



UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA

Facultat de Ciències de la Salut

Programa de Doctorat en Atenció Primària

Proyecto de Investigación. Tesis doctoral

Directora:

Dra. María Ángeles Lorente

**Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II y III: Estudio
morfométrico de sus diferencias y relación con el Virus del
Papiloma Humano**

Miguel Ángel Carrasco García

Marzo 2010

“ Prohibida la reproducción total o parcial de este documento por medio de imprenta, fotocopia, microfilm u otros medios, sin autorización expresa de la Universitat Internacional de Catalunya y del autor”

Agradecimientos

A la Dra. Marian Lorente que sin su apoyo entusiasta y sus ánimos nunca habría realizado este Doctorado.

A la Dra. Montserrat Girabent por su inestimable ayuda en el trabajo estadístico.

A Teresa Muntal que ha colaborado en la búsqueda de información.

Al Dr. Felip García por su ayuda en mi trabajo cotidiano.

Al personal técnico y administrativo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Catalunya: Marina Urbano, Anna Ramón, Cristina Caupena y Montse Mestres.

A todos aquellos compañeros del hospital que en diferentes etapas de este trabajo me han apoyado: Cristina Puntí, Jordi Leira, Elena O'Callaghan, Vicente Marco.

Y finalmente a mis hijos Abel y Mariona y muy especialmente a Carmen, mi esposa, por haberme dado de forma tan generosa parte de nuestro tiempo compartido, para yo poder realizar este trabajo.

Terrassa, 2 de marzo de 2010

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción

1.1. Introducción.....	2
1.2. Importancia del cáncer cervical.....	2
1.3. Lesiones preneoplásicas.....	3
1.4. Virus del Papiloma Humano.....	7
1.5. Prevalencia VPH.....	12
1.6. Aspectos clínicos de la infección por VPH.....	14
1.7. Alteraciones morfológicas en la infección por VPH.....	16
1.8. Lesiones citológicas causadas por VPH.....	19
1.9. Lesiones histológicas causadas por VPH.....	22
1.10 Tratamiento de CIN 2 y CIN 3.....	31
1.11 Perspectivas futuras del estudio del VPH.....	31
1.12 Justificación y estructura del trabajo	32

Capítulo II. Hipótesis

2.1 Hipótesis.....	35
--------------------	----

Capítulo III. Fundamentos

3.1 Fundamentos	37
-----------------------	----

Capítulo IV. Objetivos

4.1. Objetivos	39
----------------------	----

Capítulo V. Material y métodos

5.1. Ámbito de estudio.....	41
5.2. Población diana.....	41
5.3. Población de estudio.....	41
5.4. Criterios de inclusión.....	41
5.5. Criterios de exclusión.....	41
5.6. Muestra.....	42
5.7. Metodología de trabajo.....	42
5.8. Análisis estadístico.....	51

Capítulo VI. Resultados	
6.1 Resultados.....	54
Capítulo VII. Discusión	
7.1 Discusión.....	75
Capítulo VIII. Conclusiones	
8.1 Conclusiones.....	82
Capítulo IX. Líneas de investigación futuras	
9.1 Líneas de investigación futuras.....	84
Capítulo X. Bibliografía.....	86
Capítulo XI. Anexos	
11.1 Hoja de recogida de datos.....	94
11.2 Hoja Excel de entrada de datos.....	95

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Durante la década de 1990, aparecieron numerosos estudios epidemiológicos con apoyo en estudios moleculares que ponían de manifiesto el papel causal de algunos serotipos del Virus del Papiloma Humano (VPH) en el desarrollo del cáncer cervical y sus lesiones precursoras (1). En 1995 la International Agency of Research on Cancer (IARC) catalogó los genotipos VPH 16 y 18 como carcinógenos humanos (2). Posteriormente en el 2003, nuevos estudios de la IARC incorporaron como carcinógenos a los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 y como probablemente oncogénicos los tipos 26, 53 y 66 (3). El VPH ha sido propuesto como la primera causa necesaria en un cáncer humano. Es decir que el cáncer cervical no se desarrolla sin la presencia persistente de ADN del VPH.

1.2 Importancia del cáncer cervical

El cáncer cervical es el séptimo cáncer más frecuente a nivel mundial y en las mujeres es el segundo cáncer más frecuente después del cáncer de mama. Aproximadamente representa un 12% de todos los cánceres en mujeres. Los últimos datos estadísticos sobre la incidencia del cáncer a nivel mundial son del año 2002 y se publicaron el año 2005 (4). Se estima que durante el 2002 se diagnosticaron 493.000 nuevos casos de cáncer cervical y se produjeron 274.000 fallecimientos. Se calcula que alrededor de 1.4 millones de mujeres viven con un cáncer cervical invasivo (5). La incidencia es superior en países en desarrollo ya que el 83% de casos ocurre en dichos países y en ellos es la principal causa de mortalidad por cáncer en la mujer. Mientras que en los países en desarrollo el cáncer cervical corresponde a un 15% del total de cánceres en las mujeres y un riesgo antes de los 65 años del 1.5 %, en los países desarrollados corresponde a un 3.6 % y un riesgo del 0.8%.

Las mayores incidencias las encontramos en el África sub-Sahariana, Melanesia, América Latina, Caribe y Asia centrosur y sudeste, como podemos observar en la fig. 1. La edad media de las pacientes al diagnóstico es de 47 años en Norte América.

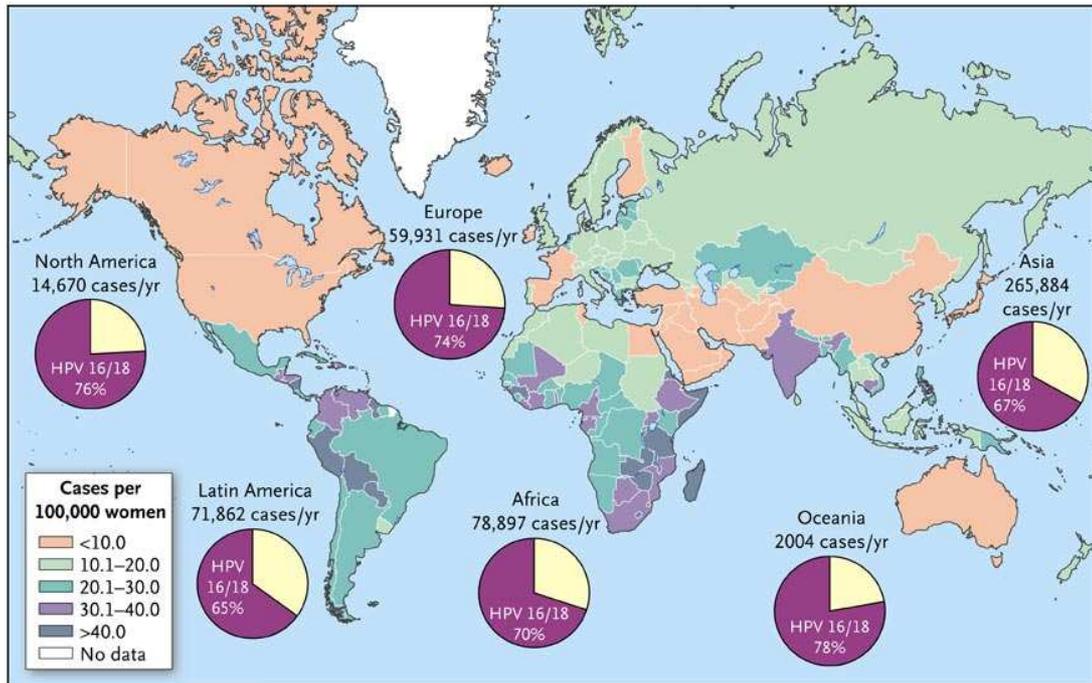


Fig. 1 Incidencia mundial de cáncer cervical durante el año 2002 (www-dep.iarc.fr/globocan/database.htm)

La mayoría de casos de cáncer cervical corresponden a carcinomas escamosos invasivos (CEI) y una pequeña proporción se trata de adenocarcinomas.

1.3 Lesiones preneoplásicas del cáncer cervical

El carcinoma escamoso cervical puede ser detectado en fases precoces, debido a que evoluciona lentamente desde unos estadios preinvasivos (fig. 2). que pueden ser distinguidos morfológicamente mediante estudios citológicos y/o biopsicos.

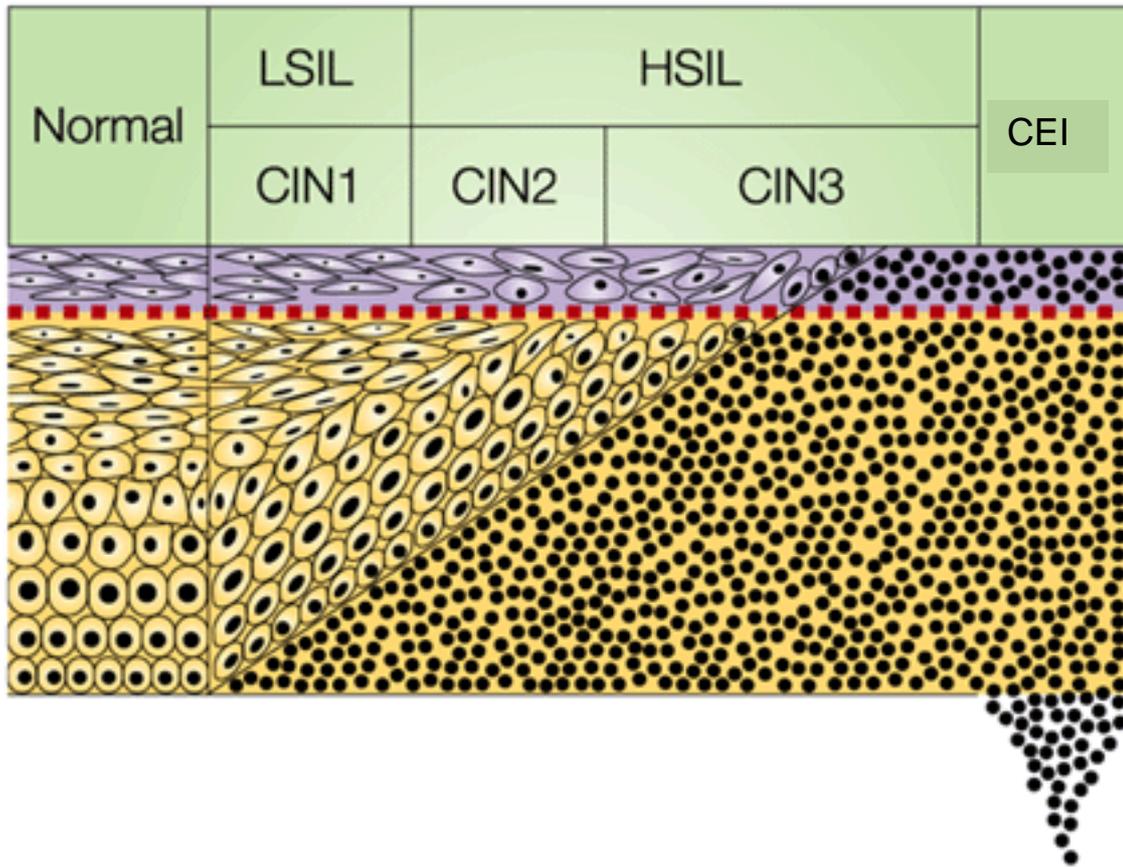


Fig. 2 Esquema de la expresión morfológica de CIN y CEI. Adaptado de Baldwin (5)

Estas fases preinvasivas del carcinoma escamoso se clasifican en dos o tres grados según el sistema de clasificación citológico o biopsico. Este modelo morfológico de carcinogénesis progresiva por etapas desde normal a CIN 1, progresando a CIN 2, luego CIN 3 y por último el carcinoma invasor, fue adoptado por la comunidad científica desde los estudios realizados por Richart en 1969 (6). El modelo morfológico de carcinogénesis progresiva ha dado paso a un nuevo modelo con un papel fundamental por parte del VPH en cuatro estadios: infección por VPH, persistencia versus resolución de la infección por VPH, progresión a precáncer y finalmente invasión (7).

En los estudios citopatológicos las lesiones preneoplásicas se clasifican como Lesiones Intraepiteliales Escamosas (SIL, siglas en inglés de Squamous Intraepithelial Lesion) en dos grados, basándose en las recomendaciones realizadas en las reuniones de Bethesda del 1988, 1991 y 2001 (8):

- SIL de bajo grado (LSIL en inglés)

- SIL de alto grado (HSIL en inglés)

En los estudios histopatológicos las lesiones precursoras se clasifican como Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN, siglas en inglés) en tres grados siguiendo la clasificación de la Organización Mundial de la Salud del 2003 (9):

- CIN 1
- CIN 2
- CIN 3

La correspondencia entre las dos clasificaciones es:

- SIL de Bajo Grado en citopatología = CIN 1 en histopatología
- SIL de Alto Grado en citopatología = CIN 2 y 3 en histopatología

El año 1941 ocurrió un hecho que cambiaría la evolución natural del cáncer cervical. El Dr. George Nicholas Papanicolaou (fig. 3) nacido en Grecia el 1883 y que se trasladó a Estados Unidos en 1913. Empieza a trabajar sobre los cambios epiteliales vaginales relacionados con el ciclo estrogénico en los conejos de indias mediante estudios vaginales citológicos. Posteriormente aplicó los conocimientos adquiridos en las mujeres y en 1941 describió el método de estudio citológico vaginal y las alteraciones morfológicas del cáncer invasivo cervical así como de sus lesiones preinvasoras.



Fig. 3 El Dr. George Nicholas Papanicolaou en 1958 (www.teslasociety.com/pap.htm)

A partir de aquel momento y de forma progresiva se inician los estudios citológicos periódicos de cribado en las mujeres, coloquialmente denominados Papanicolaou o Pap, que serán capaces de detectar el cáncer en una fase preinvasiva y tras su tratamiento adecuado se evitará la aparición del cáncer invasor.

La implementación progresiva de los estudios citológicos entre la población de los países desarrollados en las décadas de 1960 y 1970 ha conseguido disminuir la incidencia del cáncer cervical de forma significativa en dichos países. Como ejemplo podemos citar que en Estados Unidos la incidencia del cáncer cervical era de 38 por 100.000 a finales de los 50, tasa muy similar a la observada actualmente en los países en desarrollo. En cambio actualmente es menor de 14.5 por cada 100.000 mujeres (10). Estos resultados han llevado a las diferentes Sociedades Científicas mundiales implicadas en el diagnóstico precoz y tratamiento de las lesiones cervicales inducidas por el VPH a recomendar los estudios citológicos periódicos del cuello uterino como instrumento fundamental para la disminución de la incidencia del carcinoma invasivo (11-13).

Desde que en la década de 1990 se demostró que la infección por VPH era causa necesaria para el desarrollo del cáncer cervical se han ido introduciendo nuevos métodos de estudio para mejorar la sensibilidad y especificidad de los estudios citológicos. Actualmente se están introduciendo los estudios citológicos en capa fina y los estudios moleculares para detección del VPH (5).

En los países en desarrollo la introducción progresiva de programas de cribado citológico poblacional conseguirá importantes reducciones en la incidencia de cáncer cervical.

La reciente introducción de las vacunas contra VPH 16/18 conseguirán erradicar en un futuro cerca de un 70% de los casos de cáncer cervical (14;15) en aquellos países que pongan en marcha el programa de vacunaciones en la población adolescente que no aún no ha tenido contacto con el virus.

1.4 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El Virus del Papiloma es un virus ADN perteneciente a la familia Papillomaviridae (16). Representa un grupo de virus muy heterogéneo ampliamente distribuido en la naturaleza, infectando principalmente vertebrados. Son virus epiteliotropos que infectan piel y mucosas, como la bucal y la anogenital. Se han identificado más de 200 tipos de Virus del Papiloma (VP), de los que unos 100 afectan a la especie humana (VPH) y de estos unos 40 afectan el área ano-genital. Los VPH (fig. 4) son virus de tamaño pequeño (55 nm), no encapsulados, presentan una simetría icosaédrica con 72 capsómeros y poseen una doble cadena circular de ADN de unos 8.000 pares de bases.

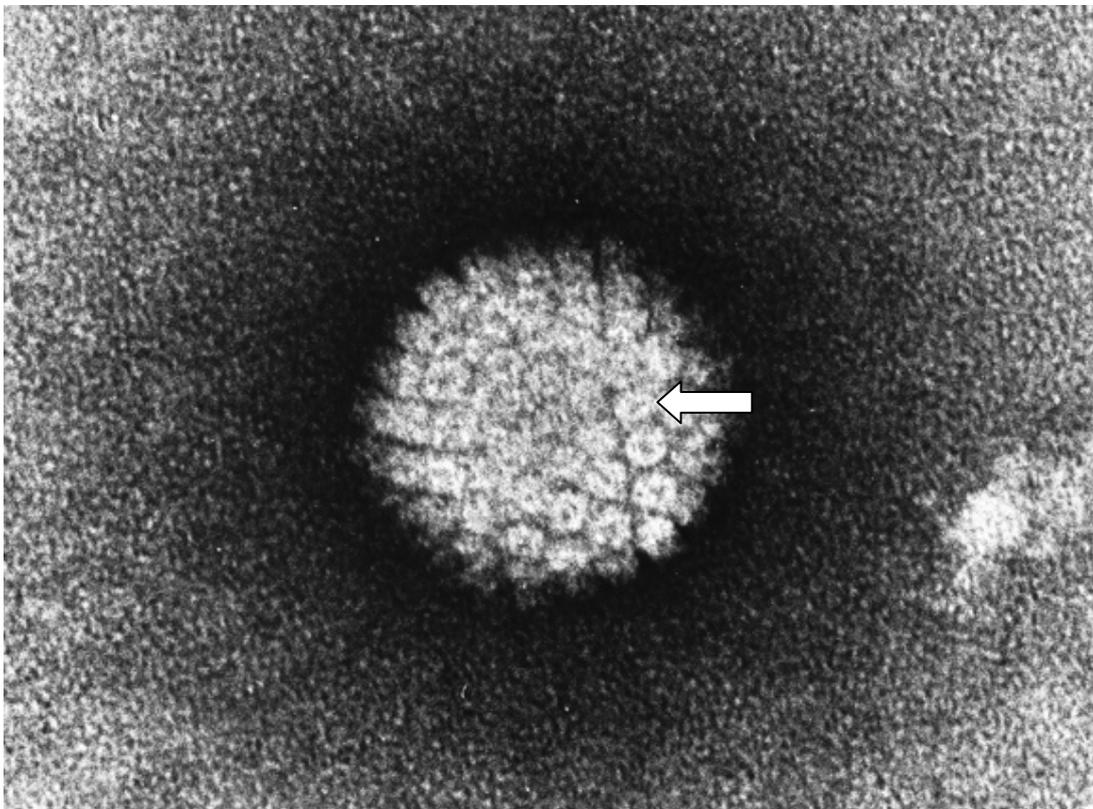


Fig. 4 Microfotografía electrónica del VPH. Flecha blanca indicando los capsómeros.
(modificado de www.wikimedia.org)

El genoma (fig. 5) se compone de genes precoces (E) y tardíos (L). Los genes L1 y L2 codifican las proteínas que forman parte de la cápside viral y es contra estas proteínas que se dirige la respuesta inmune del huésped. Los genes precoces E1 a E7 tienen diferentes funciones, siendo algunos de ellos los causantes de la transformación neoplásica de los queratinocitos infectados.

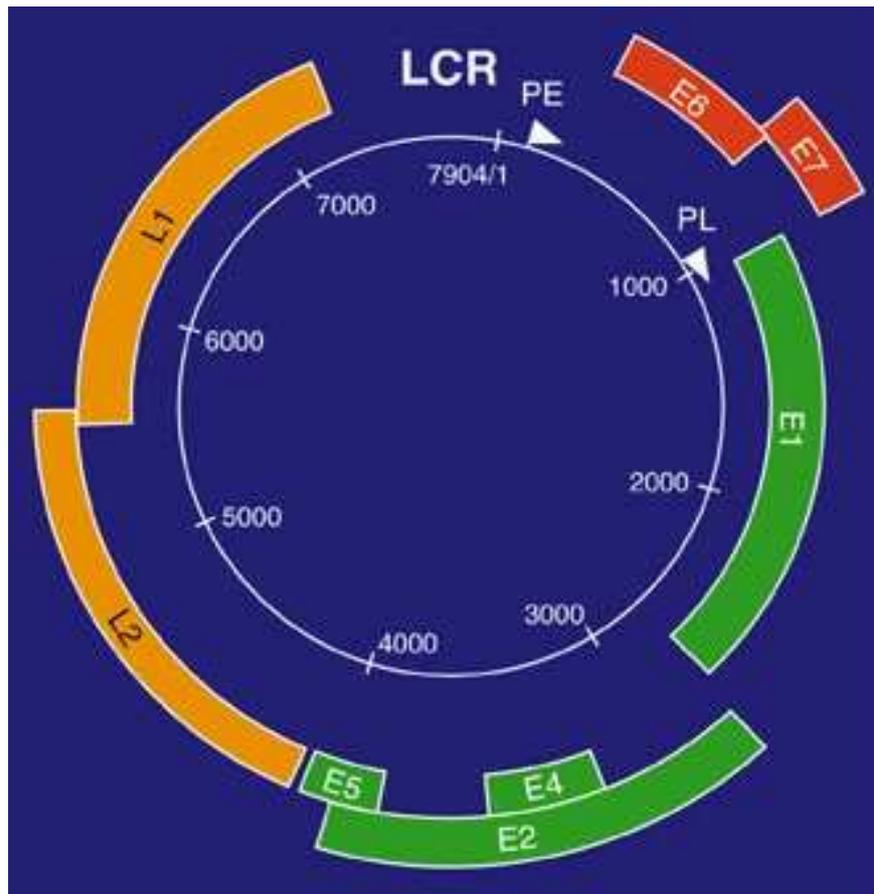


Fig. 5 Esquema del genoma viral del VPH. Adaptado de Schiffman (23).

