación de la muestra (degradación del ADN viral). No obstante, para una correcta detección de la carga viral del VPH, se debería ajustar el valor de la carga viral total en función del número de células presentes en la muestra, lo cual dependerá en gran medida de la calidad de la muestra y las condiciones de conservación.

Por todo lo anteriormente mencionado, dada la dificultad en establecer unos criterios estandarizados para la medida de la carga viral, así como la elevada frecuencia de infecciones múltiples detectadas en nuestro estudio (44,5%), consideramos de poca utilidad clínica la utilización de este marcador en el seguimiento de mujeres con infección por VPH.

Estudio comparativo de la técnica de captura de híbridos frente a la técnica de PCR “microarray”.

La detección del VPH se considera potencialmente útil en tres aplicaciones clínicas: en primer lugar, como prueba de cribado primario, ya sea sola o en combinación con la citología para detectar lesiones precursoras del cáncer cervical; en segundo lugar, como prueba de cribado en mujeres con alteraciones citológicas de naturaleza menor (ASCUS, LSIL) que necesitan derivarse para diagnóstico y tratamiento; y, por último, como prueba de seguimiento en mujeres tratadas por lesiones intraepiteliales de alto grado (CIN2+) mediante ablación o escisión local para predecir la curación o el fracaso del tratamiento.

La primera de las aplicaciones clínicas mencionadas, como método de cribado primario, no ha podido evaluarse en nuestro estudio, dado que actualmente no existe en nuestra comunidad ningún programa organizado de cribado de cáncer cervical. En cambio, se ha evaluado la detección de VPH en mujeres con alteraciones citológicas leves (ASCUS, LSIL), ya que un diagnóstico adecuado, permite tomar decisiones clínicas muy importantes, como la posibilidad de derivación a una colposcopia, la posibilidad de detectar lesiones incipientes que pueden convertirse posteriormente en neoplasias intraepiteliales de alto grado (CIN2+) y en cáncer cervical.

La tercera de las aplicaciones clínicas de la detección de VPH ha sido tratada previamente en el apartado 4.2.1 de los resultados.

La técnica de captura de híbridos fue el primer método aprobado y validado por la FDA (2009) para el cribado primario de la infección por el VPH. Actualmente se considera el “patrón de oro”, y cualquier método de nueva implementación para el cribado primario por VPH, debe presentar una sensibilidad no inferior al 90% y una especificidad no inferior al 98% con respecto a la técnica de captura de híbridos (Meijer y col., 2009)

Estudios recientes (Castle y col., 2005; Lai y col., 2007; Cuzick et al., 2008) indican la importancia de la detección de VPH de alto riesgo, en

particular del VPH 16 y el VPH 18, para tomar decisiones clínicas importantes en el marco de un algoritmo diagnóstico del cáncer cervical. Así, en muchos protocolos actuales basados en la detección específicas de VPH 16/18, incluido el último consenso de la SEGO 2010, permite estratificar a los pacientes que son VPH 16/18 hacia una colposcopia inmediata, y en caso de tener un resultado positivo de VPH alto riesgo no 16/18, un seguimiento anual mediante citología y test de VPH.

La técnica de captura híbrida utilizada en nuestro estudio, permite la detección simultánea de 13 tipos de VPH de alto o probable alto riesgo, pero no permite diferenciar de forma específica el tipo viral. Sin embargo, las técnicas de PCR-tipo específica, como la utilizada en nuestro estudio (PCR-*microarray*) permite la detección de hasta 35 tipos de VPH, de los cuales 20 tipos son de alto riesgo (CLART-AR20). Además de los 13 tipos de alto riesgo incluidos en la técnica de captura híbrida, la técnica de PCR-*microarray* incluye la detección de 7 tipos adicionales: 26, 53, 66, 70, 73, 82 y 85.

Los resultados de concordancia entre la captura híbrida y el método de PCR-*microarray* (CLART-AR13) que incluye los mismo tipos virales que la técnica de captura híbrida, fueron excelentes (índice κ de 0,89), siendo todavía mejores los resultados, cuando se comparó con el método que detecta los 20 tipos de alto riesgo (CLART-AR20), con un índice κ de 0,99.

Se obtuvieron un total de 11 discrepancias entre la técnica de captura y el método de PCR (CLART-AR13), debidas en su mayoría a reacciones cruzadas con las sondas incluidas en el método de captura híbrida, datos que vienen especificados en el manual del procedimiento de la técnica, y han sido referidos por algunos autores (Vernon y col., 2000; Castle y col., 2002).

Cuando se utilizó el método de PCR que incluye 20 tipos de VPH (CLART-AR20), solo se observó una muestra discrepante, que se identificó como un VPH-BR tipo 6, mediante una técnica de PCR-secuenciación. Según datos especificados en el procedimiento de la técnica de captura híbrida y algunos autores (Meyer y col., 1998; Castle y col., 2002), niveles

superiores a 4 ng/ml de los tipos de bajo riesgo (6 y 42) se asocian a resultados falsos positivos de la técnica. De hecho, los valores de positividad de esta muestra eran muy bajos (ratio RLU/CO de 4,6, cercanos al punto de corte de la técnica correspondientes a un ratio de RLU/CO de 1,0).