Estos virus tienen dos formas de replicación: una en la que existe una replicación estable de un bajo número de copias virales en forma episomal en las células basales, o bien una replicación productiva en células que se dividen continuamente. En el epitelio escamoso normal, la proliferación celular está restringida a unas pocas células de la capa basal, finalizando el ciclo celular en las células suprabasales que las conducirá a la diferenciación terminal. Cuando el VPH infecta la capa basal y parabasal, se pueden detectar, mediante hibridación in situ, la expresión de los genes precoces, pero no de las proteínas estructurales de la cápside. En contraste la expresión de los genes tardíos de las proteínas estructurales y del ensamblaje viral completo está restringido a las células superficiales más diferenciadas del epitelio escamoso que están destinadas a la descamación (fig.6).

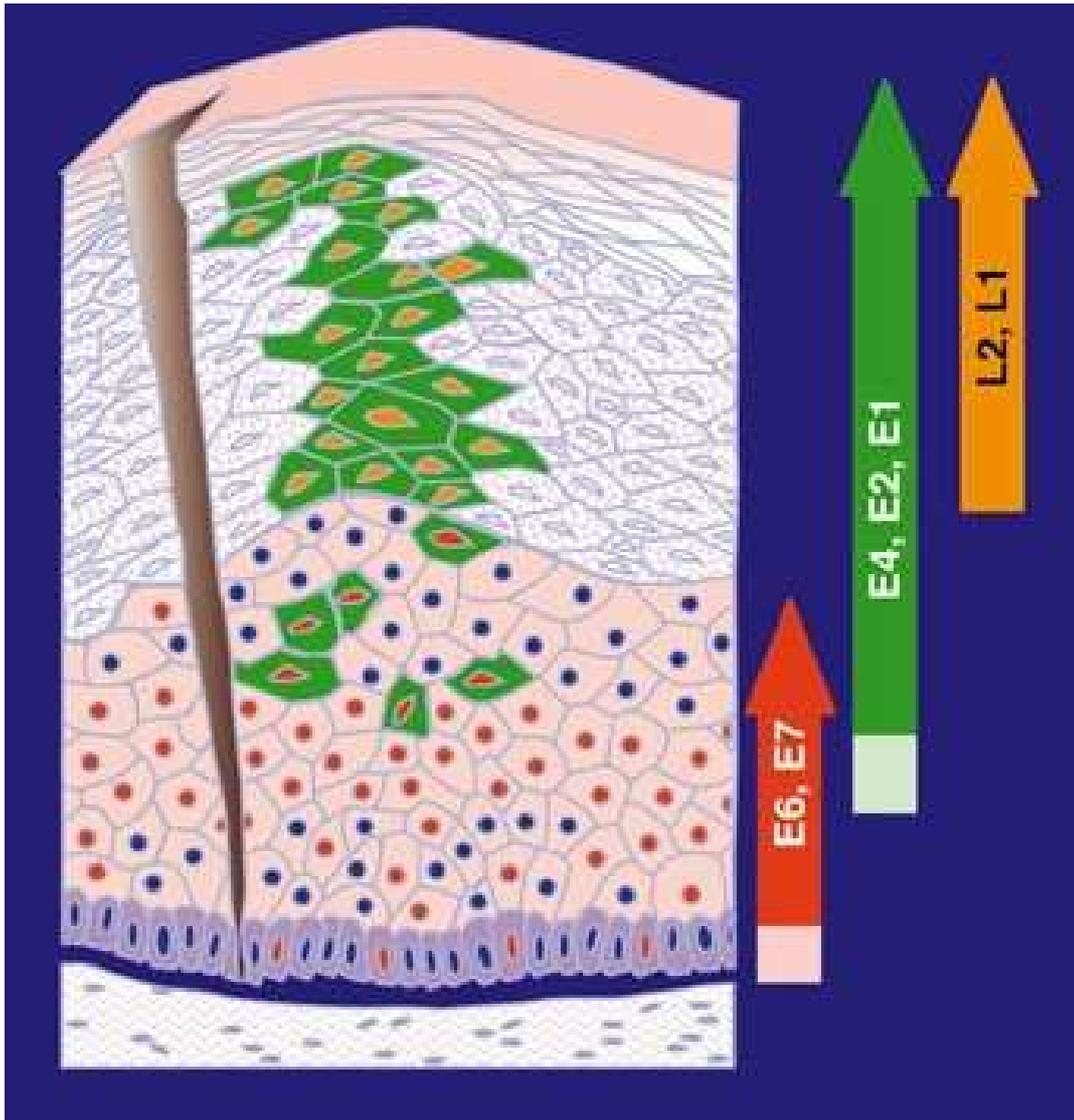


Fig. 6 Expresión de proteínas virales en el epitelio. Adaptado de Schiffman (23).

La replicación viral está íntimamente ligada a la diferenciación de las células epiteliales. Consecuentemente, la replicación del ADN viral, transcripción del genoma viral, así como la formación de la cápside, sólo ocurre en los queratinocitos, las células con la capacidad de la maduración escamosa.

El receptor celular para el VPH se encuentra en las células basales del epitelio, aunque actualmente se desconoce el receptor específico. El virus alcanza las células basales a través de abrasiones y microtraumas, pero sin causar infección sistémica, ni respuesta inflamatoria local. En las lesiones benignas y displasias de bajo grado, el virus existe en forma episomal en las células basales y células más diferenciadas. Sólo se replica, no obstante, en los núcleos de las células

infectadas y no se transmite la infección de una célula a otra, sino que se disemina a consecuencia de la degeneración de las células descamadas.

A nivel citológico e histológico, el efecto citopático que causa en la célula escamosa madura es el coilocito (figs. 7 y 8) que se caracteriza por presentar un halo claro perinuclear y un núcleo irregular, agrandado e hiper cromático que frecuentemente presenta fenómenos de binucleación.

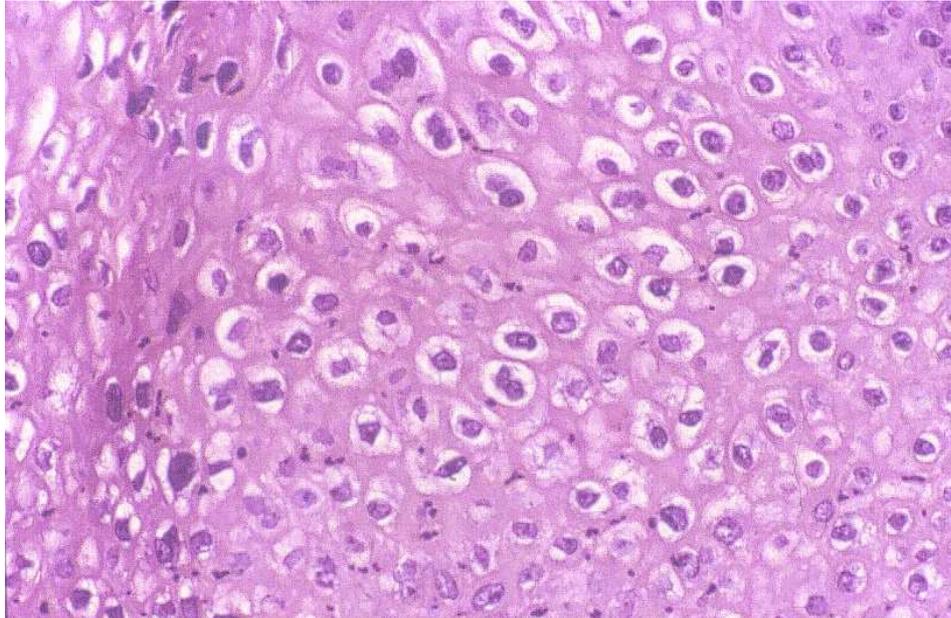


Fig. 7 Aspecto de los coilocitos en las capas superficiales de un epitelio escamoso infectado por VPH. (Hematoxilina-eosina, x400)*.

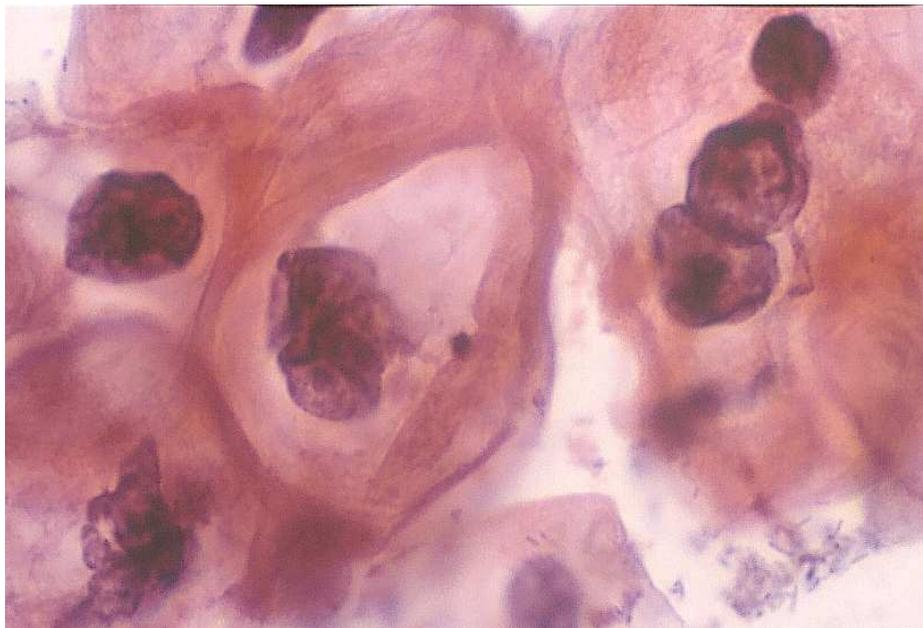


Fig. 8 Aspecto de los coilocitos observados en un frotis citológico. (Papanicolaou x2000)*.

Las lesiones precursoras reflejan el espectro de la atipia epitelial inducida por el VPH, que van desde proliferaciones epiteliales benignas, tipo condiloma acuminado, hasta alteraciones del desarrollo celular, inestabilidad génica y expresión viral génica alterada, como ocurre en CIN.

En la mayoría de cánceres vemos que el genoma viral está integrado en el ADN celular, aunque sin presentar un cromosoma específico para la integración. De forma similar, tampoco existe un sitio específico de integración viral, aunque con VPH 16 se ha visto que frecuentemente ocurre cerca de la región viral E1/E2 que corresponde a una zona de regulación de la transcripción viral. La integración provoca una pequeña delección de ADN, de unas 3 kilobases, y por tanto una disrupción de E2. Esto se acompaña de un aumento en la expresión de los oncogenes E6 y E7, debido a que un producto del gen E2, una proteína transcripcional activadora, reprime la acción de E6 y E7 por unión con la región promotora p97 (17), pero con la disrupción de E2 desaparece el control negativo de E6 y E7 desaparece. Este hecho se considera una parte fundamental en el desarrollo y progresión tumoral.

Se ha comprobado que la reintroducción de E2 en el carcinoma escamoso cervical VPH 16 provoca la inactivación de p97 y que las células tumorales mueren vía apoptosis. En general todos los tumores VPH positivos mantienen la expresión de E6 y E7. Sin embargo, la integración viral en el genoma celular no es un evento necesario para el desarrollo del cáncer, ya que se ha visto en algunos tumores que el VPH sólo aparece en forma episomal.

El efecto oncogénico del VPH de alto riesgo reside principalmente en dos de sus oncoproteínas precoces, la E6 y la E7, y en parte la E5. En una célula normal el daño en el ADN induce la detención del ciclo celular y la reparación del ADN o la apoptosis celular, pero estos mecanismos quedan alterados por la interacción de los oncogenes del VPH, anulando la detención del ciclo celular y la apoptosis.

Las dianas de las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 son factores de transcripción celular (p53, familia de Rb, Quinasa Ciclina Dependiente 2, Ciclinas E y A) que

regulan el ciclo celular en G1. La unión de E7 con pRb degrada Rb y provoca una proliferación celular anormal. El gen del Rb actúa en condiciones normales impidiendo la entrada de la célula en el ciclo celular por inactivación de la proteína E2F, una proteína indispensable para la entrada en el ciclo celular y regulación de la transición de G1/S. Por tanto la inactivación de Rb por E7 provoca la no inactivación de E2F y no impide la entrada en el ciclo celular. La pérdida de la función Rb conduce en condiciones normales a la activación de p53 que suprime el desarrollo celular e induce la apoptosis. Sin embargo en el cáncer cervical la actividad del gen p53 está intacta y la proteína p53 se expresa en las células transformadas, pero su actividad se ha perdido por la unión con las oncoproteínas E6 del VPH. La inactivación y degradación de p53 por E6 ocurre a través de una vía ubiquitina. La pérdida de la apoptosis mediada por p53 es por tanto un hecho fundamental en la progresión tumoral. En lesiones con CIN de bajo grado la expresión de E6/E7 se encuentra principalmente en células espinosas diferenciadas que están fuera del ciclo celular. En cambio, en CIN de alto grado y carcinomas escamosos, la mayor expresión de E6/E7 la encontramos en células con actividad proliferativa.

A pesar que el VPH inmortaliza las células escamosas, se requieren otros cofactores o carcinógenos para causar tumorigenicidad. Este requisito se refleja en el hecho de la desproporción que existe entre la prevalencia de las tasas de infección por VPH comparadas con las del cáncer causado por VPH.

1.5 Prevalencia del VPH

Un metaanálisis publicado por de Sanjosé (18) el 2007 sobre publicaciones realizadas entre 1995 y 2005 abarcando una población de estudio a nivel mundial de 157.879 mujeres sanas sin alteraciones en los estudios citológicos presentaban una prevalencia de VPH positivo del 10.4%. La tasa era del 8.4% en los países desarrollados y del 13.4% en los países en vías de desarrollo. La prevalencia del VPH 16 entre aquellas mujeres fue del 2.6%. A nivel mundial los cinco VPH más frecuentes fueron los genotipos 16, 18, 58, 52 y 51, mientras que en Europa fueron los 16, 18, 31, 33 y 58. La prevalencia en mujeres jóvenes se acercaba al 30%, disminuyendo a continuación y aumentando de nuevo entre los

35 y 55 años. Este segundo pico de mayor prevalencia se da en América del Norte entre los 35 y 45 años, mientras que en Europa se produce entre los 45 y 55 años. Los motivos de esta discordancia se creen debidos más a factores de comportamiento sexual diferente en los dos grupos poblacionales, más que a factores relacionados con el propio VPH. Según los datos aportados por este trabajo se estima en unos 291 millones las mujeres portadoras de VPH a nivel mundial.

La prevalencia del VPH es de aproximadamente un 50% en ASCUS y oscila entre el 20-50% en Lesiones de Bajo Grado y el 70-90% en Lesiones de Alto Grado, siendo más frecuente en CIN 3 que en CIN 2 (19;20). La prevalencia del VPH 16 en SIL a Europa es de un 51.8 % mientras que a nivel mundial es de un 45.4 %. A continuación vienen los VPH 31, 33, 58 y 18.

La prevalencia del VPH en cáncer cervical (21-24) es de prácticamente el 100% y de estos un 70% son causados por VPH 16 o 18. En la tabla 1 se exponen las diferencias de prevalencia entre Europa y el resto del mundo.

Tabla 1 Prevalencia mundial y europea del VPH (de Sanjosé, 1995-2005)

VPH	Prevalencia mundial	Prevalencia Europa
16	54.4	57.9
18	15.9	15.8
33	4.3	4.4
45	3.7	2.9
31	3.5	4.0

1.6 Aspectos clínicos de la infección por VPH

Los VPH que infectan los epitelios humanos se subdividen en virus de bajo riesgo, principalmente asociados a verrugas genitales y virus de alto riesgo, aquellos que alguna vez han sido detectados en cáncer (25). Entre los virus de bajo riesgo o no oncogénicos tenemos los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81. Entre los de alto riesgo u oncogénicos tenemos los tipos 16 y 18 como más frecuentes y 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Como probablemente oncogénicos deben ser considerados los tipos 26, 53 y 66. Los tipos VPH-16 y VPH-18 han sido categorizados como de alto riesgo, en base a que se encuentran en más del 50% de los CIN grado 2 y 3 y en aproximadamente 70% de los cánceres de cérvix.

La infección por VPH puede cursar de tres formas: clínica, subclínica o latente. La forma clínica habitual son las verrugas y condilomas genitales. La infección subclínica no es visible a simple vista y es necesario la realización de un estudio colposcópico del cérvix, pene, vagina, vulva o ano tras la aplicación de ácido acético (fig. 9) y puede ser diagnosticada citológicamente mediante frotis cervicovaginales o en biopsia.

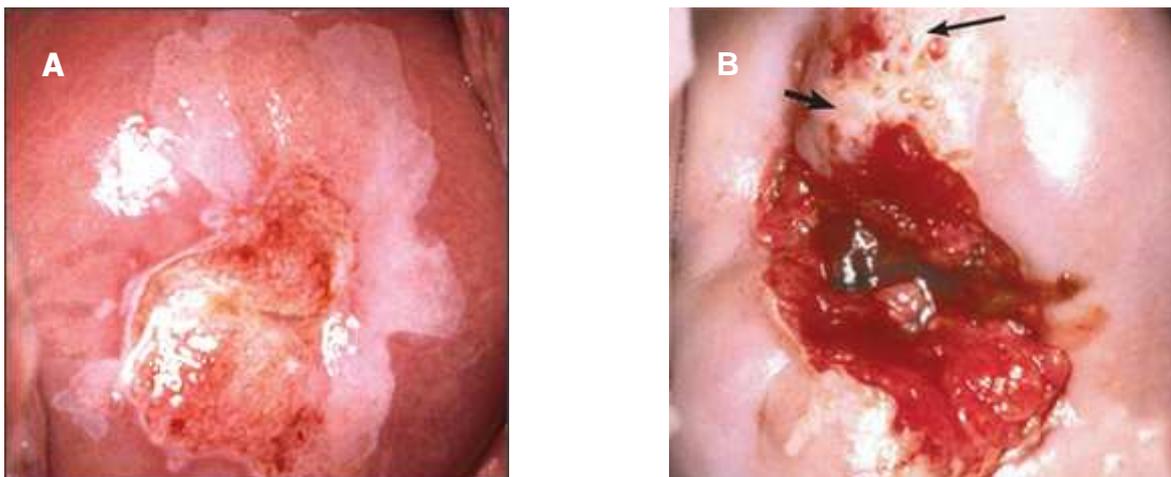


Fig. 9 Imágenes colposcópicas del cérvix uterino mostrando Lesiones de (A) Bajo y (B) Alto Grado. (American Family Physician www.aafp.org.)

La infección latente sólo puede ser detectada mediante técnicas moleculares. Los factores que influyen la transición de formas clínicas a subclínicas o latentes no están muy claros, pero parece que ser que la inmunidad juega un papel fundamental (26).

El espectro de lesiones clínicas causadas por VPH es amplio y va desde proliferaciones celulares benignas como verrugas y papilomas hasta tumores malignos (fig. 10).