Una posible explicación a estas discrepancias observadas entre el método de captura híbrida (ampliamente validado en estudios clínicos) y el método de detección y tipado de VPH (PCR-*microarray*), es la diferencia entre la sensibilidad analítica y la sensibilidad clínica, datos aportados por algunos autores (Snijders et al., 2003). La mayoría de los métodos de detección de VPH mediante técnicas de PCR presentan una elevada sensibilidad analítica, detectan con elevada sensibilidad infecciones por VPH, sin diferenciar si estas infecciones son clínicamente irrelevantes o si por el contrario estas infecciones se asocian a lesiones precursoras de cáncer cervical (CIN2+).

Por ello, actualmente cualquier estudio de validación clínica de un nuevo test de VPH debe compararse con el método de captura híbrida. La sensibilidad clínica debe establecerse en base a la capacidad de un test diagnóstico para detectar lesiones CIN2+, ya que el objetivo de un método de cribado es detectar las lesiones precursoras de cáncer cervical (CIN2+), y no lesiones de bajo grado que en la mayoría de las ocasiones se aclaran espontáneamente (Meijer y col., 2009).

La principal ventaja que presentan los métodos de detección de VPH mediante técnicas de PCR tipo-específicas, y en concreto el método evaluado en nuestro estudio, PCR-*microarray*, es la posibilidad de conocer qué tipos de VPH de alto riesgo están produciendo la lesión citológica, y poder estratificar a los pacientes en función del riesgo oncogénico, considerando que los tipos 16 y 18 son los de mayor oncogenicidad. Además, estos métodos de PCR, dada su elevada sensibilidad analítica, presentan una gran utilidad en estudios poblacionales y de seguimiento de la eficacia de las vacunas.

Evaluación de dos biomarcadores de progresión oncogénica, marcador inmunocitoquímico (p16/Ki-67) y marcador virológico (ARNm E6/E7)

La proteína p16^{ink4a} se expresa a un nivel muy bajo en células normales, sin embargo se sobreexpresa intensamente en líneas celulares de cáncer de cérvix en las que el gen del retinoblastoma (pRB) ha sido inactivado por la proteína E7 de los VPH de alto riesgo. Se ha observado que las células no displásicas, sobre todo las células metaplásicas, atróficas y endocervicales, pueden mostrar inmunorreactividad para p16, disminuyendo con ello la especificidad de la prueba.

La utilización simultánea de un doble marcador inmunocitoquímico, p16^{ink4a} (factor de desregulación del ciclo celular) y Ki-67 (factor de proliferación celular) permite estratificar mujeres con lesiones citológicas menores (ASCUS y LSIL), con el fin de identificar aquellas con mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado (CIN2+).

La expresión persistente de los oncogenes virales E6 y E7 constituyen un proceso necesario para el desarrollo de la carcinogénesis inducida por el VPH. Por lo tanto, la detección de ARNm de E6/E7 para tipos de alto riesgo puede ser un indicador no sólo de infección sino de un paso más en la progresión hacia el desarrollo de un cáncer. Como consecuencia, sería de esperar una especificidad aumentada para lesiones de alto grado comparada con la especificidad de la detección del ADN viral.

El incremento de la especificidad en la detección de ARNm de E6/E7 podría resultar especialmente útil en mujeres más jóvenes, dada una elevada prevalencia de la infección por VPH, en la mayoría de los casos transitoria, y así poder detectar de forma más específica aquellas mujeres que necesitan un mejor control y seguimiento para detectar la enfermedad. Según algunos autores (Cuschieri KS y col., 2004), la detección de ARNm se asocia a un mayor riesgo de desarrollar infecciones persistentes.

En nuestro estudio, evaluamos dos biomarcadores de progresión oncogénica, la tinción doble (p16^{ink4a}/Ki-67) y la detección de ARNm E6/E7

de VPH-AR en mujeres mayores de 25 años con resultados citológicos de ASCUS y/o LSIL.

Los resultados de concordancia de ambas técnicas fueron moderados en el caso de citología ASCUS (índice $\kappa=0,49$) y buenos en el caso de citologías LSIL (índice $\kappa=0,70$).

La utilización de estos biomarcadores celulares en mujeres jóvenes con lesiones citológicas de ASCUS y /o LSIL, podría permitir una estratificación de aquellas con mayor probabilidad de desarrollar lesiones precursoras de cáncer cervical, y solo en los casos positivos derivarlas a estudios colposcópicos. Por otra parte, el resultado negativo de estos estudios permitiría tener una actitud expectante y de seguimiento de la infección por VPH, dado que en la mayoría de estos casos son infecciones transitorias sin relevancia clínica.

El objetivo de nuestro trabajo no ha sido valorar la sensibilidad y especificidad de estos biomarcadores para identificar mujeres con riesgo de desarrollar lesiones de alto grado (CIN2+), sino estudiar las posibles discordancias entre ambos marcadores diagnósticos en lesiones celulares menores (ASCUS y LSIL).

Nuestros datos, confirman una mayor especificidad del estudio de ARNm E6/E7 con respecto a la tinción doble p16^{ink4a}/Ki-67, en lesiones LSIL (previas al desarrollo de lesiones de alto grado CIN2+), dado el menor número de falsos positivos detectados en estas lesiones, un 23% frente al 46,1% de la tinción doble.

Un estudio danés reciente (Waldstrøm M y col., 2013), evaluó la tinción doble p16^{ink4a}/Ki-67 en comparación con la detección de ARNm de E6/E7, en muestras de citología líquida de 469 mujeres con lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL). El seguimiento se realizó durante 5 años para detectar lesiones precursoras de alto grado (CIN 2/3). La concordancia entre los dos métodos evaluados en este estudio fue del 69,5%.