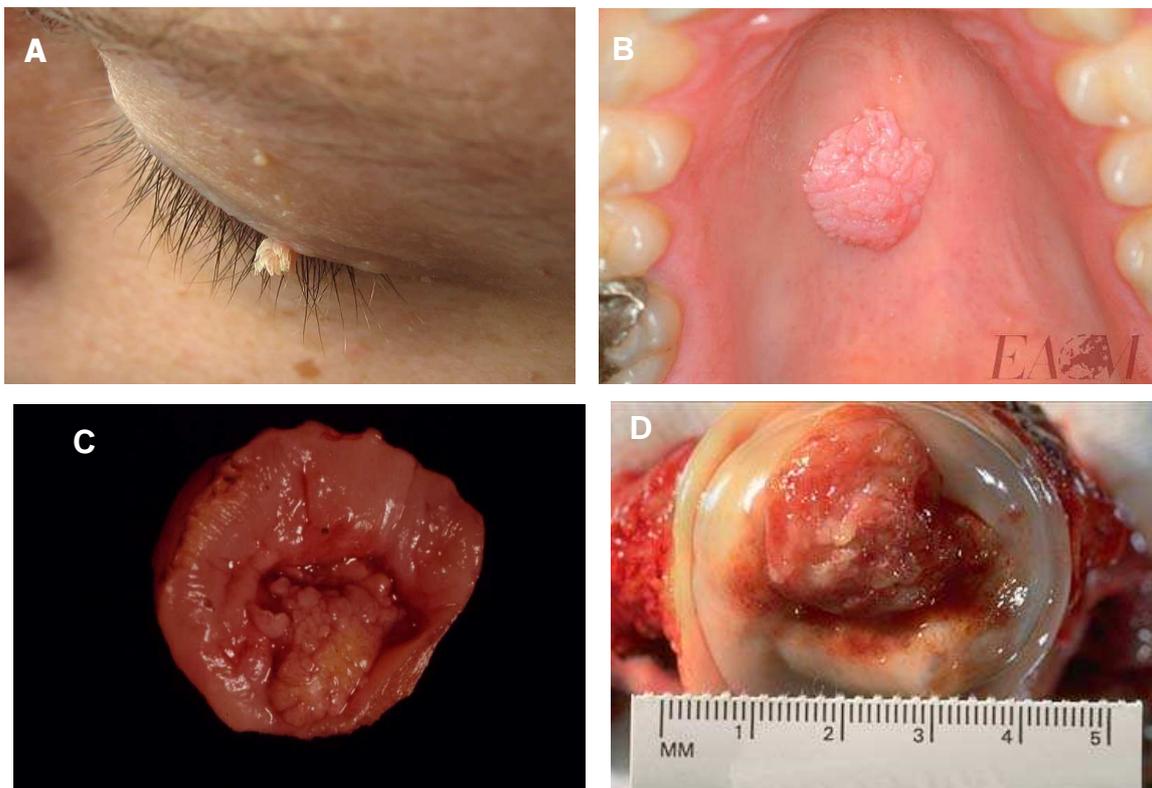


Fig. 10 Formas clínicas de infección por VPH. **A** - Verrugas cutáneas. **B** – Papiloma oral. **C** – Condiloma cervical. **D** – Carcinoma escamoso cervical. Imágenes obtenidas de Internet: Enciclopedia libre Wikipedia <http://en.wikipedia.org> (A), European Association of Oral Medicine www.eaom.net (B), Geneva Foundation for Medical Education and Research <http://pathcuric1.swmed.edu> (D). Propia (C).

Causan verrugas cutáneas (verruca plantar por VPH 1, 2 y 4; verrugas comunes por VPH 2, 4, 26, 27, 29, 57; verrugas planas por VPH 3, 10, 28, 49; verruga del carnicero por VPH 7), papilomas laríngeos (VPH 6, 11), condilomas anogenitales (VPH 6, 11, 42, 44, 54) y lesiones preneoplásicas (VPH 6, 11, 16, 18, 30s, 40s, 50s, 60s). La asociación de VPH oncogénicos con neoplasias malignas se ha

detectado en un 20% de casos de orofaringe, 10-20% esofágicos, 10% laríngeos, 80-90% carcinoma escamoso cutáneo, 50% de carcinomas basocelulares y para los cánceres anogenitales en más del 95% de casos del cérvix, 50% de vagina, 85% anales, más del 30% de vulva y 25% del pene (27).

1.7 Alteraciones morfológicas en la infección por VPH

El VPH alcanza el cuello uterino vía transmisión sexual e infecta las células basales y parabasales en áreas de erosión de la unión escamocolumnar (fig. 11) de la zona de transformación.

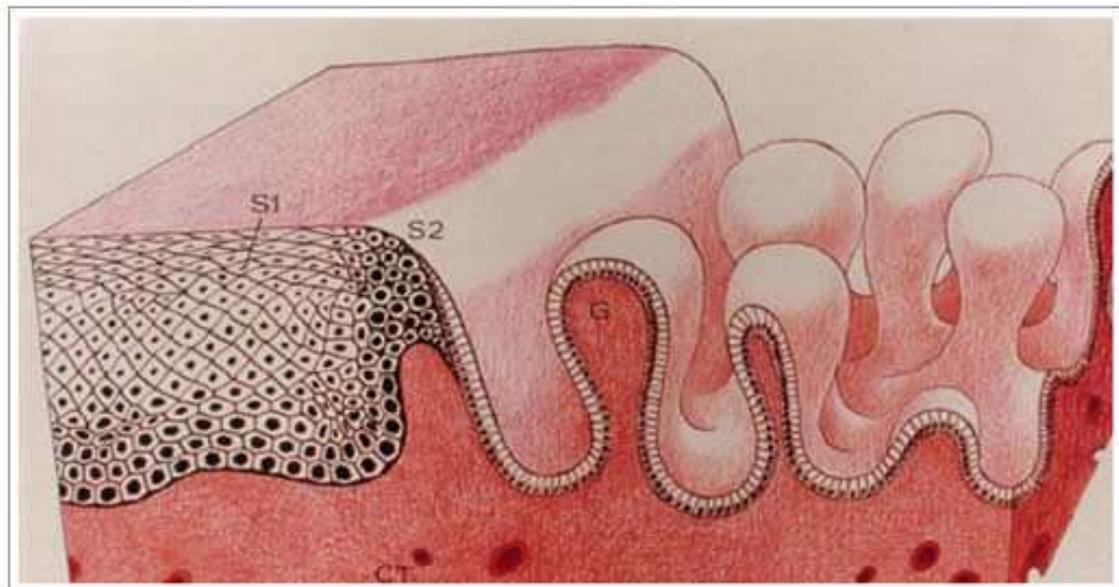


Fig. 11 Esquema de la unión escamocolumnar del cérvix. S1 Epitelio escamoso exocervical. S2 Zona de transformación con metaplasia escamosa y la unión escamocolumnar. G Epitelio columnar mucosecretor endocervical. (www.vcs.org.au).

La zona de transformación corresponde a aquella zona del cuello uterino en donde el epitelio escamoso estratificado del exocervix se une al epitelio cilíndrico mucosecretor del endocervix que desde la infancia a la edad adulta de la mujer se ha ido introduciendo en el canal endocervical a través de un epitelio escamoso metaplásico. Tal como se representa en el esquema de la fig. 12 en donde podemos apreciar la situación inicial de la unión escamocolumnar en la infancia, que se sitúa en una zona exocervical, para pasar a una zona más endocervical en

la vida adulta, existiendo un epitelio escamoso metaplásico que unirá la unión escamocolumnar original con la de la vida adulta.

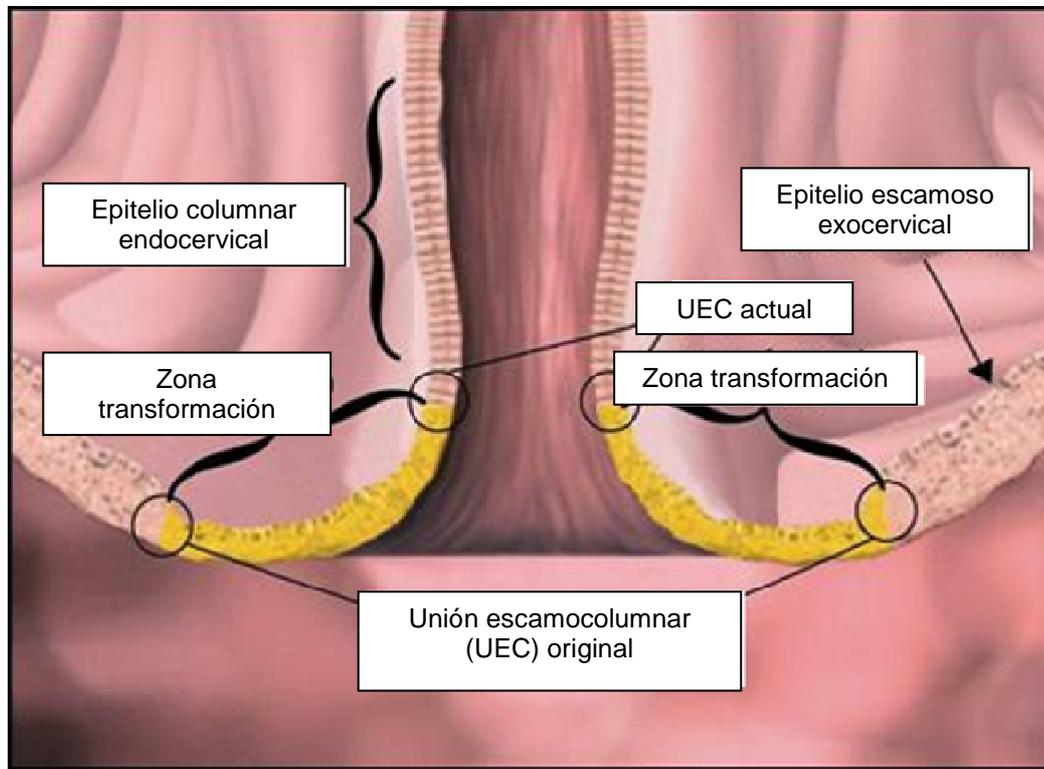


Fig. 12 Variación de la unión escamocolumnar en el cérvix. Modificado de www.prn.org.

En la figura 13 podemos apreciar los diferentes epitelios existentes a nivel cervical: un epitelio escamoso estratificado bien glucogenizado en la porción exocervical, seguido de un epitelio escamoso más inmaduro que corresponde al epitelio escamoso metaplásico que es el que acabará contactando con el epitelio endocervical para formar la unión escamocolumnar.

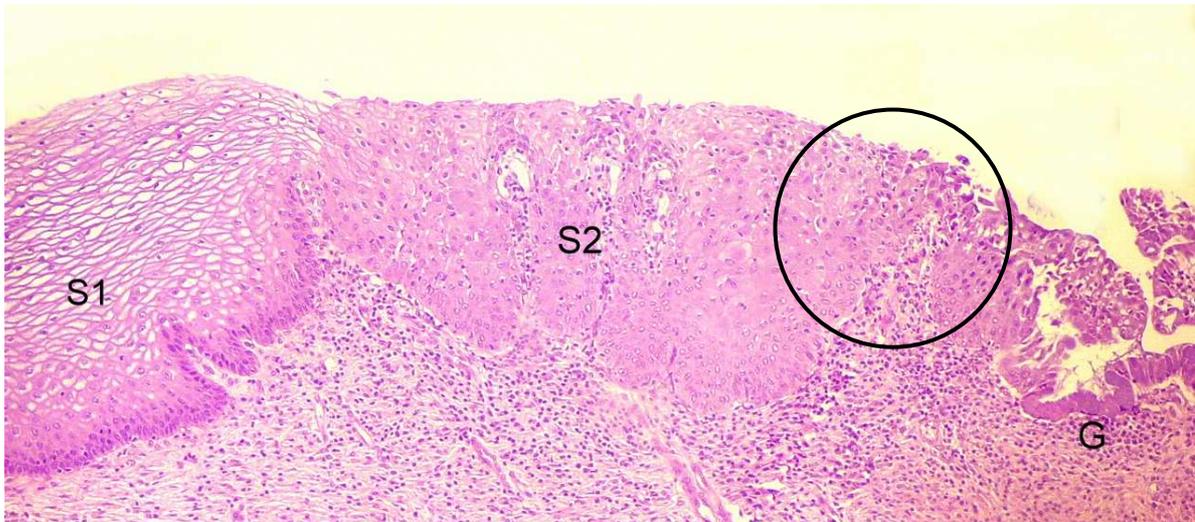


Fig. 13 Unión escamocolumnar cervical. **S1** Epitelio escamoso exocervical. **S2** Zona de transformación con metaplasia escamosa y la unión escamocolumnar rodeada por un círculo. **G** Epitelio columnar mucosecretor endocervical. (Hematoxilina-eosina, x200)*.

En la zona indicada con un círculo en la fig. 13 se quiere señalar la puerta de entrada del VPH aprovechando pequeñas erosiones en dicho epitelio que dejarían expuestas las células basales del epitelio escamoso a la infección por el virus.

La incubación se produce durante un periodo de pocos meses a un año y posteriormente podrá aparecer la lesión intraepitelial escamosa.

Está ampliamente aceptado que la persistencia del VPH es crucial para el desarrollo de las lesiones cervicales preneoplásicas y el cáncer (28;29). La mayor parte de infecciones por VPH son transitorias y en 1-2 años (30) son indetectables incluso mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Probablemente estas infecciones son resueltas mediante la inmunidad celular del huésped.

Se define la persistencia, como la detección del mismo tipo de VPH dos o más veces durante un cierto periodo de tiempo, que va de unos meses a un año. Esta definición debiera ser revisada ya que sabemos por numerosos estudios que el

tiempo de resolución habitual en estas infecciones es de un año, por lo que no sería correcto hablar de persistencia en una infección de un año.

La Dra. Molano en un excelente trabajo (31) realizado en mujeres colombianas durante un periodo de más de 5 años, demostró que el tiempo de aclaramiento de la infección con VPH (tiempo de resolución de la infección por VPH y que por tanto dejamos de detectar el virus mediante estudios moleculares del DNA) ocurre principalmente durante los dos primeros años después de la primera detección del VPH, con casi un 80% de aclaramiento durante el primer año. Posteriormente al segundo año es muy raro que ocurra dicho aclaramiento. Otro dato muy interesante de dicho estudio es que la tasa de aclaramiento para VPH 16 es mucho menor que para el resto de VPH de alto o bajo riesgo, como también ya se había detectado en otros estudios (32;33).

Las infecciones con VPH de bajo riesgo se resuelven de forma espontánea. Las lesiones que contienen virus de alto riesgo persisten más tiempo y progresan más rápido (34). Algunas lesiones se inician como lesiones de alto riesgo.

1.8 Lesiones citológicas escamosas causadas por VPH

Desde un punto de vista citológico la clasificación de las lesiones secundarias a infección por VPH sigue las recomendaciones de la última reunión de Bethesda del 2001 (35) clasificándose como Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado (LSIL) y Alto Grado (HSIL) (fig. 14) en base principalmente a las características nucleares y al tamaño celular.

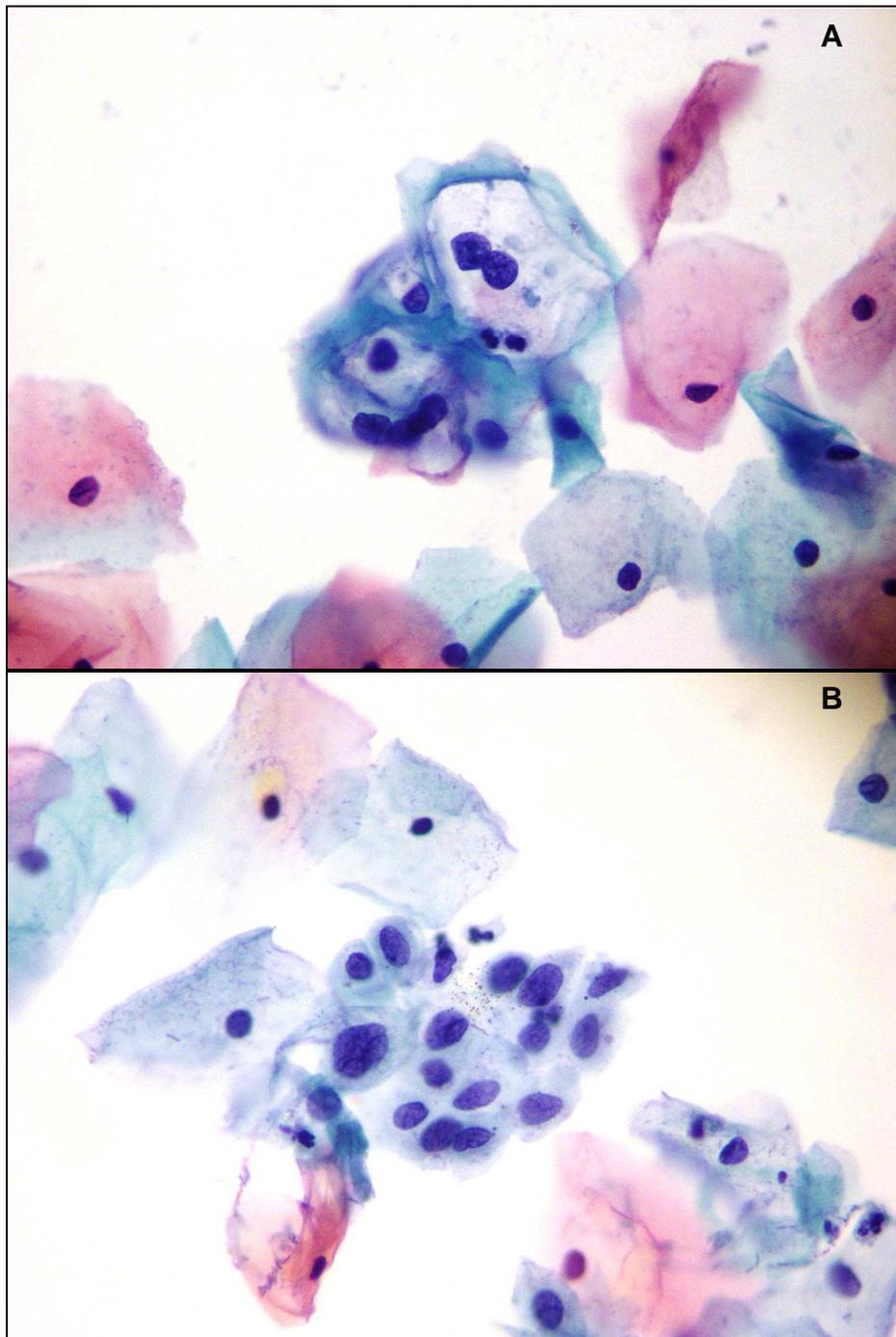


Fig. 14 Hallazgos citológicos secundarios a infección por VPH. **A** - LSIL. **B** – HSIL. (Papanicolaou x600)*.

Para aquellas alteraciones citológicas que no cumplen todos los requisitos de LSIL se introduce el término de Células Escamosas Atípicas de Significado Incierto (ASC-US) y las que presentan características sospechosas de HSIL (fig. 15), pero no cumplen todos los requisitos, se denominan, Células Escamosas Atípicas Sospechosas de HSIL (ASC-H).

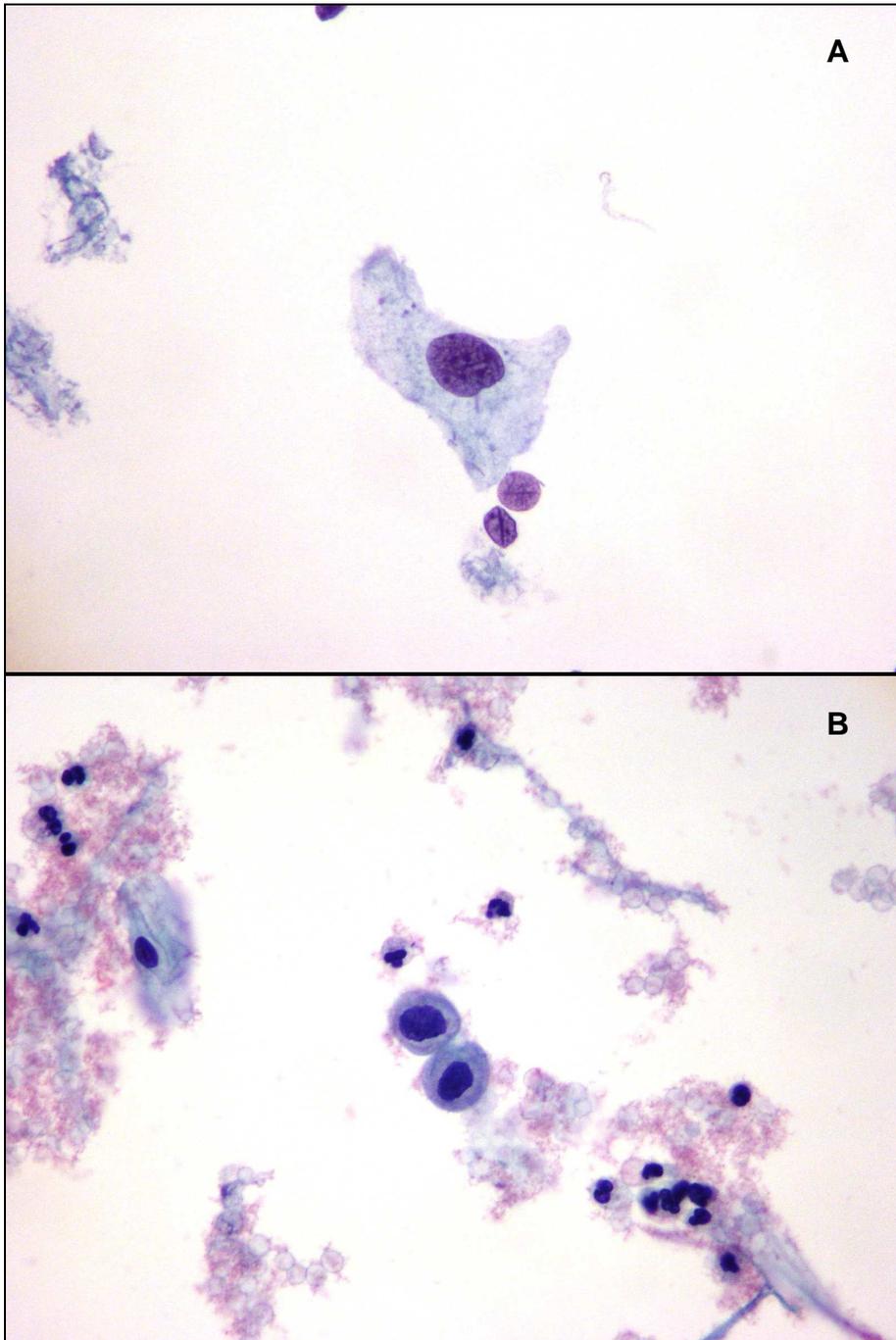


Fig. 15 Frotis citológicos con células escamosas atípicas. **A** – ASC-US. **B** – ASC-H.
(Papanicolaou x600)*.

1.9 Lesiones histológicas causadas por VPH

Las lesiones histológicas en el epitelio escamoso que podemos observar en el cérvix secundarias a la infección por VPH son:

- Lesiones de bajo grado (LBG): Condilomas y CIN 1
- Lesiones de alto grado (LAG): CIN 2 y CIN 3
- Carcinomas microinvasivos
- Carcinoma escamoso invasivo

Histológicamente se diferencian por el grado de proliferación del epitelio basaloide, la atipia celular, la actividad mitótica y los cambios coilocíticos existentes en el epitelio. De tal forma que en las lesiones de bajo grado predomina la coilocitosis, como cambio citopático que causa la infección por VPH en el epitelio escamoso cervical y la proliferación celular del epitelio basaloide es escasa y las mitosis únicamente se encuentran en la zona basal. Por el contrario en las LAG se observa mayor atipia celular con menor cambio coilocítico, actividad mitótica aumentada con mitosis que alcanzan la superficie epitelial y la proliferación del epitelio basaloide puede alcanzar la superficie epitelial.

En los Condilomas acuminados (figs. 16 y 17) se observa una proliferación plana o papilar del epitelio escamoso con abundantes coilocitos y mínima proliferación del epitelio basal. La actividad mitótica está limitada a la zona basal.



Fig. 16 Condiloma acuminado en el que observamos papilomatosis asociada a coilocitosis. (Hematoxilina-eosina, x40)*.

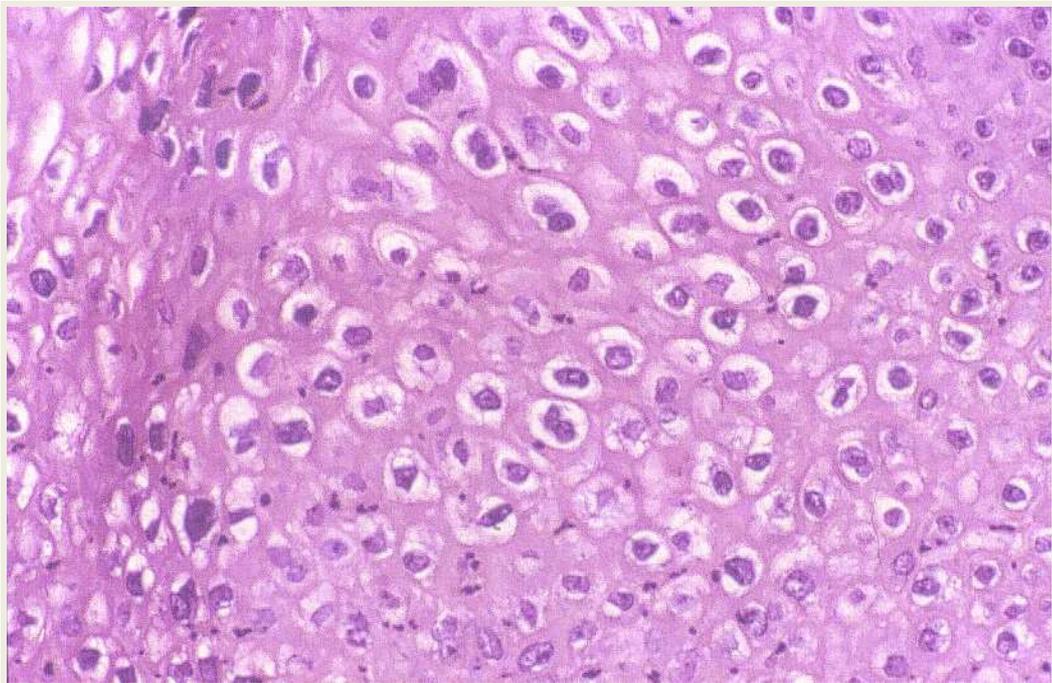


Fig. 17 Coilocitosis en Condiloma acuminado. (Hematoxilina-eosina, x400)*.

En CIN 1 o displasia leve (fig. 18) la maduración epitelial está presente en los dos tercios superiores del epitelio escamoso y la proliferación basaloide no rebasará el tercio inferior. El resto del epitelio que madura estará constituido por queratinocitos con coilocitosis. La atipia nuclear puede observarse en todo el grosor epitelial, pero es leve. La actividad mitótica es escasa y limitada al tercio basal, observándose de forma muy ocasional figuras de mitosis atípicas.

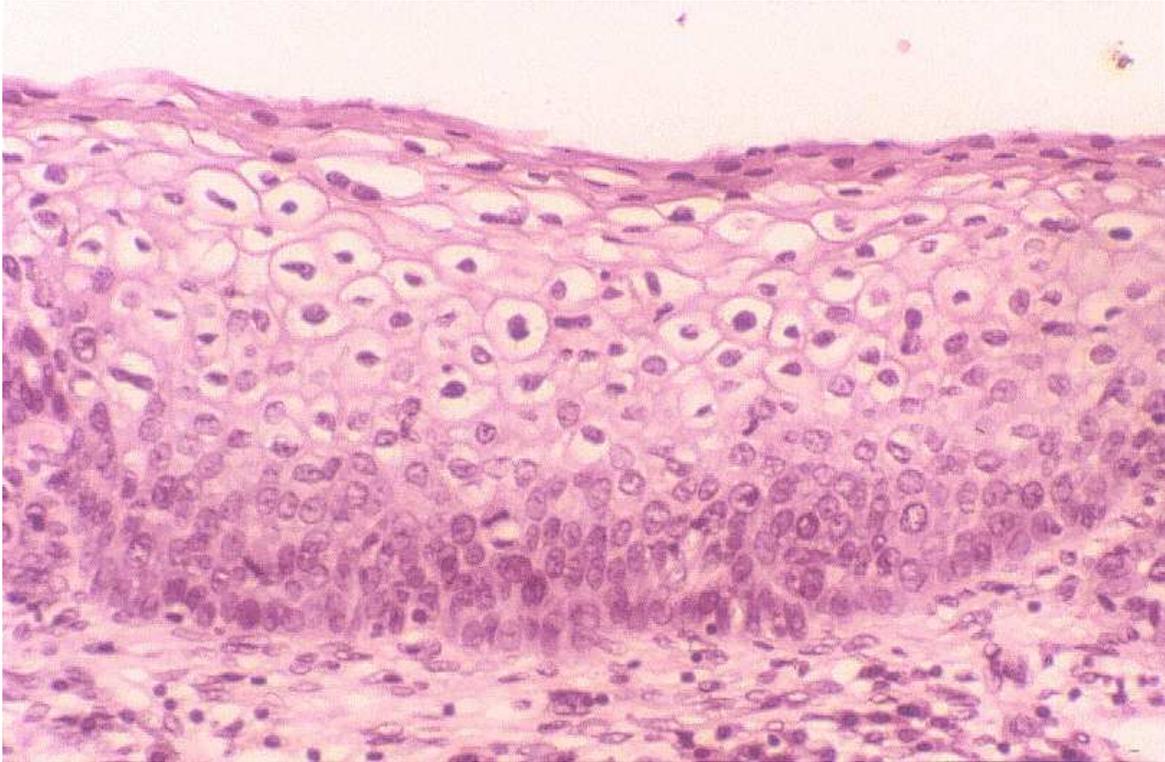


Fig. 18 CIN 1, caracterizado por presentar proliferación basaloide en el 1/3 inferior del epitelio y coilocitosis en capas superficiales. (Hematoxilina-eosina, x400)*.

En el CIN 2 o displasia moderada (fig. 19), la maduración epitelial está limitada a la mitad superior del epitelio, la atipia nuclear es marcada en todo el grosor epitelial. La proliferación basaloides alcanzará por tanto la mitad del grosor y la actividad mitótica afectará los dos tercios inferiores del epitelio, identificándose figuras mitóticas atípicas frecuentes. Se observará coilocitosis en aproximadamente la mitad superficial epitelial.

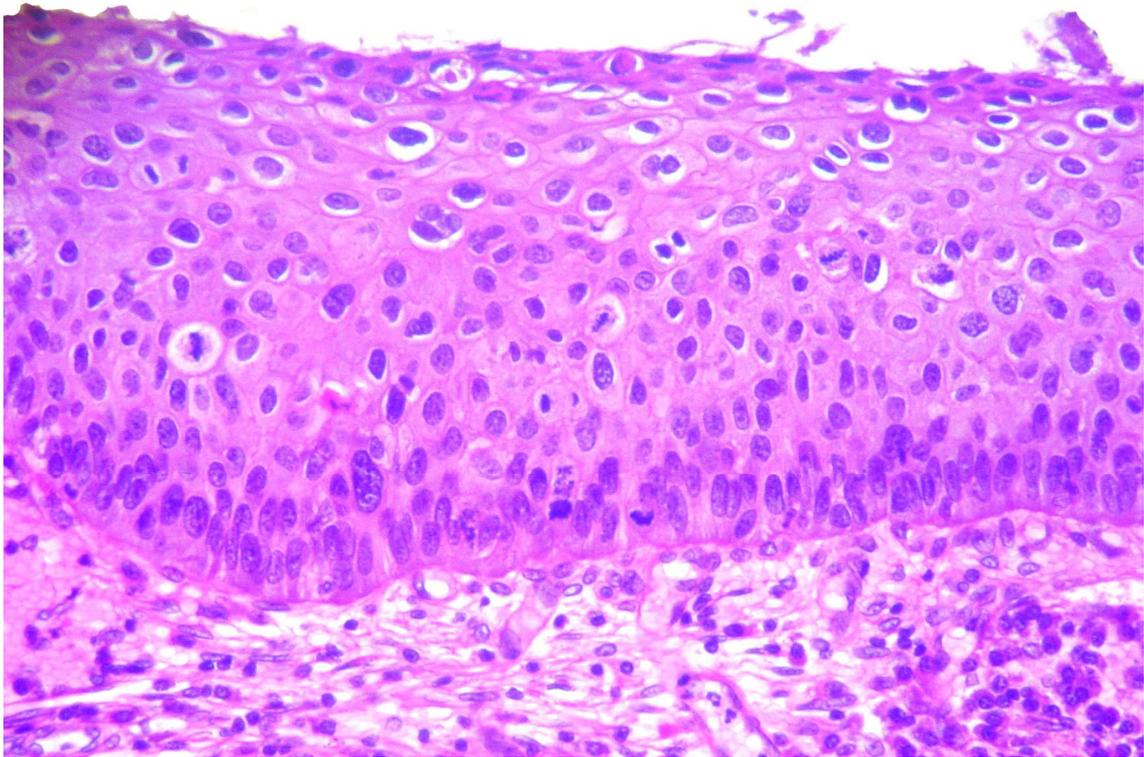


Fig. 19 CIN 2 en el que se observa proliferación de células basaloides que ocupan aproximadamente la mitad del grosor epitelial y el resto presenta atipia coilocítica. (Hematoxilina-eosina, x400)*.

En el CIN 3 o displasia severa (fig. 20), la maduración del epitelio será inexistente o limitada a la porción más superficial del epitelio, por tanto la proliferación de células basaloides ocupará prácticamente todo el grosor epitelial. La atipia nuclear será marcada en todo el epitelio y la actividad mitótica se observa en cualquier nivel con formas atípicas frecuentes. Los fenómenos de coilocitosis son prácticamente inexistentes.

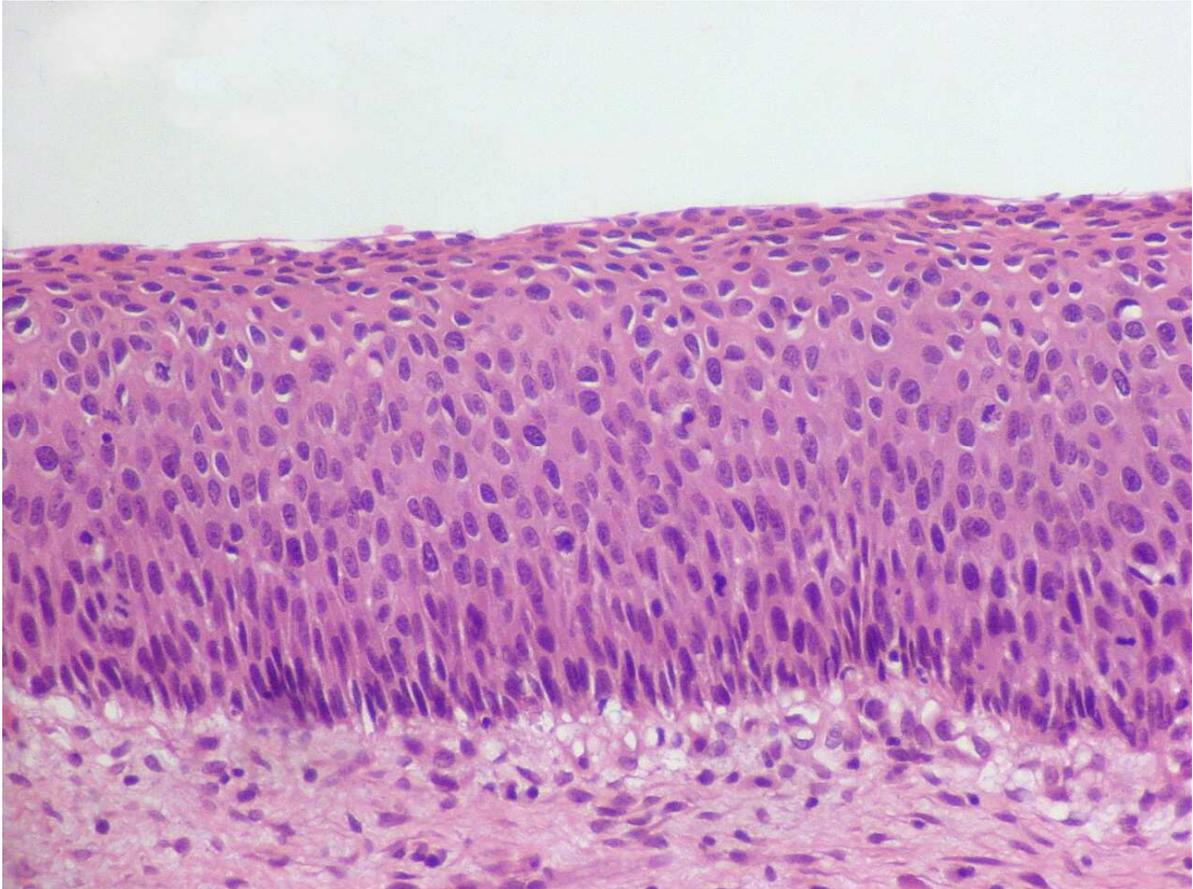


Fig. 20 CIN 3 en el que se observa la gran proliferación de células basaloides que ocupan casi el grosor completo del epitelio. (Hematoxilina-eosina, x400)*.

El carcinoma escamoso microinvasivo se define como un carcinoma escamoso con una infiltración estromal del tejido conjuntivo subepitelial inferior a los 5 mm. El carcinoma escamoso invasivo (fig. 21). es aquel que presenta una infiltración estromal superior a los 5 mm. o bien la extensión longitudinal del carcinoma es superior a 7 mm.

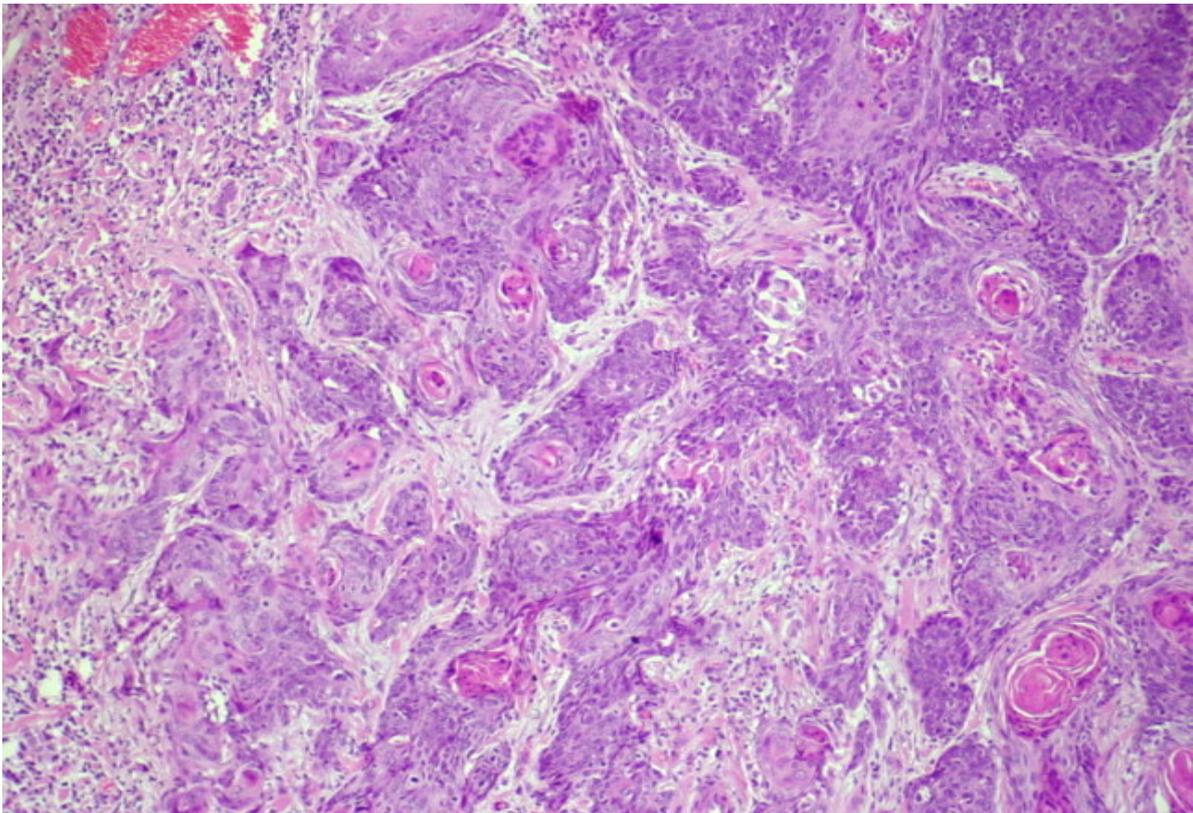


Fig. 21 Carcinoma escamoso cervical en donde observamos nidos invasivos de epitelio escamoso queratinizante en el tejido conjuntivo subepitelial del cérvix. (Hematoxilina-eosina, x200)*.

La detección del VPH en el epitelio escamoso infectado puede ponerse de manifiesto de diferentes métodos. El método más sensible y específico es mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa.

Otro método empleado aunque menos sensible, es la hibridación in situ, que nos permite determinar visualmente la presencia del VPH en la célula infectada ya que se realiza sobre cortes histológicos de las lesiones. La señal positiva se traduce en tres patrones de tinción nuclear:

1) Tinción nuclear homogénea o episomal (figs. 21 y 22), cuando el ADN viral se encuentra se encuentra en forma episomal: libre y circular. Representa alta carga viral y en general asociado a tipos de bajo riesgo, por lo que suele asociarse a SIL de bajo grado, pero también lo observamos en SIL de alto grado.

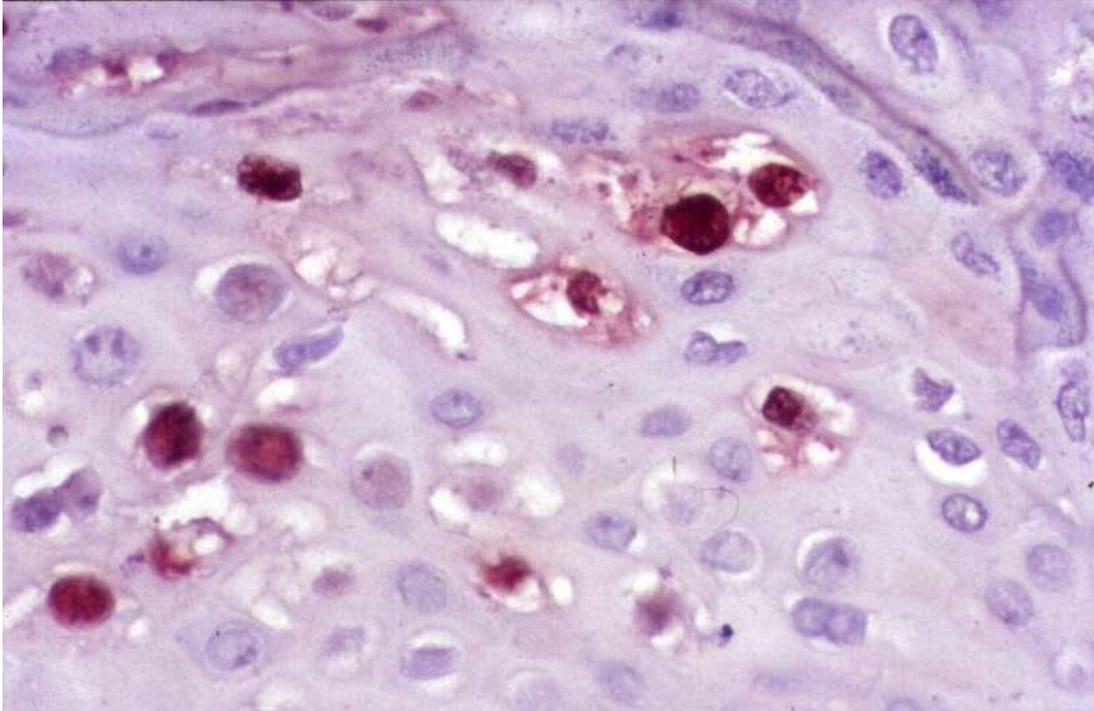


Fig. 21 Hibridación in situ. VPH 6/11 positivo en Condiloma Acuminado. Patrón episomal. (x800)*.