Cuando se analizaron los datos por grupos de edad, en menores y mayores de 30 años, se observaron diferencias significativas en cuanto a la especificidad de los dos métodos estudiados, siendo más elevada en el caso de ARNm y en mujeres mayores de 30 años. Estos datos concuerdan con nuestro estudio, donde la especificidad del ARNm es mayor que la obtenida con la tinción doble p16^{ink4a}/Ki-67, si bien en nuestra serie no estratificamos los resultados por grupos de edad, dado que la mayoría de las mujeres tenían más de 30 años.

Estos datos de menor especificidad del ARNm E6/E7 en mujeres jóvenes ha sido referido por otros autores (Szarewski y col., 2008). No obstante, otros autores indican una peor reproducibilidad de la tinción doble con respecto a la detección de ARNm, debido a la falta de estandarización e interpretación de la tinción inmunocitoquímica (Tsoumpou y col., 2009).

Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres tratadas mediante escisión con asa de diatermia por lesión cervical de alto grado.

El avance en el conocimiento de la historia natural de la infección por el VPH, así como el desarrollo de técnicas cada vez menos agresivas, ha dado lugar a que en los últimos años se haya producido una notable evolución en el tratamiento de las lesiones intraepiteliales. La conducta terapéutica ante este tipo de lesiones depende de su diagnóstico, que está condicionado por los resultados de la citología, la colposcopia, la biopsia y los resultados del test de VPH, junto con la información clínica.

El objetivo final del tratamiento es la eliminación de la neoplasia intraepitelial para evitar su progresión a carcinoma invasivo. Por ello, hay consenso respecto al tratamiento de todas las mujeres con lesión intraepitelial de alto grado (CIN2/3).

Por el contrario, el tratamiento de todas las mujeres con lesión de bajo grado (CIN1), dado que la mayoría son infecciones transitorias por el VPH, supondría un sobretratamiento innecesario, siendo aconsejable en estos casos, la observación sin tratamiento (Nobbenhuis y col., 2001).

El tratamiento de las neoplasias intraepiteliales (CIN2/3) mediante cualquiera de los métodos conservadores actualmente disponibles (bisturí frío, asa de diatermia, láser, crioterapia) consigue una tasa de curación del 85-95% (Martin-Hirsch y col., 2010). Esto significa que aproximadamente el 15% (rango: 5-25%) de las mujeres tratadas desarrollan una lesión residual/recurrente que se diagnostica en los siguientes 2 años (Kocken y col., 2011). Además, el riesgo de cáncer cervical entre las mujeres tratadas de neoplasia cervical es entre 3 y 12 veces mayor que el de la población general durante los siguientes 10-20 años (Soutter y col., 2006; Melnikow y col., 2009).

Algunos estudios ha establecido que las mujeres con márgenes libres de la pieza de escisión cervical, presentan un menor riesgo de recurrencia, aproximadamente del 5% y puede realizarse el seguimiento mediante el

estudio citológico (Paraskevaidis y col., 2000). En el caso de mujeres con afectación de márgenes de la conización, existen resultados dispares, ya que el riesgo de recurrencia varía desde un 16,2% (Vedel y col., 1993) hasta un 44% (White y col., 1991).

En los últimos años se ha demostrado que la persistencia de VPH-AR no sólo es un requisito necesario para el desarrollo de lesiones CIN 2/3 sino que además la persistencia postratamiento es el factor más importante de recidiva (Walboomers y col., 1999). Algunos estudios indican que a los 6 meses del tratamiento, aproximadamente el 70% de las mujeres presentan negativización del VPH, lo que significa un bajo riesgo de recidiva (Elfgrén y col., 2002; Kitchener y col., 2008).

Actualmente, las pruebas de detección de VPH de alto riesgo constituyen una herramienta muy útil en el seguimiento de estas pacientes. Si el test de VPH se realiza no antes de los 6 meses postratamiento, muestra una excelente sensibilidad para la detección de enfermedad residual. Aunque la repetición de citologías aumenta su sensibilidad, no llega a alcanzar los valores que ofrece la determinación del VPH. Sin embargo, la baja especificidad del test de VPH frente a la citología, apoya la necesidad de efectuar un seguimiento con ambas pruebas (Bar-Am y col., 2003).

En nuestro estudio, la detección de VPH presentó un valor de sensibilidad para detección de enfermedad residual muy superior al estudio citológico, del 93,7% y un valor predictivo negativo de 97,3%, mientras que en el caso de la citología éstos fueron del 75% y del 89%, respectivamente.

En una reciente revisión realizada por Kocken y col., 2012, se evaluaron diferentes estudios prospectivos, similar a nuestro estudio, de seguimiento de mujeres tratadas por lesión cervical de alto grado (CIN2+), con el fin de valorar la utilidad de la citología y el test de VPH como predictores de enfermedad residual.

En las siguientes tablas 27 y 28, se muestran los resultados comparativos de la sensibilidad (S) y especificidad (E) de estudios de citología y test de VPH realizados en distintos países, así como los obtenidos en nuestra serie.

Tabla 27. Revisión de estudios que valoran el estudio de la citología a los 6 meses del tratamiento en mujeres con lesión cervical de alto grado

Autores/año	País	Nº casos	S (IC 95%)	E (IC 95%)	Tipo citología
Cechini y col. 2004	Italia	84	0,80 (0,44-0,97)	0,84 (0,73-0,91)	No especificado
Sarian y col. 2004	Brasil	88	1,00 (0,59-1,00)	0,81 (0,71-0,89)	Convencional
Alonso y col. 2006	España	203	0,79 (0,58-0,93)	0,87 (0,81-0,91)	Convencional
Kreimer y col.2006	USA	485	0,78 (0,60-0,91)	0,69 (0,65-0,73)	Medio líquido
Verguts y col. 2006	Bélgica	72	0,67 (0,22-0,96)	0,91 (0,81-0,97)	Medio líquido
Smart y col. 2010	Nueva-Zelanda	99	1,00 (0,40-1,00)	0,84 (0,75-0,91)	Medio líquido
Kocken y col. 2011	Holanda	418	0,78 (0,63-0,89)	0,83 (0,79-0,87)	Convencional
ESTUDIO ACTUAL		129	0,75 (0,56-0,88)	0,67 (0,56-0,76)	Convencional

Tabla 28. Revisión de estudios que valoran el estudio de VPH a los 6 meses del tratamiento en mujeres con lesión cervical de alto grado

Autores/año	País	Nº casos	S (IC 95%)	E (IC 95%)	Test de VPH
Cechini y col. 2004	Italia	84	0,90 (0,55-1,00)	0,64 (0,52-0,74)	PCR
Sarian y col. 2004	Brasil	88	1,00 (0,59-1,00)	0,86 (0,77-0,93)	HC2
Alonso y col. 2006	España	203	0,96 (0,79-1,00)	0,76 (0,69-0,82)	HC2
Kreimer y col.2006	USA	485	0,91 (0,75-0,98)	0,64 (0,59-0,68)	HC2
Verguts y col. 2006	Bélgica	72	1,00 (0,54-1,00)	0,77 (0,65-0,87)	HC2
Smart y col. 2010	Nueva-Zelanda	99	1,00 (0,40-1,00)	0,88 (0,80-0,94)	HC2
Kocken y col. 2011	Holanda	418	0,87 (0,73-0,95)	0,87 (0,83-0,90)	PCR
ESTUDIO ACTUAL		129	0,93 (0,79-0,99)	0,75 (0,65-0,84)	HC2

HC2= Captura híbrida PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

La sensibilidad de la citología realizada a los 6 meses del tratamiento como predictor de lesión cervical residual/recurrente varía entre el 67% y el 100%, según los diferentes estudios. En nuestra serie, esta sensibilidad fue del 75%, similar a los estudios realizados en España (Alonso y col., 2006) y Holanda (Kockens y col., 2011), utilizando el mismo tipo de citología convencional.

Con respecto a la sensibilidad del test de VPH realizada a los 6 meses del tratamiento como predictor de lesión cervical residual/recurrente, los resultados varían entre el 87% y el 100%, siendo superiores en todos los casos a la citología. En nuestro estudio, esta sensibilidad fue del 93%, muy similar a los estudios anteriormente mencionados (Alonso y col., 2006; Kockens y col., 2011).

El elevado valor predictivo negativo de la prueba de detección de VPH (97,3% en nuestro estudio), permite reducir el seguimiento de mujeres con resultado negativo y al mismo tiempo, detectar más precozmente y con mayor exactitud la presencia de enfermedad residual o recurrencia.

A pesar de la elevada tasa de curación tras efectuar un tratamiento escisional (75,2% en nuestro estudio), resulta crucial el diagnóstico precoz de una posible persistencia o recidiva, para evitar la progresión al cáncer cervical. Por otro lado, la correcta identificación de las mujeres en las cuales el tratamiento escisional ha sido curativo, permite que estas mujeres puedan realizar su seguimiento mediante un protocolo de cribado convencional cada 3-5 años, y así reducir el número de visitas sucesivas innecesarias y la consiguiente sobrecarga asistencial.

El control y seguimiento de las pacientes tratadas por una lesión de alto grado (CIN2/3) es una parte muy importante de cualquier programa de prevención de cáncer de cérvix. La determinación de VPH-AR en el seguimiento de estas pacientes contribuye notablemente a mejorar el rendimiento de la citología y la colposcopia en la detección del fallo terapéutico de tal forma que actualmente se considera el estándar de referencia en el seguimiento de estas pacientes (Paraskevaidis y col., 2004; Chan y col., 2009).