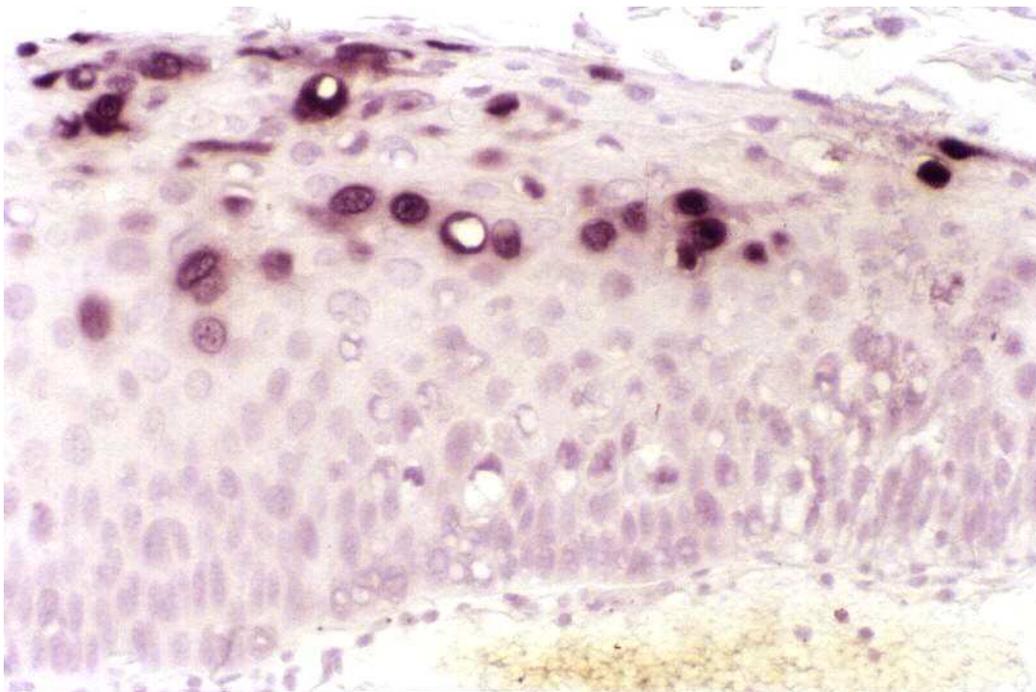


Fig. 22 Hibridación in situ. VPH 16/18 positivo en CIN 2. Patrón episomal. (x600)*.

2) Tinción nuclear puntiforme o integrada (fig. 23), cuando el ADN viral se encuentra integrado en el genoma de las células. Solemos observarlo en carcinoma.

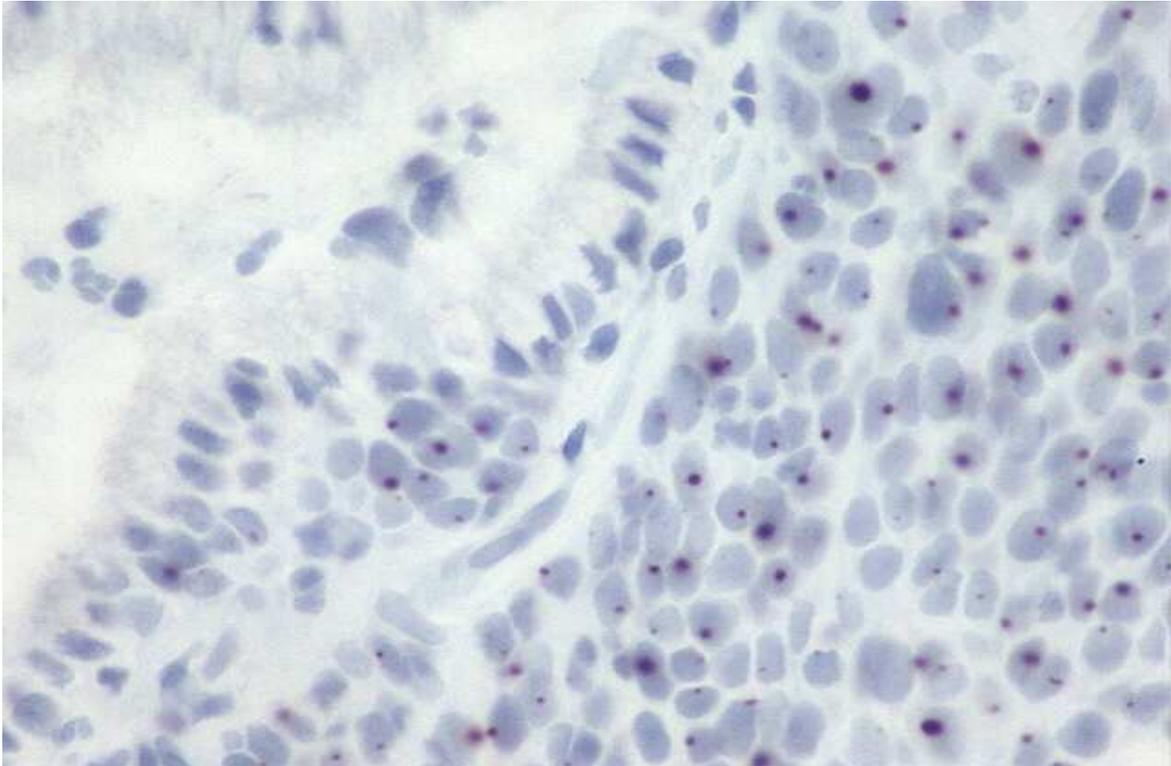


Fig. 23 Hibridación in situ. VPH 16/18 positivo en Carcinoma Escamoso infiltrante cervical. Patrón integrado. (x600)*.

3) Patrón mixto (fig. 24). Patrón nuclear homogéneo en capas superficiales y patrón puntiforme en capas intermedia o/y basal. Suele verse en infecciones por VPH 16.

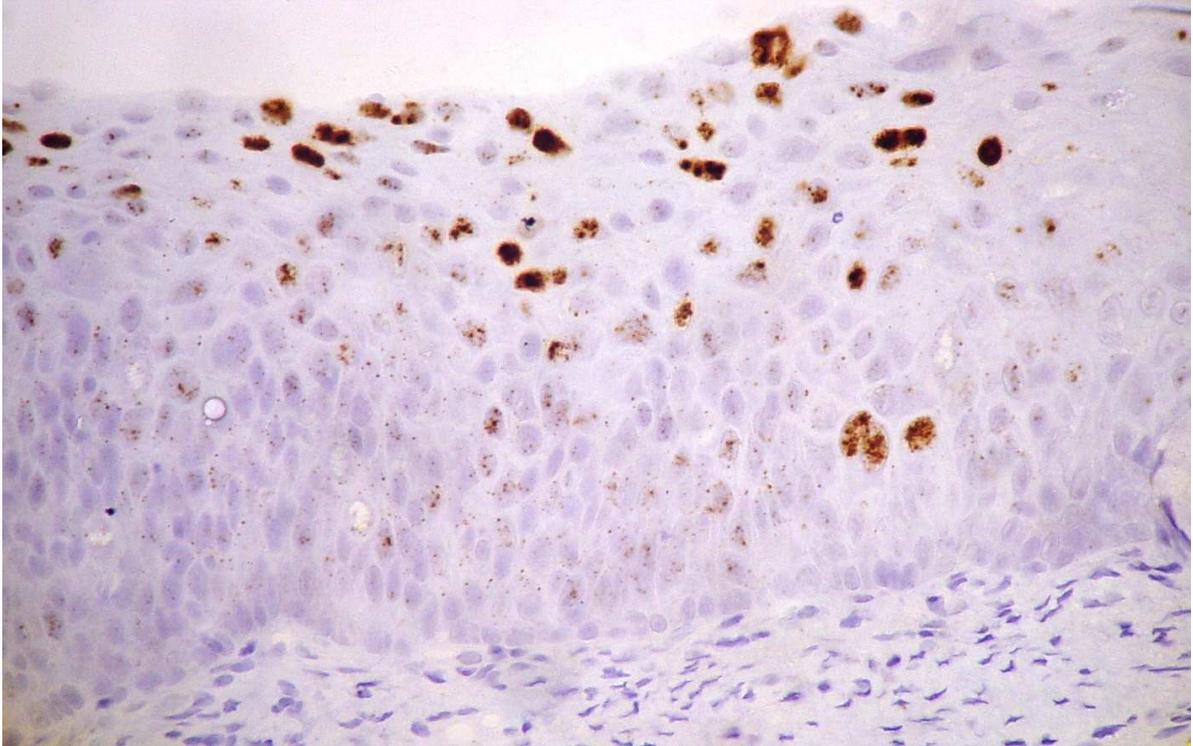


Fig. 24 Hibridación in situ. VPH 16/18 positivo en CIN 3. Patrón mixto. (x600)*.

1.10 Tratamiento de CIN 2 y 3

El tratamiento consensuado en las diferentes Sociedades Científicas (12;12;36;37) para los CIN de alto grado es similar, recomendando la exéresis quirúrgica de la lesión mediante asa diatérmica (fig. 25) con exéresis simple de la zona de transformación o una doble exéresis cónica, que incluya exocérvis y endocérvis o la conización clásica mediante bisturí.

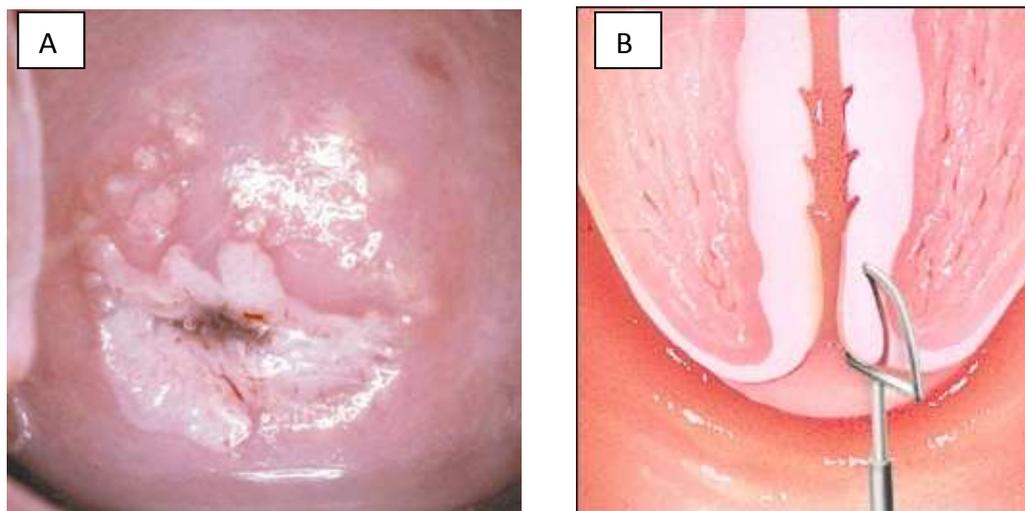


Fig. 25 Procedimiento de exéresis de la zona de transformación cervical mediante asa diatérmica. A) Identificación de la zona lesional mediante ácido acético (www.aafp.org/afp). B) Extirpación mediante asa diatérmica (www.mounnittany.org).

1.11 Perspectivas futuras del estudio del VPH

La introducción progresiva de las vacunas contra VPH 16/18 (14;15;38-42) provocará una importante disminución de lesiones precancerosas y cáncer invasivo de aproximadamente un 70% , pero sus efectos no se esperan hasta dentro de 20 o 30 años(43). Por este motivo y porque las vacunas aún no incluyen los otros VPH carcinogénicos será necesario el mantenimiento del cribado poblacional mediante estudios citológicos periódicos y tests de DNA del VPH (7;44). Numerosos estudios han demostrado la mayor sensibilidad de los tests de DNA en frente de la citología, pero con una menor especificidad (45;46). Dado que actualmente lo que se trata son lesiones epiteliales y no simplemente el

hecho de estar infectado por VPH, tanto las técnicas citológicas como los tests de DNA de VPH deberán ser empleadas en el cribado poblacional, como está actualmente aprobado por las diferentes sociedades científicas y estados (7;11;13;47;48), pero en un futuro bastante próximo es muy posible que el estudio poblacional sea realizado inicialmente mediante test de DNA del VPH y posteriormente se realice estudio citológico en las mujeres con test positivo (44;44;49;50).

1.12 Justificación y estructura del trabajo

Desde que la clasificación citológica de las lesiones preneoplásicas en cérvix se realiza en dos grados basándose en las recomendaciones de Bethesda (8) y que CIN 2 y CIN 3 se tratan de forma similar, existe una corriente favorable entre algunos patólogos a clasificar también desde un punto de vista histológico CIN 1 como Lesión Intraepitelial escamosa de bajo grado y agrupar CIN 2 y CIN 3 como una sola entidad bajo la denominación de Lesión Intraepitelial escamosa de alto grado, de forma similar a la que se emplea en los estudios citológicos, argumentando que el tratamiento es similar y que se alcanzaría mayor reproducibilidad de diagnóstico entre patólogos al clasificar dichas lesiones, ya que se ha demostrado que el diagnóstico de CIN 2 es poco reproducible entre los patólogos (51;52).

Intentaremos demostrar que CIN 2 y CIN 3 son dos lesiones diferentes desde un punto de vista morfológico analizando el área, profundidad, afectación glandular, actividad mitótica y vascularización de CIN 2 y CIN 3 en las piezas de resección quirúrgica obtenidas como tratamiento de dichas lesiones en el Hospital General de Catalunya, durante el periodo 1991-2008. También intentaremos aprovechar los resultados obtenidos de las técnicas de tipificación de VPH mediante Hibridación In Situ que se realizaron en nuestro hospital durante el periodo 1998-2003 en una parte de los casos de nuestro estudio para determinar si existen diferencias en cuanto a la etiología por parte del VPH implicado en CIN2 y 3. Hasta el momento la tipificación del VPH en CIN no está indicada como método de estudio rutinario y únicamente se realiza con finalidad académica. En los grandes centros hospitalarios la tipificación del VPH se realiza mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa por ser un método mucho más sensible

que la Hibridación in Situ, pero en centros hospitalarios de menor volumen se han estado realizando entre otras técnicas de tipificación del VPH la Hibridación In Situ por ser una metodología al alcance de cualquier Servicio de Anatomía Patológica. Ha sido en el contexto de centro hospitalario de tamaño intermedio que realizamos durante unos cinco años en nuestro servicio la tipificación del VPH con fines académicos mediante Hibridación In Situ.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

2.1 HIPÓTESIS Intentaremos demostrar que la Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 3 es diferente que el CIN 2 en cuanto a:

1. Edad de las pacientes
2. Superficie afectada por la lesión en el cérvix
3. Longitud máxima de la lesión
4. Afectación intraglandular
5. Profundidad máxima de la lesión
6. Índice mitótico
7. Formación de papilas vasculares
8. Tipo de VPH presente en la lesión

Hipótesis nulas y alternativas:

1. La edad de las pacientes con CIN 2 o CIN 3 son similares
2. Las superficies afectadas por CIN 2 o CIN 3 son similares
3. La longitud máxima alcanzada por CIN 2 o CIN 3 no son diferentes
4. No existen diferencias entre la afectación intraglandular por CIN 2 o CIN 3
5. La profundidad máxima alcanzada por CIN 2 y CIN 3 son similares
6. El índice mitótico en CIN 3 es similar al de CIN 2
7. La formación de papilas vasculares en CIN 2 y CIN 3 es similar
8. Los tipos de VPH son similares en CIN 2 y CIN 3

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS

3.1 Fundamentos del estudio

Desde que en las reuniones de Bethesda se introdujo la nueva terminología diagnóstica citológica de las lesiones preneoplásicas del cérvix en únicamente dos categorías LBG y LAG existe controversia entre los patólogos entre incorporar la terminología citológica a los estudios biópsicos o bien mantener en biopsias las tres categorías diagnósticas de CIN 1, 2 y 3.

Dado que el tratamiento es similar para CIN 2 y 3, es decir exéresis de la lesión, habitualmente mediante conización con asa electroquirúrgica, independientemente del tipo de VPH presente o del tamaño que ocupe la lesión, ha existido poco interés entre los patólogos en investigar diferencias morfológicas y etiológicas entre las dos entidades, que mejorasen la reproducibilidad de diagnósticos interobservadores. De esta forma las voces que defienden un sistema de diagnóstico similar para biopsias y citologías ven favorecidas sus tesis en el hecho que los diagnósticos son más reproducibles entre patólogos cuando trabajamos con un sistema de dos categorías que con uno de tres.

Entre los factores de riesgo que favorecerían la persistencia y la progresión a cáncer se consideran el tabaco, la inmunidad y el tamaño de la lesión precancerosa.

Existe poca literatura que estudie diferencias entre ambas categorías de lesiones de alto grado y por tanto creemos adecuado investigar algunos de los parámetros que pueden ayudar a mejorar la reproducibilidad diagnóstica y apoyar al mantenimiento de CIN en tres categorías.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivos:

Demostrar las diferencias morfométricas y de tipo de VPH existentes entre CIN 3 y CIN 2:

1. Demostrar que CIN 3 provoca lesiones de mayor superficie que CIN 2
2. Demostrar que CIN 3 causa lesiones más extensas longitudinalmente que CIN 2 en el canal cervical
3. Demostrar que CIN 3 afecta con más frecuencia las glándulas endocervicales que CIN 2
4. Demostrar que CIN 3 causa lesiones más profundas en las glándulas endocervicales que CIN 2
5. Demostrar que la actividad mitótica en CIN 3 es superior que la de CIN 2
6. Demostrar que CIN 3 provoca mayor proliferación vascular que CIN 2 en forma de papilas vasculares intraepiteliales
7. Demostrar que los serotipos del VPH presentes en CIN 3 son diferentes que los de CIN 2
8. Demostrar que la edad de las pacientes con CIN 3 es superior a las de CIN 2

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Ámbito de estudio

El Hospital General de Catalunya es un centro hospitalario privado ubicado en San Cugat del Vallés que ofrece atención médica integral a todos sus usuarios. Cuenta para ello con todas las especialidades médicas y quirúrgicas. Dispone de unas 300 camas para ingresos y se realizan en sus consultas externas más de 1000 visitas diarias.

Entre sus especialidades cuenta con un Servicio de Ginecología y Obstetricia que atiende al control periódico de las mujeres para la prevención del cáncer cervical. Las muestras citológicas y biópsicas generadas en dichos estudios son estudiadas por el Servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital.

5.2 Población Diana

Mujeres que fueron visitadas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia para cribado del cáncer cervical.

5.3 Población de estudio

Mujeres diagnosticadas por citología de ASC, ASC-H, LSIL o HSIL, que cumplieran los siguientes criterios de inclusión.

5.4 Criterios de inclusión

- Estudio biopsico posterior a la citología con diagnóstico de CIN 2 o 3
- Tratamiento mediante Conización con asa electroquirúrgica o histerectomía

5.5 Criterios de exclusión

- Mala orientación de la pieza
- Falta de datos macroscópicos
- Ausencia de CIN de alto grado en la pieza

- Falta de datos de filiación
- Mujeres no caucásicas
- Pacientes con inmunosupresión

5.6 Muestra

Durante el periodo 1991-2008 en el Hospital General de Catalunya fueron tratadas 188 pacientes con diagnóstico de CIN 2 o 3. De ellas estudiamos un grupo de 148 pacientes según criterios de inclusión y exclusión. Las pacientes fueron tratadas con conización cervical mediante Asa de escisión electroquirúrgica (LEEP, siglas inglesas de Loop Electrosurgical Excision Procedure), excepto cuatro que fueron sometidas a histerectomía. La conización se realizó como terapia de un diagnóstico previo por biopsia de CIN 2 o 3. Las piezas de histerectomía correspondieron a pacientes posmenopáusicas de más de 65 años con diagnóstico de CIN 3 que no desearon tratamiento conservador.

5.7 Metodología de trabajo

Las piezas de histerectomía y conización cervical fueron manejadas de la forma convencional para su estudio histopatológico. Se recibieron en fresco marcadas con una grapa a las 12 horas y tras ser seccionadas por dicho punto en sentido cráneo-caudal se fijaron extendidas sobre una superficie rígida durante 24 horas (fig. 26).

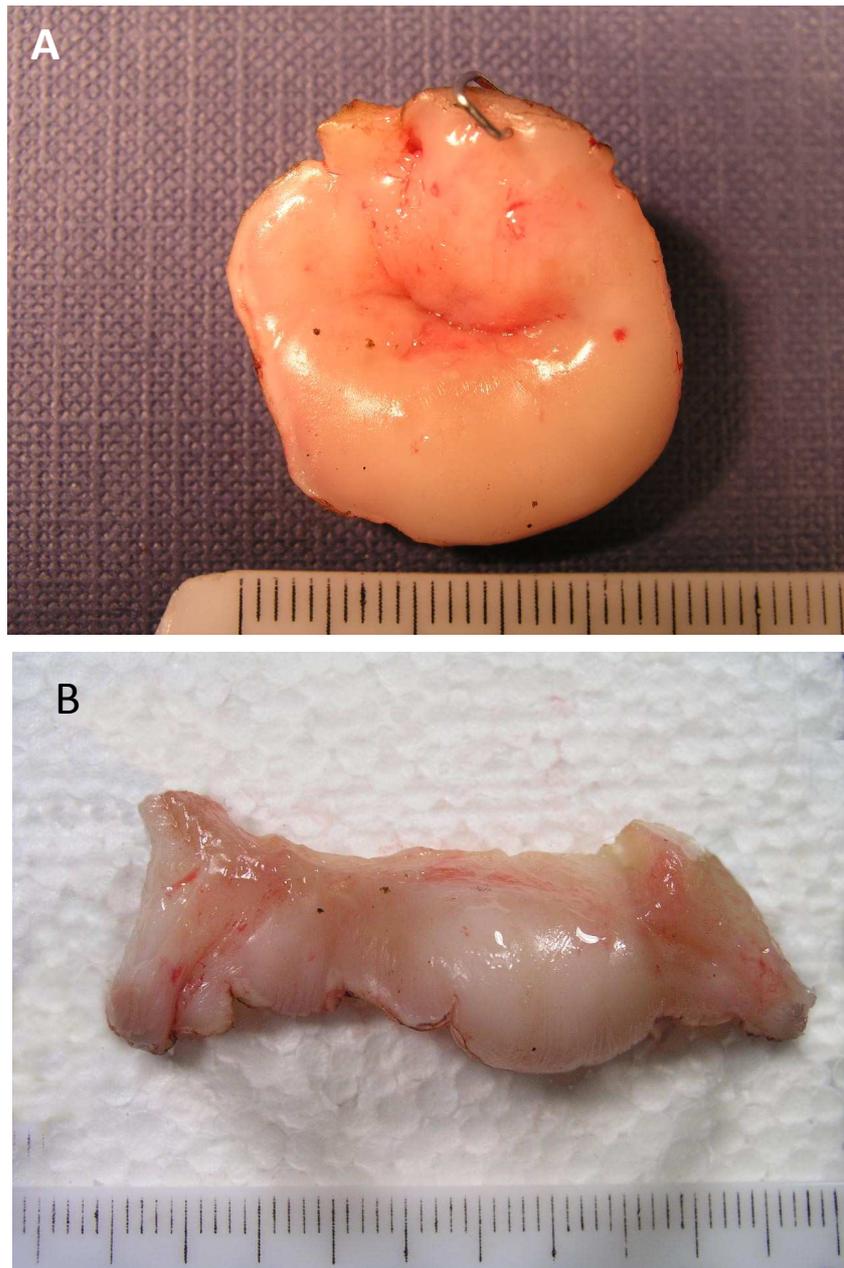


Fig. 26 **A.** Cono cervical en fresco señalado con una grapa a las 0 h. **B.** Pieza abierta tras su sección a las 0 h., lista para su fijación. Archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Catalunya.

Posteriormente fueron divididas en cuadrantes, comprendidos entre las 0 y 3 horas, entre las 3 y 6, entre las 6 y las 9 y finalmente entre las 9 y las 12 horas. Cada cuadrante fue seccionado en cortes convencionales de un grosor de 2 a 3 mm. (fig. 27), obteniéndose de 3 a 4 cortes de tejido por cada cuadrante en total de 12 a 16 cortes por cada cono.

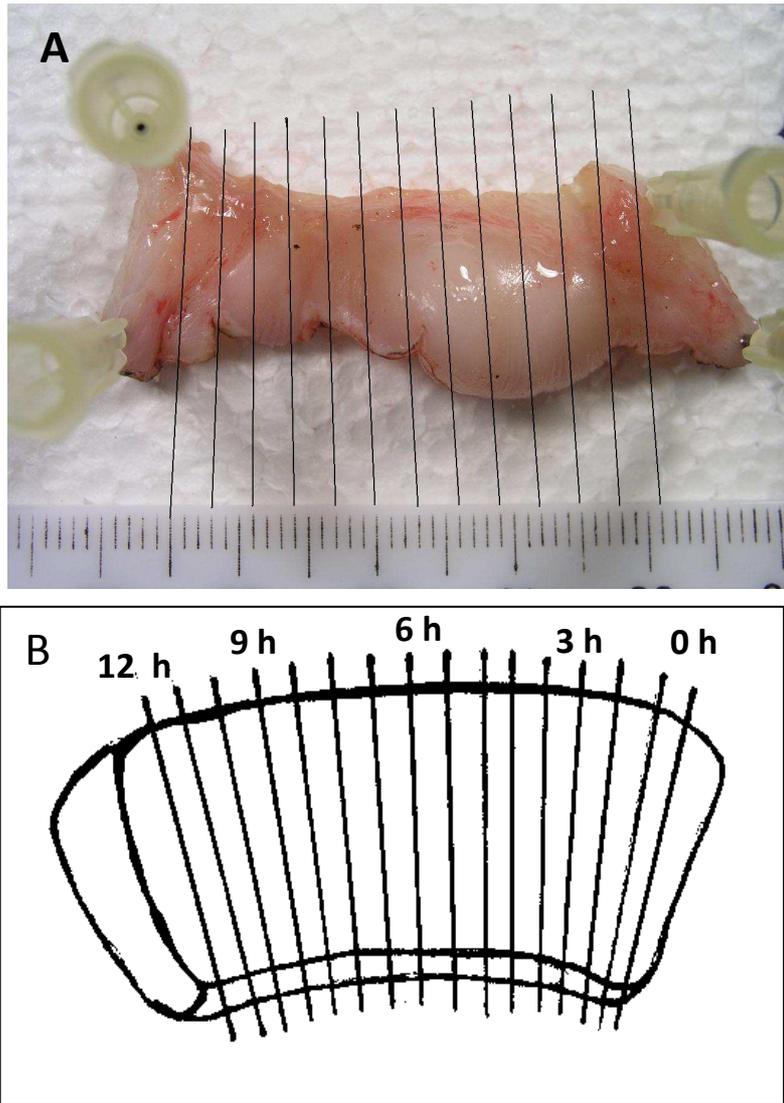


Fig. 27 Esquema de los cortes seriados realizados al cono (A) y su división en cuadrantes (B). Archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Catalunya.

El grosor promedio del corte en cada caso se obtuvo al dividir la longitud total de la pieza extendida por el número de cortes obtenidos.

Cada corte de tejido fue procesado y teñido con Hematoxilina y Eosina para su estudio histopatológico.

Los cortes de tejido examinados con el microscopio (fig. 28) mostraban una superficie recubierta por epitelio escamoso exocervical en uno de sus extremos y en el opuesto epitelio endocervical con invaginaciones glandulares, presentando en la zona central el área de CIN.

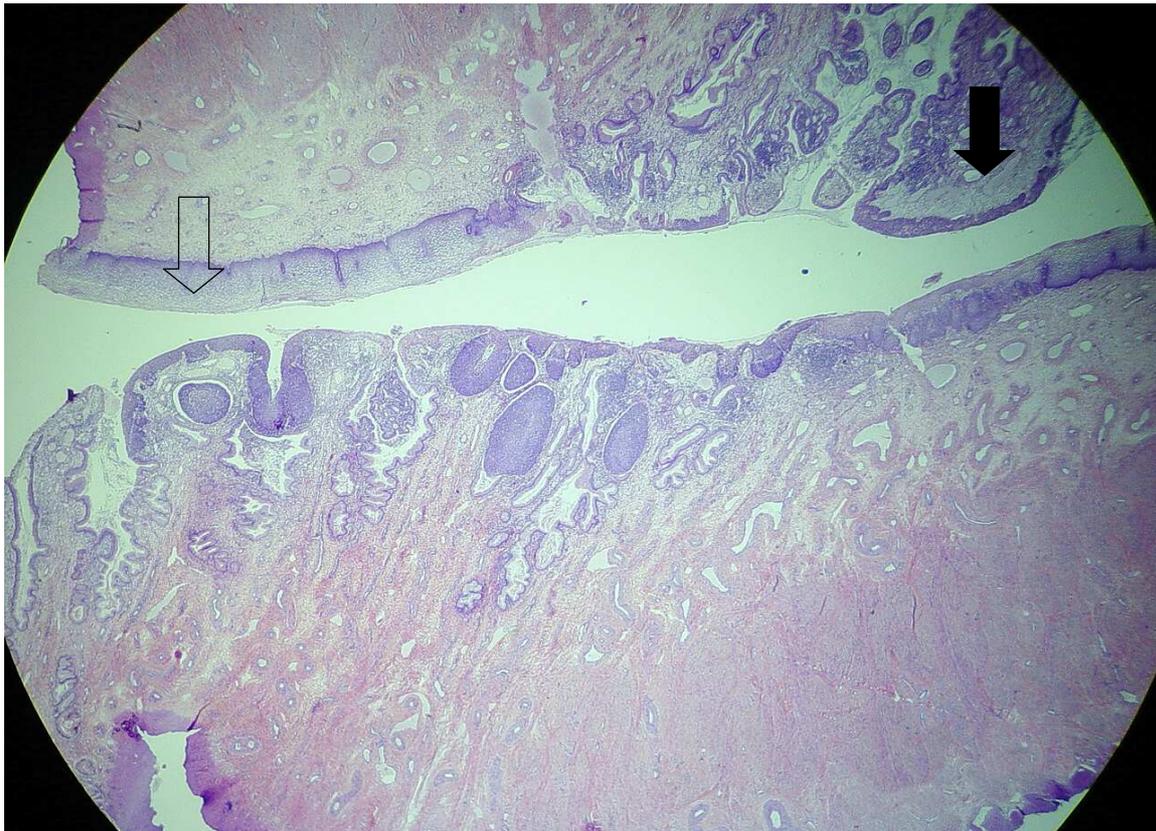


Fig. 28 Microfotografía a bajo aumento en donde podemos apreciar dos cortes de un cono. En uno de los extremos se reconoce epitelio escamoso exocervical (flecha negra) y en el opuesto epitelio endocervical (flecha vacía). (Hematoxilina-eosina x20)*.

La longitud de cada zona de corte histológico afectado por CIN se midió empleando un microscopio convencional (OLYMPUS BH2), equipado con un micrómetro en un ocular, mediante el cual determinaremos la longitud proximal-distal de CIN en cada corte afectado y la profundidad de la afectación glandular por CIN. La longitud de cada sección afectada multiplicada por el grosor del corte nos da el área afectada en cada corte, que posteriormente habrá de sumarse al resto de cortes con lesión de cada pieza de conización o histerectomía para dar el total de extensión afectada en mm².

Todas las microfotografías del trabajo han sido tomadas con una cámara digital Sony Cyber-shot DCSP-71 de 3.2 megapixels aplicada directamente sobre uno de los oculares del microscopio, aplicando en algunos casos zoom óptico hasta 3x de la cámara que aumentaba la imagen original del microscopio. Se identifican en el trabajo con un *.

La longitud máxima (LM) de cada lesión expresada en mm. será la distancia mayor (fig. 29) que alcance en sentido proximal-distal la lesión de CIN en cada pieza estudiada.

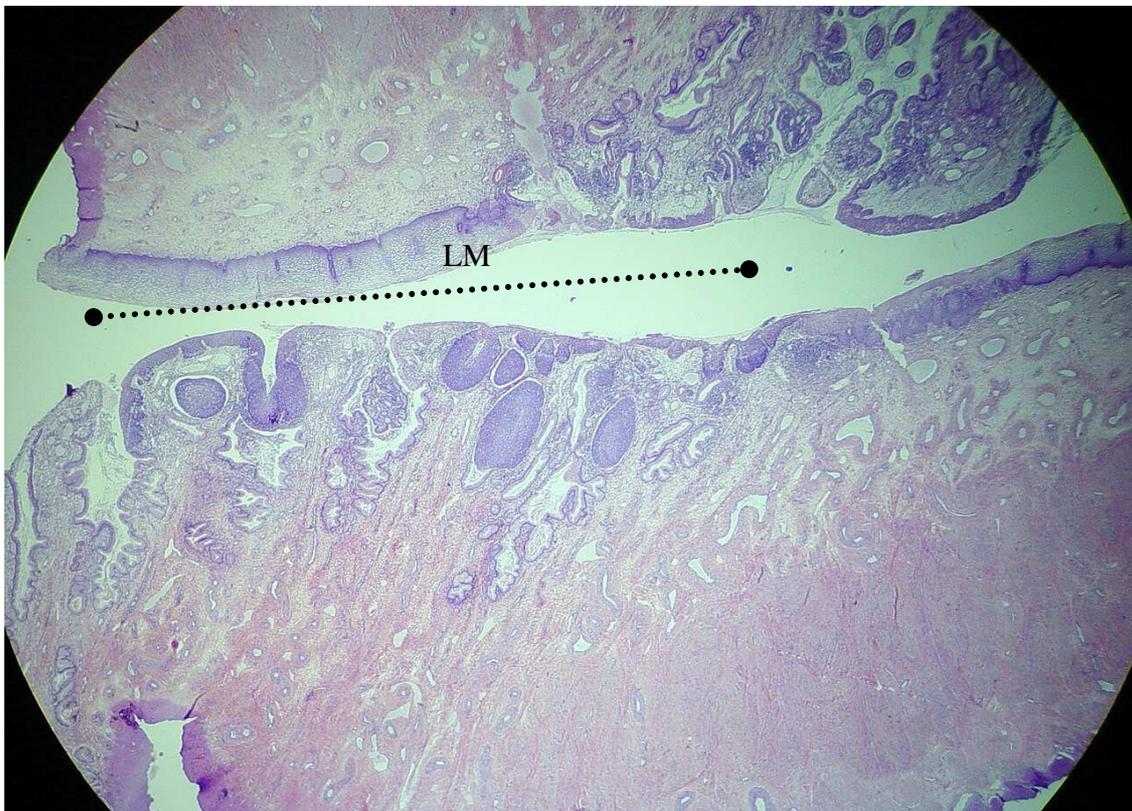


Fig. 29 Línea discontinua indicando la longitud máxima (LM) del CIN en un cono. (Hematoxilina-eosina x20)*.

La afectación glandular por CIN la definimos como la presencia de epitelio displásico escamoso en el interior de glándulas endocervicales. La profundidad máxima (PM) que alcance la afectación glandular será expresada en mm. y corresponderá a la distancia mayor (fig. 30) que alcance la lesión desde la capa basal del epitelio displásico hasta la zona más profunda que alcance el epitelio displásico escamoso en el interior de las glándulas endocervicales.

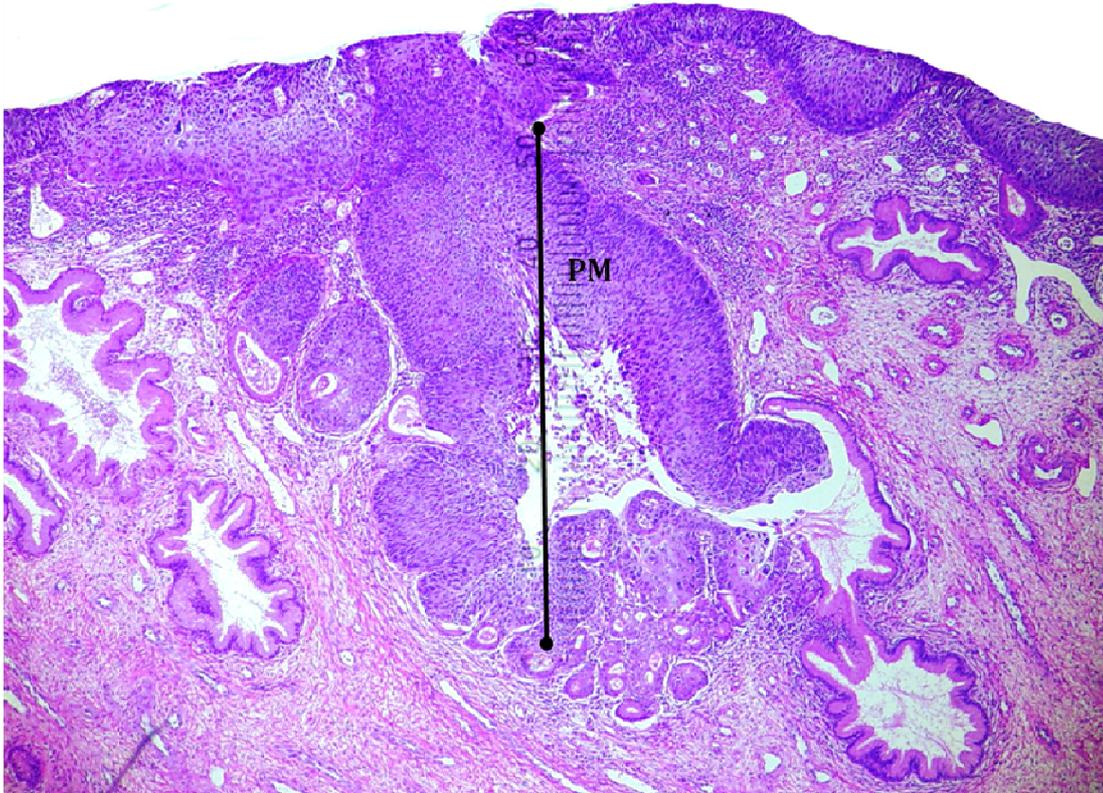


Fig. 30 Línea continua indicando la profundidad máxima (PM) en mm. de la afectación glandular por epitelio displásico. (Hematoxilina-eosina, x40)*.

El índice mitótico indicará el promedio de mitosis por mm. lineal de CIN sin contar las existentes en las extensiones del epitelio displásico en las glándulas endocervicales (figs.31 y 32).

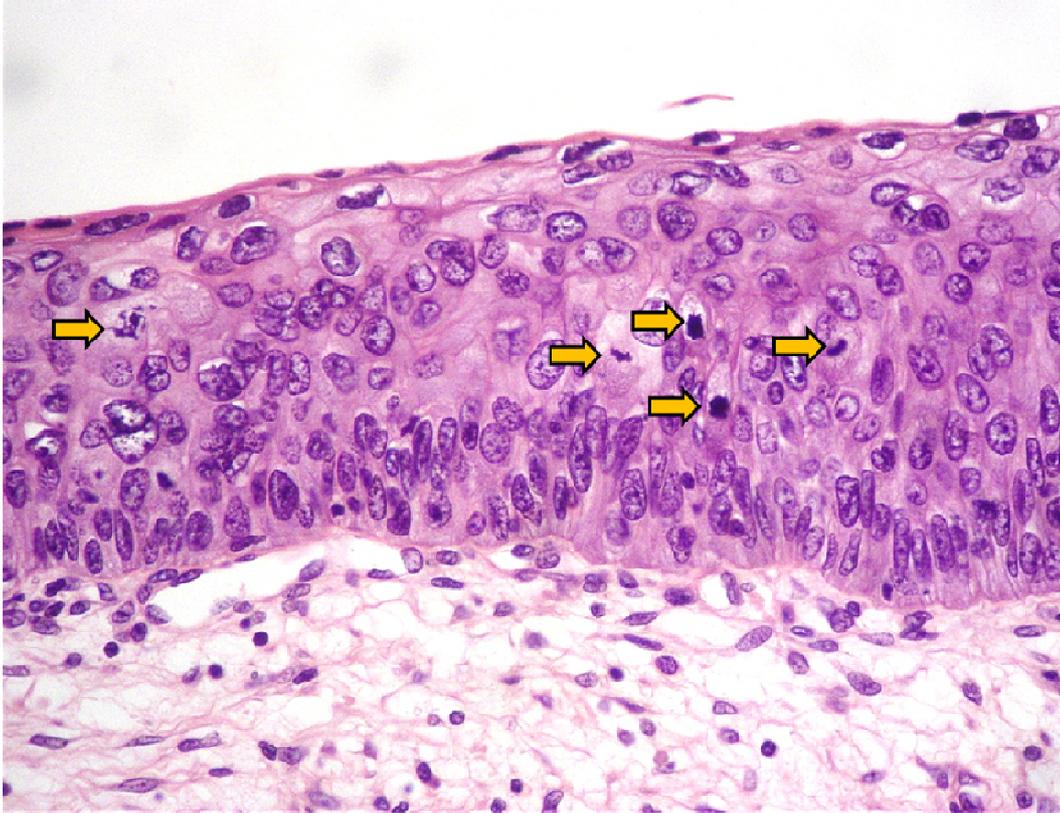


Fig. 31 Flechas indicando cinco mitosis en un fragmento de CIN 2. (Hematoxilina-eosina, x600)*.