VI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de la infección por VPH aumentó con el grado de severidad de la lesión citológica, pasando del 53,5% en ASCUS hasta el 78,9% en HSIL. Los genotipos 16 y 18 considerados responsables de hasta el 70% de los casos de cáncer cervical, en nuestro estudio representaron el 32,8% de lesiones LSIL y del 50,4% de lesiones HSIL.
2. La importancia clínica de las infecciones múltiples es un tema controvertido en la mayoría de los estudios epidemiológicos, así en nuestro estudio no se ha podido demostrar que las mujeres con infecciones múltiples (44,5%) presenten mayor riesgo de lesiones precursoras cervicales que aquellas con infecciones simples.
3. Las infecciones múltiples fueron más frecuentes en el grupo de mujeres de edades entre 25-34 años, pero no observamos un incremento significativo del número de tipos virales con la edad.
4. Los valores elevados de carga viral de VPH no se correlacionaron clínicamente con el grado de lesión citológica, por tanto consideramos que no es buen marcador de progresión oncogénica.
5. Los genotipos más prevalentes en mujeres con lesión intraepitelial cervical fueron los tipos 16, 31, 51 y 53. La elevada frecuencia del genotipo 31 (13,5%) detectado en nuestro trabajo, probablemente sea debida al mayor número de población inmigrante de Centroamérica y Sudamérica residente en nuestra comunidad. No obstante, observamos que el genotipo 45 es más prevalente en el área III-Lorca, donde la población de inmigrante norteafricanos es más significativa.
6. La técnica de PCR-*microarray* mostró excelentes resultados de sensibilidad (99%) y de especificidad (100%) en el contexto del diagnóstico asistencial oportunista de la infección por VPH.
7. La detección de ARNm E6/E7 de VPH de alto riesgo, presenta mayor especificidad clínica que el estudio inmunocitoquímico mediante p16^{ink4a}/Ki-67, permitiendo detectar precozmente aquellas mujeres con mayor riesgo de progresión neoplásica.

8. El test del VPH es un excelente marcador pronóstico de enfermedad residual o recurrencia en mujeres tratadas mediante escisión con asa de diatermia, dada su elevada sensibilidad (93,7%) y su elevado valor predictivo negativo (97,3%). Asimismo, un resultado negativo del test de VPH permitiría que estas mujeres pudieran derivarse a un cribado convencional cada 3-5 años.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology.** ACOG Practice Bulletin no. 109: Cervical cytology screening. *Obstet Gynecol* 2009;114:1409-20.
- Adab P, McGhee SM, Yanova J, Wong CM, Hedley AJ.** Effectiveness and efficiency of opportunistic cancer screening: comparison with organized screening. *Med Care* 2004;42:600-9.
- Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E et al.** Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006;103:631-6.
- An HJ, Cho NH, Lee SY, Kim IH, Lee C, Kim SJ et al.** Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. *Cancer* 2003;97:1672-80.
- Anderson GH, Benedet JL, Le Riche JC, Maticic JP, Thompson JE.** Invasive cancer of the cervix in British Columbia: a review of the demography and screening histories of 437 cases seen from 1985-1988. *Obstet Gynecol* 1992;80:1-4.
- Aral SO, Holmes KK.** Social and behavioral determinants of epidemiology of STDs: industrialized and developing countries. En: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, et al., editores. *Sexual transmitted disease*. Nueva York: McGraw-Hill, 1999: 5-79.
- Armstrong LR, Derkay CS, Reeves WC.** Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP Task Force. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:743-8.
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC.** Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991;60:1445-56.
- Bar-Am A, Gamzu R, Levin I, Fainaru O, Niv J, Almog B.** Follow-up by combined cytology and human papillomavirus testing for patients post-cone biopsy: results of a long-term follow-up. *Gynecol Oncol* 2003;91:149-53.
- Bello BD, Spinillo A, Alberizzi P, Cesari S, Gardella B, D'Ambrosio G et al.** Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: Prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *J Med Virol* 2009;81:703-12.

- Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S.** Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 1997;8:1277-86.
- Bernard HU.** The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005;32 (Suppl1):S1-6.
- Bocchetta M, Carbone M.** Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation. *Oncogene* 2004;23:6484-91.
- Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M et al.** 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 2012;120:166-72.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
- Bosch FX, Muñoz N, de Sanjosé S, Navarro C, Moreo P, Ascunze N et al.** Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2:415-22.
- Bouvard V, Baab R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F et al.** A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:321-2.
- Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch X, de Sanjosé S.** Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *JID* 2010;202:1789-99.
- Burchell AN, Winer RL, De Sanjosé S, Franco EL.** Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006;24(Suppl3):S52-S61.
- Campo MS.** The essential transforming proteins of HPV: E5, E6 and E7. *HPV Today*. N°7 October 2005. pp:8-10.
- Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N et al.** Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2008;181:1911-19.

- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N.** Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002;89:191-9.
- Castellsagué X, Muñoz N.** Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:20-8.
- Castle PE, Giuliano AR.** Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients-assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:29-34.
- Castle PE, Salomon D, Schiffman M, Wheeler CM.** Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1066-71.
- Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R et al.** Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1394-9.
- Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC et al.** A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005;191:1808-16.
- Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR et al.** Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002;95:2145-51.
- Cecchini S, Carozzi F, Confortini M, Zappa M, Ciatto S.** Persistent human papilloma virus infection as an indicator of risk of recurrence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by the loop electrosurgical excision procedure. *Tumori* 2004;90:225-8.
- Chan BK, Melnikow J, Slee CA, Arellanes R, Sawaya GF.** Posttreatment human papillomavirus testing for recurrent intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:422e1-9.
- Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M et al.** Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011;203:910-20.
- Chaturvedi AK, Myers L, Hammons AF, Clark RA, Dunlap K, Kissinger PJ et al.** Prevalence and clustering patterns of human

papillomavirus genotypes in multiple infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2439-45.

Choi YD, Jung WW, Nam JH, Choi HS, Park CS. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. *Gynecol Oncol* 2005;98:369-75.

Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lo renzato M et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J cancer* 2001;89:1616-23.

Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006;24(Suppl3):S26-S34.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vacarella S et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366(9490);991-8.

Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1157-64.

Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesion and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;89:101-5.

Cobo F, Concha A, Ortiz M. Human papillomavirus (HPV) type distribution in females with abnormal cervical cytology. A correlation with histological study. *Open Virol J* 2009;3:60-6.

Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 2005;6:204.

Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 1999;274:2696-705.

Cortés J, Martínón-Torres, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol* 2010;53(Suppl1):1-19.

- Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richarson H, Lapointe N et al.** Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002;40:902-7.
- CREM, Centro regional de estadística de Murcia.** Disponible en: <http://www.carm.es/econet/home.html>
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT.** Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65:606-12.
- Culp TD, Christensen ND.** Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 2004;319:152-61.
- Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA.** Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence-implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 2004;73:65-70.
- Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH et al.** Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008;26 Suppl10;K29-41.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307:1-11.
- de Oña M, Alvarez-Argüelles ME, Torrent, Villa L, Rodriguez-Feijoo A, Palacio A et al.** Prevalence, evolution and features of infection with human papillomavirus: a 15-year longitudinal study of routine screening of a women population in the north of Spain. *J Med Virol* 2010;82:597-604.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ.** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.
- de Sanjosé S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N et al.** Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2003;30:788-93.
- de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz et al.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:453-9.

de Sanjosé S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048-56.

de Sanjosé S. La investigación sobre la infección por virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de cuello de útero en España. En: de Sanjosé S, García AM, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención*. (4ª Monografía de la Sociedad española de epidemiología). Madrid EMISA, 2006. P. 141-6.

Delgado D, Marin JM, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios JL et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:230-35.

Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol* 2010;134:12-21.

Depuydt CE, Vereecken AJ, Salembier GM, Vanbrabant AS, Boels LA, van Herck E et al. Thin-layer liquid-based cervical cytology and PCR for detecting and typing human papillomavirus DNA in Flemish women. *Br J Cancer* 2003;88:560-6.

Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonogo J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol* 2009;45 (Suppl1):S55-61.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2006;110:524-41.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32(Suppl1):S7-15.

Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004;109:157-62.

Dunne EF, Unger ER, Stemberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007;297:813-9.

Elfgren K, Jacobs M, Walboomers JM, Meijer CJ, Dillner J. Rate of human papillomavirus clearance after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 2002;100:965-71.

- Eurogin 2013.** European Research Organization on Genital infection and Neoplasia. Joura E and col. Comunicación personal SS 8-4. Disponible en: <http://www.eurogin.com/2013>.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA.** Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomavirus. *J Virol* 1997;71:2449-56.
- Feldman S.** Making sense of the new cervical-cancer screening guidelines. *N Engl J Med* 2011; 365:2145-47.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefèvre P et al.** Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:928-34.
- Frazer IH.** Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004;4:46-54.
- Galan-Sanchez F, Rodriguez-Iglesias MA.** Comparison of human papillomavirus genotyping using commercial assays based on PCR and reverse hybridization methods. *APMIS* 2009;117:708-15.
- Garcia-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, González CA.** The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* 2005; 117:629-37.
- Garcia-Garcia JA, Pérez-Vallés A, Martorell M, Gómez B, Gómez-Cabrero D, Soler F et al.** Distribution of human papillomavirus types in women from Valencia, Spain, with abnormal cytology. *Acta Cytol* 2010;54:159-64.
- Giuliano AR, Papenfuss M, De Galaz EM, Feng J, Abrahamsen M, Denman C et al.** Risk factors for squamous intraepithelial lesions (SIL) of the cervix among women residing at the US-Mexico border. *Int J Cancer* 2004;109:112-8.
- González-Bosquet E, Esteva C, Muñoz-Almagro C, Ferrer P, Pérez M, Lailla JM.** Identification of vaccine human papillomavirus genotypes in squamous intraepithelial lesions (CIN2-3). *Gynecol Oncol* 2008;111:9-12.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357-61.

Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:820-2.

Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de SanJosé S, Franceschi S et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* 2012;131:2349-59.

Gustafsson L, Pontén J, Bergström R, Adami HO. International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. *Int J Cancer* 1997;71:159-65.

Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-603.

Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006;367:1247-55.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007;178:3186-97.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005;191:1796-807.

Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkman NW, van Tellingen JE, Meijer CJ et al. 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* 2009;124:381-6.

Heymans J, Benoy IH, Poppe W, Depuydt CE. Type-specific HPV genotyping improves detection of recurrent high-grade cervical neoplasia after conisation. *Int J Cancer* 2011;129:903-9.

- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T et al.** Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169:235-40.
- Hiller T, Iftner T.** The human papillomavirus. *Human papillomavirus and cervical cancer. HPV Handbook* 2004;1:11-26.
- Hiller T, Iftner T.** The human papillomavirus. In: Prendville W, Davies P, editors. *Human papillomavirus and cervical cancer. HPV Handbook.* London: Taylor & Francis; 2005. P.11-26.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.
- Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E et al.** Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004;92:873-80.
- Informe global de U.S.** Preventive Service Task Force (USP-STF).
Disponibile en: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/>
- Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH.** Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis* 2009;9:119.
- International Agency for Research on Cancer, IARC.** Monogr Eval Carcinog Risks Hum Col 100B 2011. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/index.php>
- International Agency for Research on Cancer.** IARC Handbooks of Cancer Prevention. Cervix cancer screening. Lyon: IARC Press. 2005.
- Kalof AN, Cooper K.** p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2006;13:190-4.
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR et al.** The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1072-9.
- Kim JJ, Leung GM, Woo PP, Goldie SJ.** Cost-effectiveness of organized versus opportunistic cervical cytology screening in Hong Kong. *J Public Health* 2004;26:130-7.