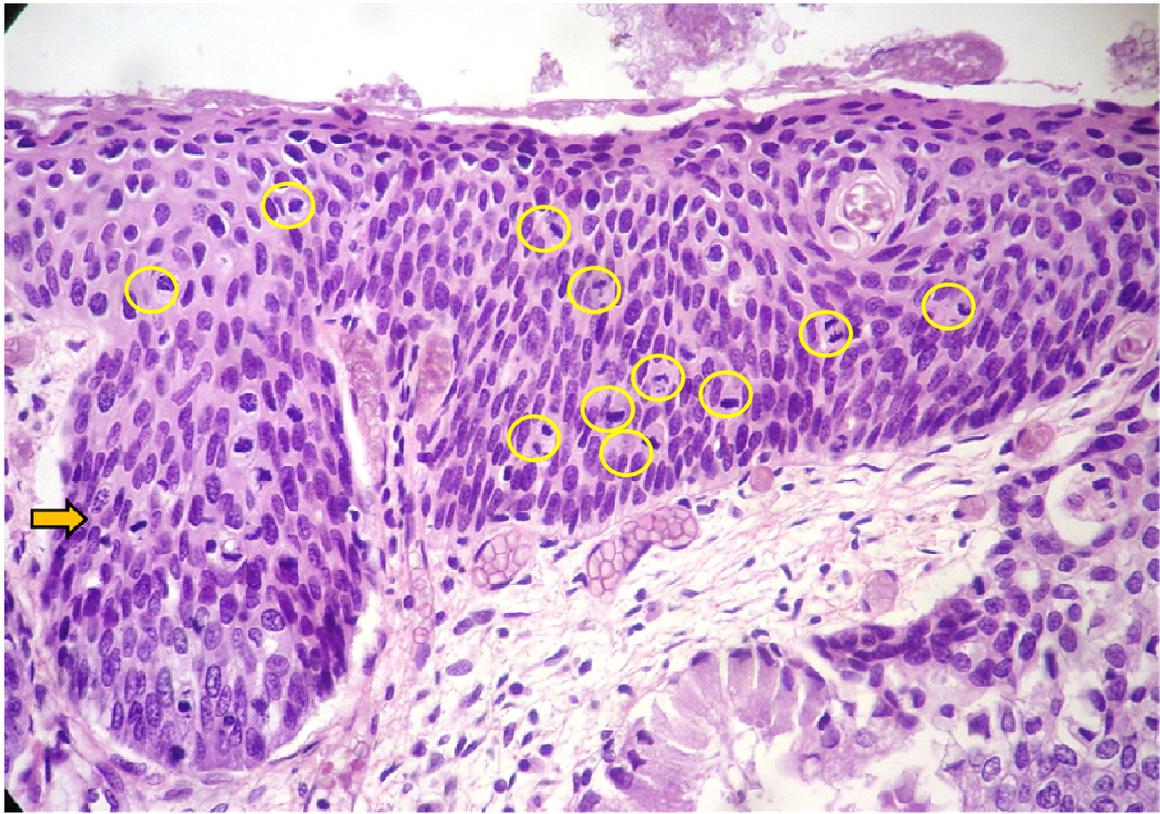


Fig. 32 Fragmento de CIN 3 con once mitosis (círculos amarillos). No se incluyen en el conteo las existentes en el epitelio displásico que afecta a una glándula (flecha). (Hematoxilina-eosina, x400)*.

La presencia de papilas vasculares en el epitelio displásico indica la existencia de invaginaciones vasculares o fibrovasculares en el epitelio displásico (Figs. 33 y 34).

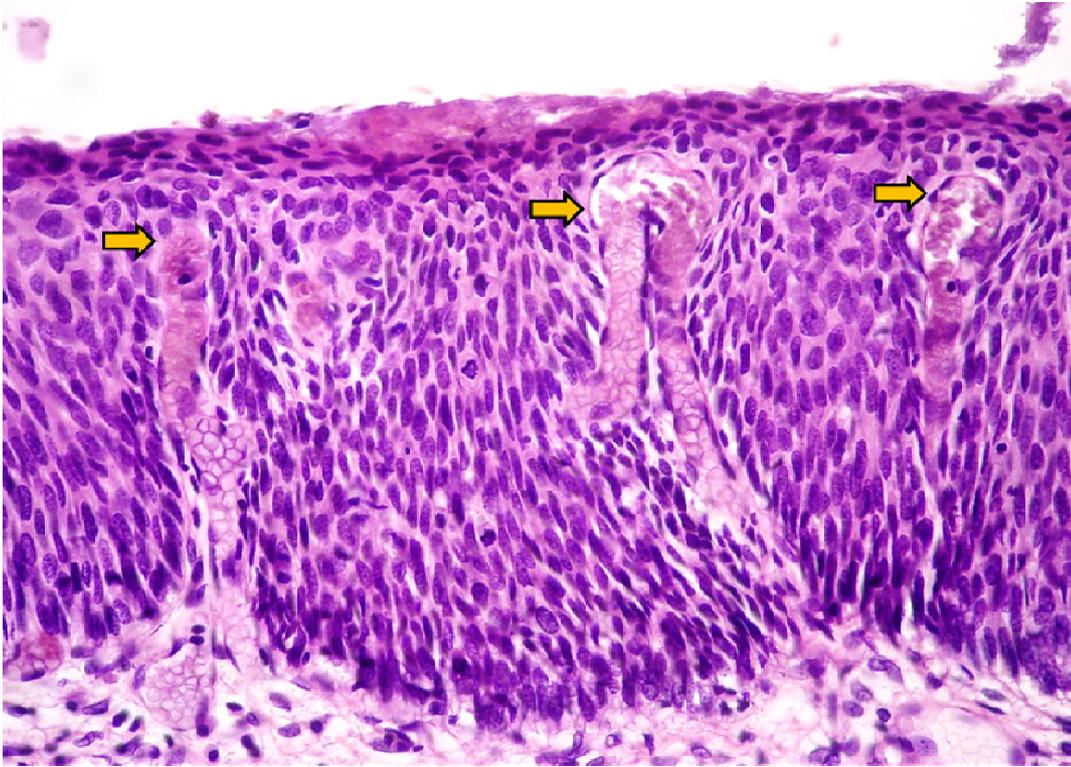


Fig. 33 Flechas indicando la presencia de papilas vasculares en CIN 3. (Hematoxilina-eosina, x400)*.

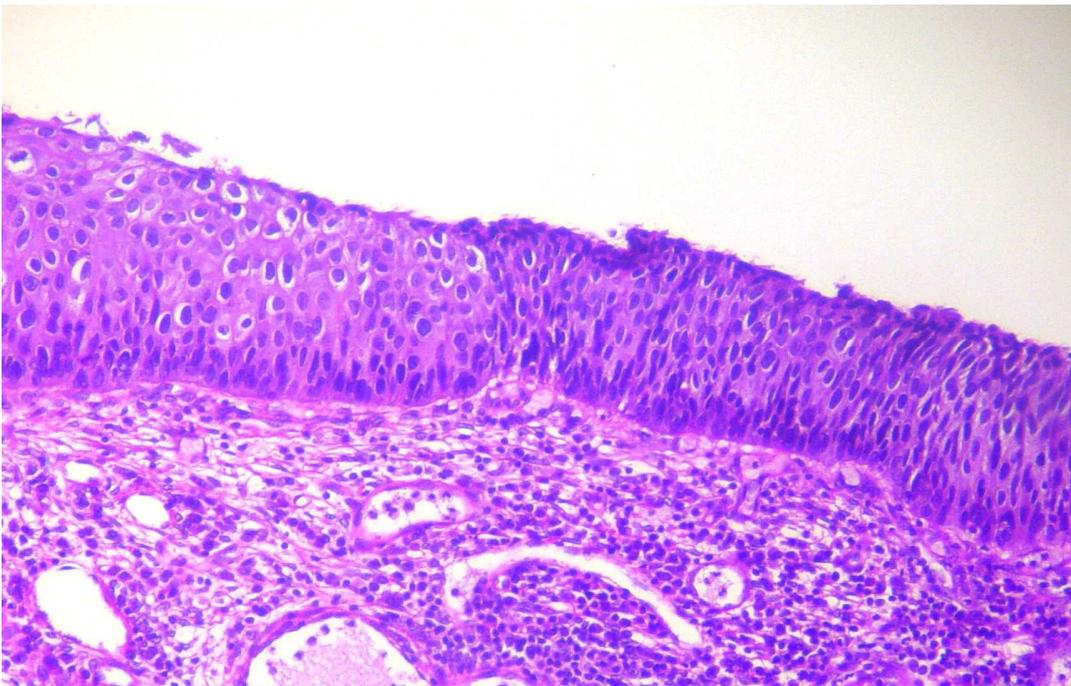


Fig. 34 Ausencia de papilas vasculares en CIN 3. (Hematoxilina-eosina, x200)*.

En adelante nos referiremos de forma genérica como piezas de conización a todos los casos incluyendo tanto las piezas quirúrgicas obtenidas mediante LEEP como las obtenidas de histerectomía, ya que el cérvix de dichas piezas quirúrgicas fue tratado metodológicamente de forma similar.

El estudio del tipo de VPH se realizó mediante dos equipos comerciales: panVPH DISH kit de Kreatech Biotechnology (del 1998 al 2000) y VPH-GenPoint™ de DAKO (del 2001 al 2003), diseñados para la detección de ADN de VPH en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, según protocolos aportados por los fabricantes, determinando los tipos de VPH: 6/11, 16/18 y 31/33 (Dako) o 31/33/51(Kreatech). La positividad de los casos se determinaba por la presencia de tinción positiva nuclear del epitelio displásico (Fig. 35).

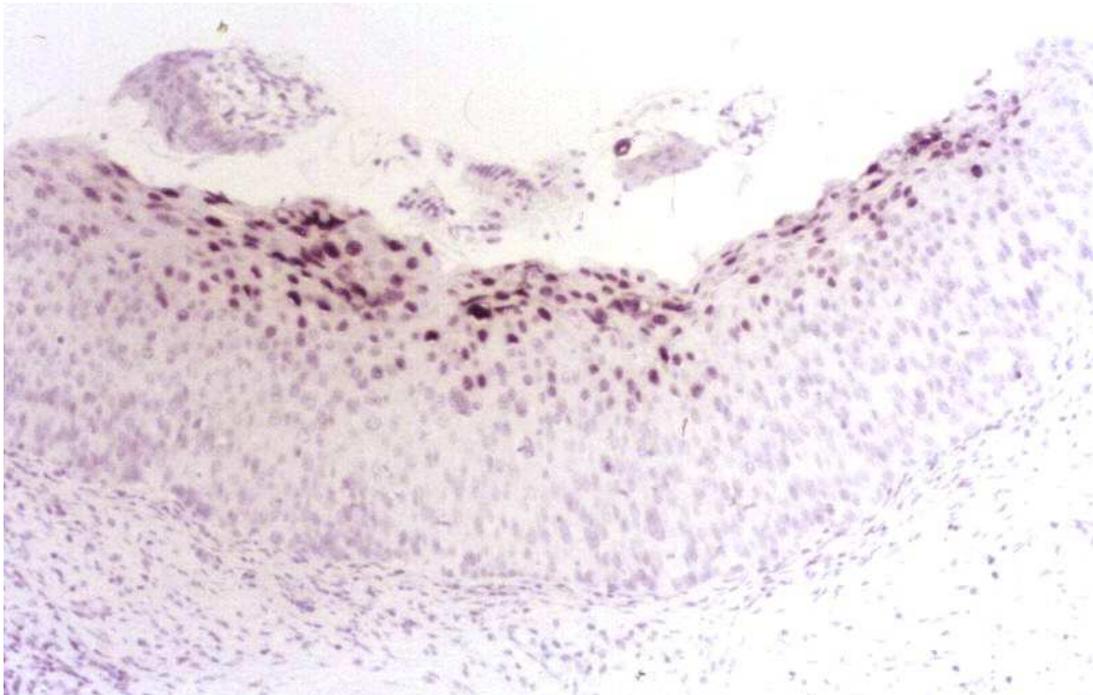


Fig. 35 Hibridación in situ. VPH 16/18 positivo en CIN 3. (x200)*.

5.8 Análisis estadístico:

Las variables a analizar en este trabajo se han procesado estadísticamente con el programa SPSS 17.0. El análisis de los datos realizado, es el de la estadística descriptiva de las variables, con una tabla de frecuencias para las cualitativas y el

cálculo de media y desviación típica para las cuantitativas. Para el contraste de las variables cuantitativas entre dos grupos de comparación se ha realizado el test T-student en el caso de cumplirse normalidad y una prueba U de Mann-Whitney en caso contrario y en el caso de tener más de dos grupos de comparación el contraste realizado ha sido una prueba ANOVA o un test de Kruskal-Wallis en función de si se cumplía o no normalidad respectivamente. Las pruebas de Normalidad se han realizado con un test de Shapiro-Wilk para los grupos de menos de cincuenta individuos y con un test de Kolmogorov-Smirnov para los de más de cincuenta. Por último, para la comparación de dos variables cualitativas se ha procedido a un contraste de proporciones con un test χ^2 de Pearson. Todos los test de hipótesis se han realizado con un nivel de significación $\alpha=0.05$.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Resultados

Las 148 pacientes del estudio presentaban una edad media de 37.85 años (21-77) con una desviación típica de 10.76. La distribución por edades podemos observarla en la fig. 33. y tabla 2 con un predominio de pacientes en el grupo de edad comprendido entre los 30 y 40 años que corresponde a 78 sujetos (52.7%).

Tabla 2 Edades agrupadas de las pacientes del estudio

EDAD (agrupada)	Frecuencia	%
20-29	27	18,2%
30-39	78	52,7%
40-49	20	13,5%
50-59	14	9,5%
60-69	7	4,7%
>70	2	1,4%
Total	148	100,0

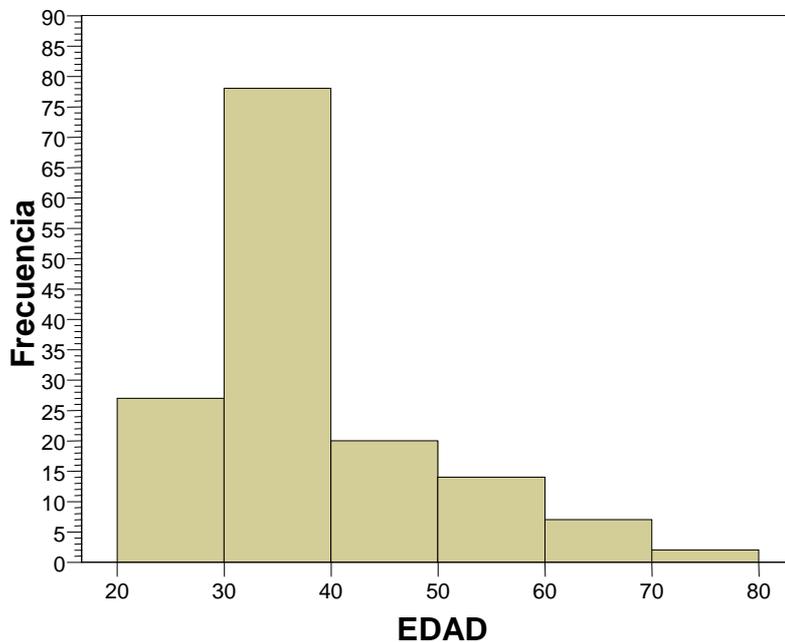


Fig. 36. Distribución de la edad de los pacientes

Los diagnósticos histológicos de las 148 piezas de conización cervical fueron:

- CIN 2 : 66 casos (44.6 %) con una edad media de 35.9 +/- 9.63 años (21-66)
- CIN 3 : 82 casos (55,4 %) con una edad media de 39.4 +/- 11.4 años (22-77)

Tanto en CIN 2 como en CIN 3 el grupo mayor de pacientes estaba comprendido entre los 30-39 años, en concreto 57.6 y 48.8 % respectivamente. En ninguno de los grupos de edad se observa diferencias en cuanto a incidencia de los dos tipos de CIN, tal como podemos observar en la tabla 3 y en la fig. 37.

Tabla 3 Edades de las pacientes de CIN 2 y CIN 3

EDAD (agrupada)	CONO DIAGNOSTICO	
	CIN 2	CIN 3
20-29	14 21.2%	13 15.9%
30-39	38 57.6%	40 48.8%
40-49	7 10.6%	13 15.9%
50-59	5 7.6%	9 11.0%
60-69	2 3.0%	5 6.1%
>70	0 0,0%	2 2.4%
Total	66 100%	82 100%

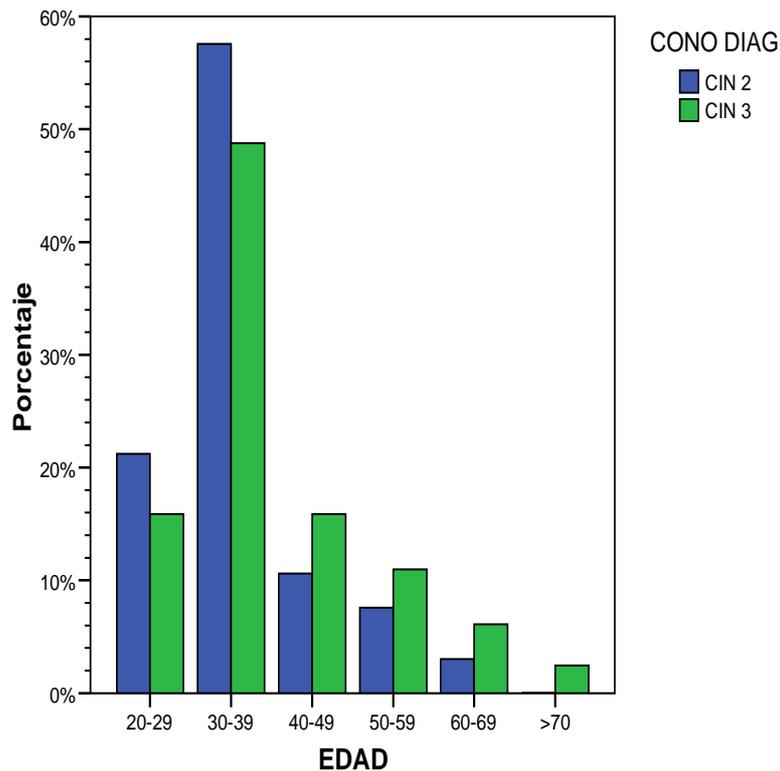


Fig. 37 Distribución por edades y tipo CIN

La aplicación de una prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes da una p-valor de $0.059 > 0.05$ que indica que no existen diferencias significativas entre la edad media de las pacientes con diagnóstico CIN 2 y CIN3. (Se usa una prueba no paramétrica debido al no cumplimiento de Normalidad de la variable Edad ni en el Grupo de CIN 2 ni en CIN3)

Respeto al área media del cérvix afectada por CIN en los conos fue de 52.07 mm^2 (1.75-383.25) y una desviación típica de 57.64. Cabe observar que hay dos individuos con valores extremos, con un área afectada de 259 y $383,25 \text{ mm}^2$, si se excluyen estos individuos de la muestra, la media fue de 48.39 (1.75-209.10) y una desviación típica de 48.02, expresados gráficamente en la fig. 38.

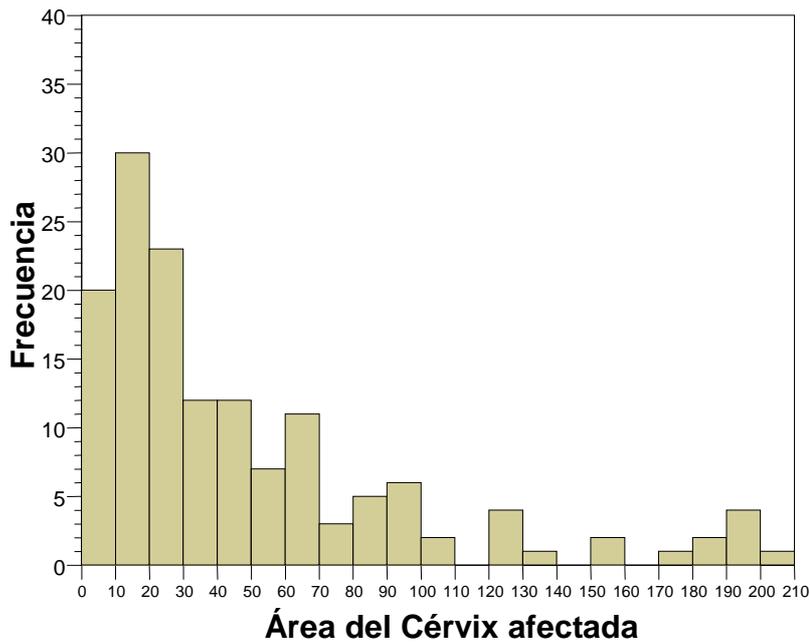


Fig. 38 Distribución del área del Cérnix afectada por CIN

Los resultados de las mediciones de la extensión de CIN 2 y CIN 3 se expresan en la tabla 4. El área media obtenida para los casos de CIN 2 fue de 26.55 mm^2 (1.75-121.75) con una desviación típica de 24.30 y para CIN 3 de 72.61 mm^2 (3.30-383.25) siendo su desviación típica de 67.81. El caso de mayor extensión ($383,25 \text{ mm}^2$) correspondió a un CIN 3 en una pieza de histerectomía con afectación completa de toda la circunferencia cervical y una longitud máxima de la lesión en sentido proximal-distal de 21 mm.