Kitchener HC, Walker PG, Nelson L, Hadwin R, Patnick J, Anthony GB et al. HPV testing as an adjunct to cytology in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG* 2008;115:1001-7.

Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jorgensen HO, Meijer CJ, Van den Brule AJ. Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1528-33.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.

Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59:6132-6.

Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 1998;153:1731-9.

Klinkhamer PJ, Meerding WJ, Rosier PF, Hanselaar AG. Liquid-based cervical cytology. *Cancer* 2003;99:263-71.

Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, Louwers JA, Nobbenhuis MA, Bais AG et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term mul-cohort study. *Lancet Oncol* 2011;5:441-50.

Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2006;15:908-14.

Lacey CJ. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol* 2005;32 (Suppl1):S82-90.

Lacey CJN, Lowndes CM, Shah KV. Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine* 2006;24(Suppl3):S35-S42

- Lai CH, Chang CJ, Huang HJ, Hsueh S, Chao A, Yang JE et al.** Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3628-34.
- Lajous M, Mueller N, Cruz-Valdez A, Aguilar LV, Franceschi S, Hernández-Ávila M et al.** Determination of prevalence, acquisition and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1710-6.
- Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL.** Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* 1998;72:2160-7.
- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM.** Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011;128:927-35.
- Longworth MS, Laimins LA.** Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:362-72.
- Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S et al.** Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002;360:228-9.
- Lowy DR, Howley PM.** Fields virology. In: Knipe DM, Howley PM. Editors. *Papillomavirus*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams and Wilkins;2001. P.2231-64.
- Luu HN, Dahlstrom KR, Mullen PD, VonVille HM, Scheurer ME.** Comparison of the accuracy of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction in detecting clinically important cervical dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Med Insights Oncol* 2013;7:247-55.
- Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL.** Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(6):CD001318.
- Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G et al.** Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009;124:516-20.
- Melnikow J, McGahan C, Sawaya GF, Ehlen T, Coldman A.** Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:721-8.

- Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M.** DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 2004;10:3059-63.
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Beckmann ER, Schröder S, Gissmann L et al.** Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J Infect Dis* 1998;178:252-5.
- Mincheva A, Gissman L, zur Hausen A.** Chromosomal integration sites of papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med Microbiol Immunol* 1987;176:245-56.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ.** Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;32:43-51.
- Moscicki AB, Ellemberg JH, Farhat S, Xu J.** Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis* 2004;190:37-45.
- Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N et al.** The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 1998;132:277-84.
- 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;364:1678-83.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M et al.** Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-60.
- Münger K, Howley PM.** Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213-28.
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, De Sanjosé S, Hammouda D, et al.** Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004;111:278-85.
- Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.** Epidemiology classification on human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.

- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A, Gissmann L.** HPV in etiology of human cancer. *Virology* 2006; 24(Suppl3):S1-S10.
- Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB.** Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000;151:1158-71.
- National Cancer Institute Workshop.** The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytology diagnoses. *JAMA* 1989;262:931-34.
- Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando et al.** P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004;445:616-20.
- Nobbenhuis 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.
- Ortiz M, Torres M, Muñoz L, Fernández-García E, Canals J, Carbonero AI et al.** Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish populations groups with different levels of HPV infection risk. *J Clin Microbiol* 2006;44:1428-34.
- Ostör AG.** Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186-92.
- Otero-Motta AP, Ordóñez JL, González-Celador R, Rivas B, Macías MC, Bollón A et al.** Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *APMIS* 2011;119:204-15.
- Paraskeivaidis E, Lalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N et al.** Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003;24:541-3.
- Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G et al.** The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2004;30:205-11.
- Paraskevaidis E, Lolis ED, Koliopoulos G, Alamanos Y, Fotius S, Kitchener HC.** Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after large loop excision with clear margins. *Obstet Gynecol* 2000;95:828-31.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.

Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 2004;64:1359-68.

Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA et al. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3822-7.

Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M, Doninger JK, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987;61:1061-6.

Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:941-46.

Pista A, Verdasca N, Oliveira A. Clinical performance of the CLART human papillomavirus 2 assay compared with the hybrid capture 2 test. *J Med Virol* 2011;83:272-6.

Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynecol* 1989;96:1054-60.

Puig-Tintoré LM, Cortés X, Castellsagué X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S et al. Prevención del cáncer cuello uterino ante la vacunación frente a virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol* 2006;49(Suppl2):5-62.

Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 2004;78:7199-207.

Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P et al. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the hybrid capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2010;48:2779-85.

Rebrikov DV, Bogdanova EA, Bulina ME, Lukianov SA. A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtraction hybridization. *Mol Bio* 2002;36:1002-11.

- Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A et al.** The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:485-90.
- Richart RM.** Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 1973;8:301-28.
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L et al.** SEER Cancer Statistic Review, 1975-2002. Bethesda: National Cancer Institute, 2005.
- Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M et al.** Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2013 Nov 1. doi:pii: S0140-6736(13)62218-7.
- Sabol I, Salakova M, Smahelova J, Pawlita M, Schmitt M, Gasperov NM et al.** Evaluation of different techniques for identification of human papillomavirus types of low prevalence. *J Clin Microbiol* 2008;46:1606-13.
- Safaeian M, Herrero R, Hildesheim A, Quint W, Freer E, Doorn LV et al.** Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5,683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J Clin Microbiol* 2007;45:1447-54.
- Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjänen KJ.** HPV DNA test and Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical excision procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2004;94:181-6.
- Saslow D, Solomon D, Herschel WL, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J et al.** American Cancer Society, American Society for Colposcopy, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin* 2012;62:147-72.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
- Schiffman M, Kjaer SK.** Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl cancer Inst Monogr* 2003;31:14-9.

SEGO. La infección por papilomavirus. Documento de consenso 2002. Disponible en: http://www.labec.net/doc/documento_sego.pdf

Selva L, González-Bosquet E, Rodríguez-Plata MT, Esteva C, Suñol M, Muñoz-Almagro C. Detection of human papillomavirus infection in women attending a colposcopy clinic. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:416-21.

Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237:7-13.

Sherman ME, Schiffman M, Cox JT and ALTS Triage Study Group. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2002;94:102-7.

Siebers AG, Klinkhamer PJ, Arbyn M, Raifu AO, Massuger LF, Bulten J. Cytologic detection of cervical abnormalities using liquid-based compared with conventional cytology: a randomised controlled trial. *Obstet Gynecol* 2008;112:1327-34.

Smart OC, Sykes P, Macnab H, Jennings L. Testing for high risk human papilloma virus in the initial follow-up of women treated for high-grade squamous intraepithelial lesions. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010;50:164-7.

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, 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.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R et al. Human papillomavirus types distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621-32.

Sneijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *APMIS* 2010;118:520-8.

Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* 2003;201:1-6.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-9.

- Soutter WP, de Barros Lopes A, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaidis E et al.** Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 1997;349:978-80.
- Soutter WP, Sasiene P, Panoskaltsis T.** Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006;118:2048-55.
- Stoler MH.** Advances in cervical screening technology. *Mod Pathol* 2000;13:275-84.
- Strander B, Andersson-Ellstrom A, Milsom I, Sparen P.** Long term risk of invasive cancer after treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 3: population based cohort study. *BMJ* 2007;335:1077.
- Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G et al.** Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3033-42.
- Tavassoli FA, Devilee P.** International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer: s.n., 2003.
- Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes C.** A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:895-903.
- Thomas M, Pirn D, Banks L.** The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999;18:7690-700.
- Tropé A, Sjøborg K, Eskild A, Cuschieri K, Eriksen T, Thoresen S et al.** Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia. *J Clin Microbiol*;47:2458-64.
- Trottier H, Franco EL.** The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006;24(Suppl1):S1-S15.
- Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P et al.** p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009;35:210-20.

- Tucker RA, Johnson PR, Reeves WC, Icenogle JP.** Using the polymerase chain reaction to genotype human papillomavirus DNAs in samples containing multiple HPVs may produce inaccurate results. *J Virol Methods* 1993;43:321-33.
- U.S.Preventive Services task Force:** Screening for cervical cancer: recommendation statement. *Ann Intern Med* 2012;156:880-91.
- Urdaneta-Machado JR, Uhia AM, Cepeda de Villalobos M, Guerra M, Baabel-Zambrano N, Contreras-Benítez A.** Conización con asas diatermias en lesiones premalignas de cuello uterino. *Prog Obstet Ginecol* 2011;54:511-17.
- Vacarella S, Franceschi S, Snijders PJ, Herrero R, Meijer CJ, Plummer M et al.** Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:503-10.
- van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA et al.** Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: a indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002;98:590-5.
- Vandepapeliere P, Barrasco R, Meijer CJ, Walboomers JM, Wet-tendorff M, Stanberry LR et al.** Randomised controlled trial of an adjuvanted human papillomavirus (HPV) type 6 L2E7 vaccine: infection of external anogenital warts with multiple HPV types and failure of therapeutic vaccination. *J Infect Dis* 2005;192:2099-107.
- Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen M et al.** Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. *BJOG* 2006;113:1303-7.
- Vernon SD, Unger ER, Williams D.** Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol* 2000;38:651-5.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T et al.** Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000;81:2959-68.
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer et al.** Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 2008;68:307-13.

- Voglino G, Poso F, Privitera S, Parisio F, Ghiringhello B, Gordini G et al.** The role of human papillomavirus in cyto-histological practice: distribution and prevalence of high-risk strains (16, 18, 31, 33 and 35) in intraepithelial lesions and neoplasia of the uterine cervix. *Pathologica* 2000;92:516-23.
- von Knebel Doeberitz M.** New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002;38:2229-42.
- Vonka V, Kanka J, Roth Z.** Herpes simple type 2 virus and cervical neoplasia. *Adv Cancer Res* 1987;48:149-91.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD et al.** Validation of p16INK4a as a marker oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1355-60.
- 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;275:87-94.
- White CD, Cooper WL, Williams RR.** Cervical intraepithelial neoplasia extending to the margins of resection in conization of the cervix. *J Reprod Med* 1991;36:635-8.
- WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer.** Human papillomavirus and related cancers in Spain. Summary Report 2010. Disponible en: <http://www.hpvcentre.net>
- Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM et al.** Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 2005;191:731-8.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS.** The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7:11-22.
- Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D.** 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:340-5.

Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:46.e1-46.e11.

Yang BH, Bray FI, Parkin DM, Sellors JW, Zhang ZF. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer* 2004;109:418-24.

Yee C, Krishnan-Hewlett Z, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cells lines. *Am J Pathol* 1985;119:361.

zur Hausen H. Human papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55-78.