Tabla 4 Áreas totales de CIN en las 148 piezas quirúrgicas

Área afectada en mm ²	CONO DIAGNOSTICO	
	CIN 2	CIN 3
0 – 10	14 (21.2%)	8 (9.8%)
>10 – 20	21 (31.8%)	7 (8.5%)
>20 – 30	12 (18.2%)	11 (13.4%)
>30 – 40	5 (7.6%)	7 (8.5%)
>40 – 50	5 (7.6%)	7 (8.5%)
>50 – 60	3 (4.5%)	4 (4.9%)
>60 – 70	2 (3%)	9 (11%)
>70 – 80	1 (1.5%)	2 (2.4%)
>80 – 90	0	6 (7.3%)
>90 – 100	1 (1.5%)	4 (4.9%)
>100	2 (3%)	17 (20.7%)
Total	66 100%	82 100%

Aproximadamente un 71% de casos de CIN 2 tienen menos de 30 mm², mientras que en CIN 3 ocurre lo contrario, que un 69% de casos tienen más de 30 mm². La distribución en forma de gráfico se representa en la fig. 39. La aplicación de la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes da un p-valor de 0.000<0.05 que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre el área del cérvix afectada en aquellos pacientes con CIN 2 y pacientes con CIN3, siendo en estos últimos mucho mayor, con una diferencia media de 46 mm².

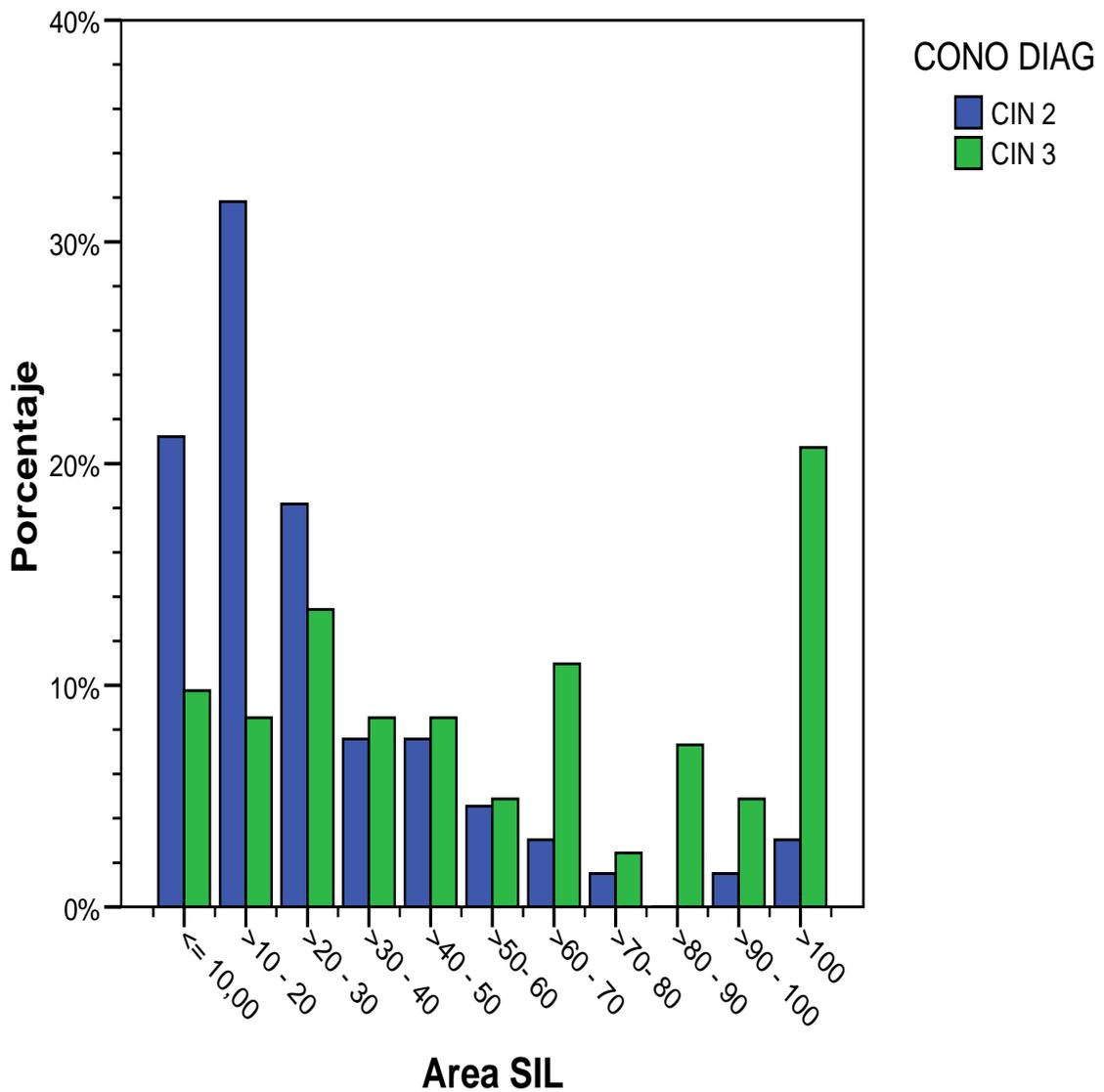


Fig. 39 Distribución del área del Cérnix afectada según CIN

La media de la longitud máxima en sentido proximal-distal afectada por CIN fue de 5.20 mm (0.5-21) lineales con una desviación típica de 3.59. Los datos se expresan en forma de gráfico en la fig. 40.

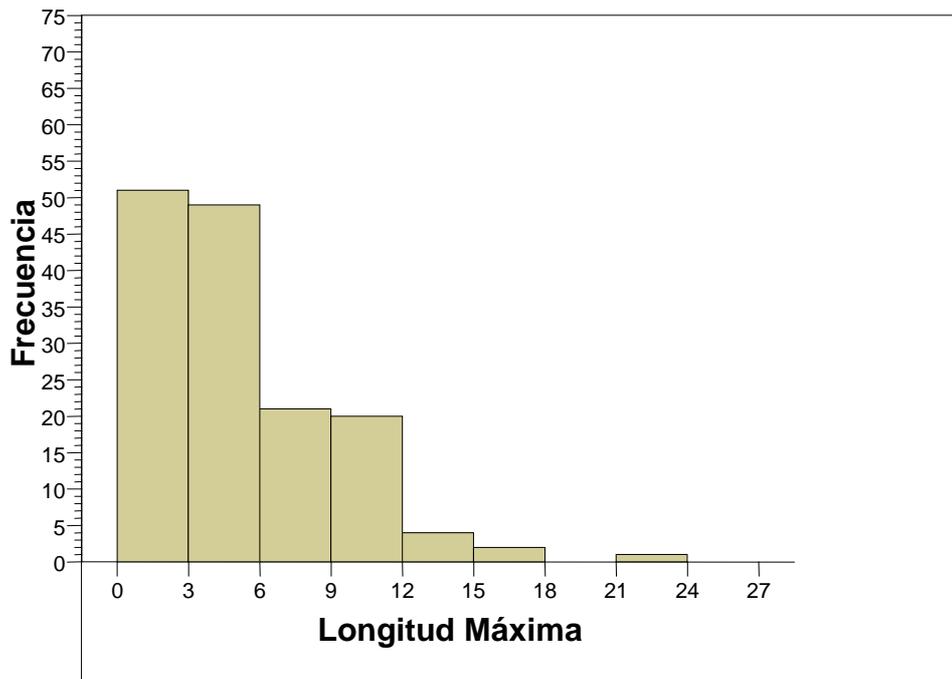


Fig. 40 Distribución de la longitud máxima del CIN

En CIN 2 la media fue de 3.41 mm. (0.50-9.50) con una desviación típica de 2.04, mientras que para CIN 3 la longitud media máxima fue de 6.64 mm. (0.50-21.00) con una desviación típica de 3.91. La distribución en forma de gráfico viene representada en la fig. 41 y en la tabla 5. La prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes muestra un p-valor de $0.000 < 0.05$, que demuestra que la longitud máxima que alcanzan las lesiones tipo CIN 3 es de forma significativamente mayor que las de CIN 2, con una diferencia media de 3.13 mm.

Tabla 5 Longitud Máxima de CIN en las 148 piezas quirúrgicas

Longitud máxima	CONO DIAGNOSTICO	
	CIN 2	CIN 3
0-3 mm	37 (56.1%)	18 (22.0%)
>3-6 mm	22 (33.3%)	27 (32.9%)
>6-9 mm	6 (9.1 %)	17 (20.7%)
>9 mm	1 (1.5%)	20 (24.4%)
Total	66 100%	82 100%

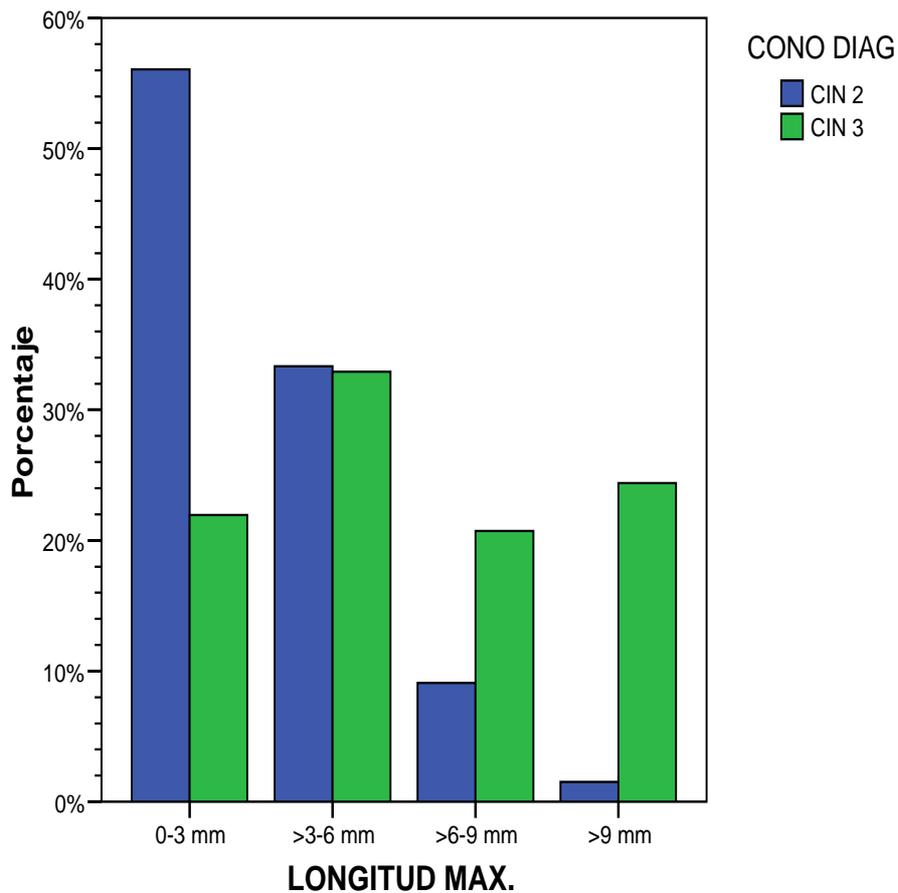


Fig. 41 Distribución de la Longitud máxima según CIN

La afectación glandular por CIN se observa en 102 de los 148 casos de CIN (68.91%). Cuando lo estudiamos por tipo de CIN obtenemos los siguientes datos: La afectación glandular la identificamos en 30 de los 66 casos de CIN 2, que corresponde al 45.4%, mientras que en CIN 3 la encontramos en 72 de los 82 casos estudiados (87.8%). Los datos en forma de gráfico se representan en la fig. 42. La aplicación de la prueba χ^2 de Pearson da un p-valor de $0.000 < 0.05$ que indica que la incidencia de afectación glandular en CIN 3 es significativamente mayor que en CIN 2.

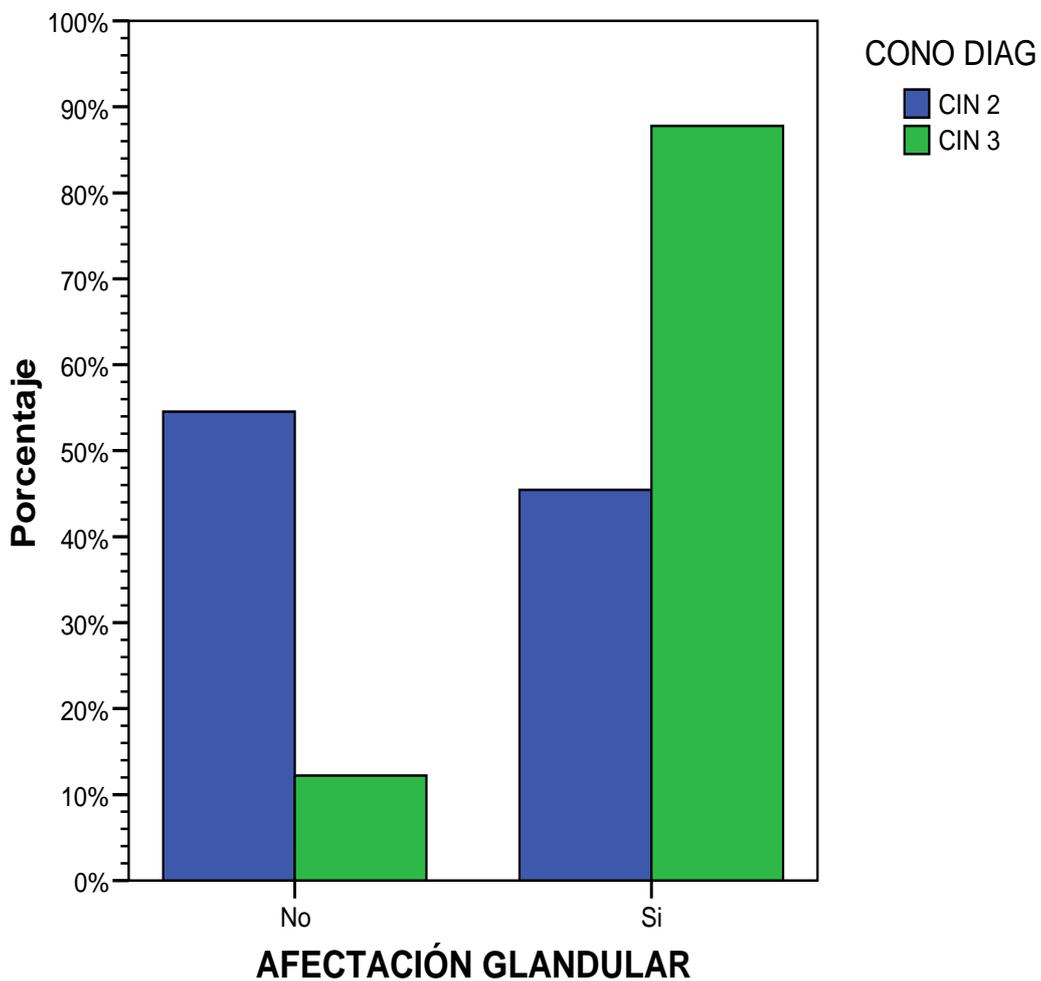


Fig. 42 Distribución de la Afectación Glandular según CIN

En los casos que presentaron afectación glandular por CIN, la profundidad media de la lesión fue de 0.99 mm. (0.2-4.4) con una desviación típica de 0.65 (fig. 43).

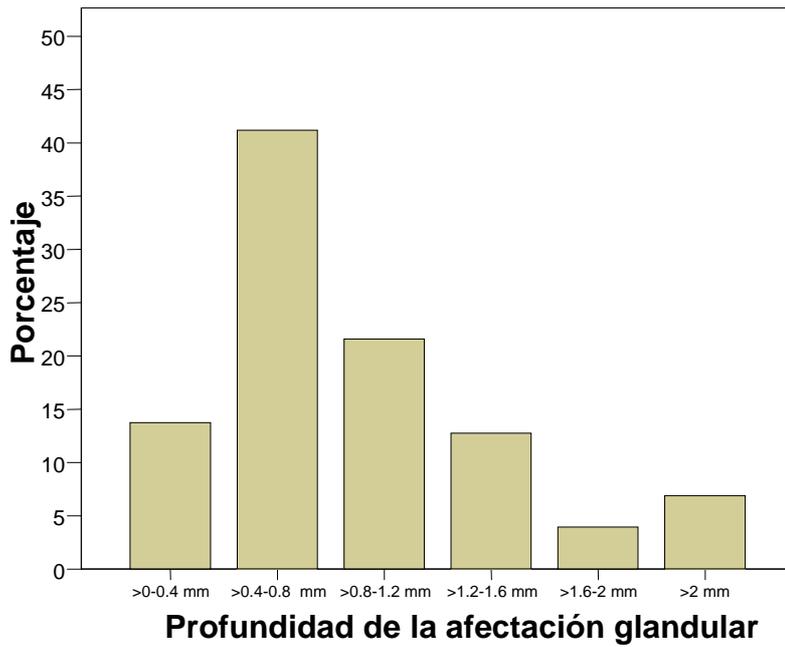


Fig. 43 Distribución de la profundidad de la afectación Glandular en CIN

En CIN 2 la media de profundidad de la afectación glandular fue de 0.75 mm. (0.2-2.5) con una desviación típica de 0.50. En CIN 3 la media fue de 1.10 mm. (0.2-4.4) con una desviación típica de 0.68. Los datos se expresan en forma de gráfico en la fig. 45. La aplicación de la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes nos da un p-valor de $0.02 < 0.05$ que indica que la profundidad media de la lesión intraglandular en CIN 3 es significativamente mayor que en CIN 2. La diferencia media es de 0.35 mm.

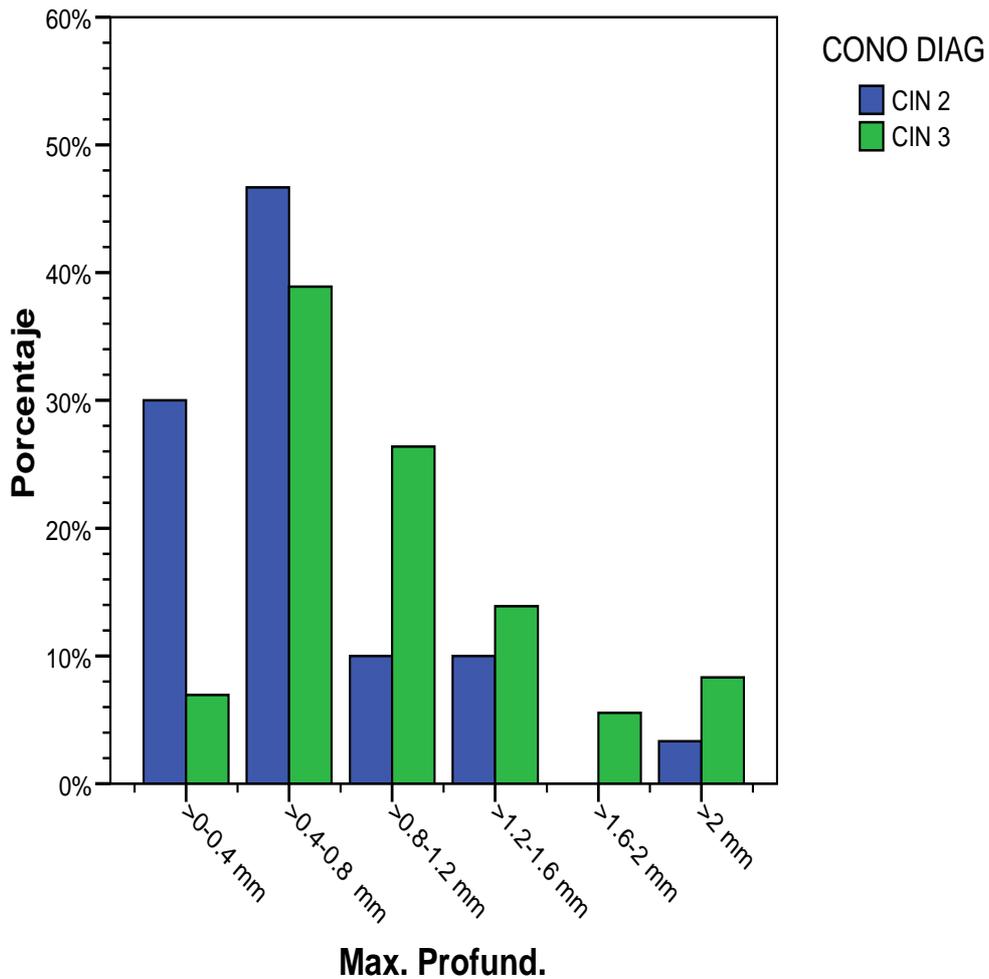


Fig. 44 Distribución de la profundidad de la afectación Glandular según tipo de CIN

El índice mitótico en CIN da una media de 4.59 mitosis por mm. lineal de lesión (0-23.70) con una desviación típica de 3.36. El índice mitótico medio en CIN 2 fue de 3.14 con una desviación típica de 1.58, mientras que en CIN 3 fue de 5.76 con una desviación típica de 3.92. Los datos en forma de gráfico están representados en la fig. 45, pudiendo destacarse que CIN 2 con más de 6 mitosis por mm. lineal es muy infrecuente, aproximadamente el 3%.

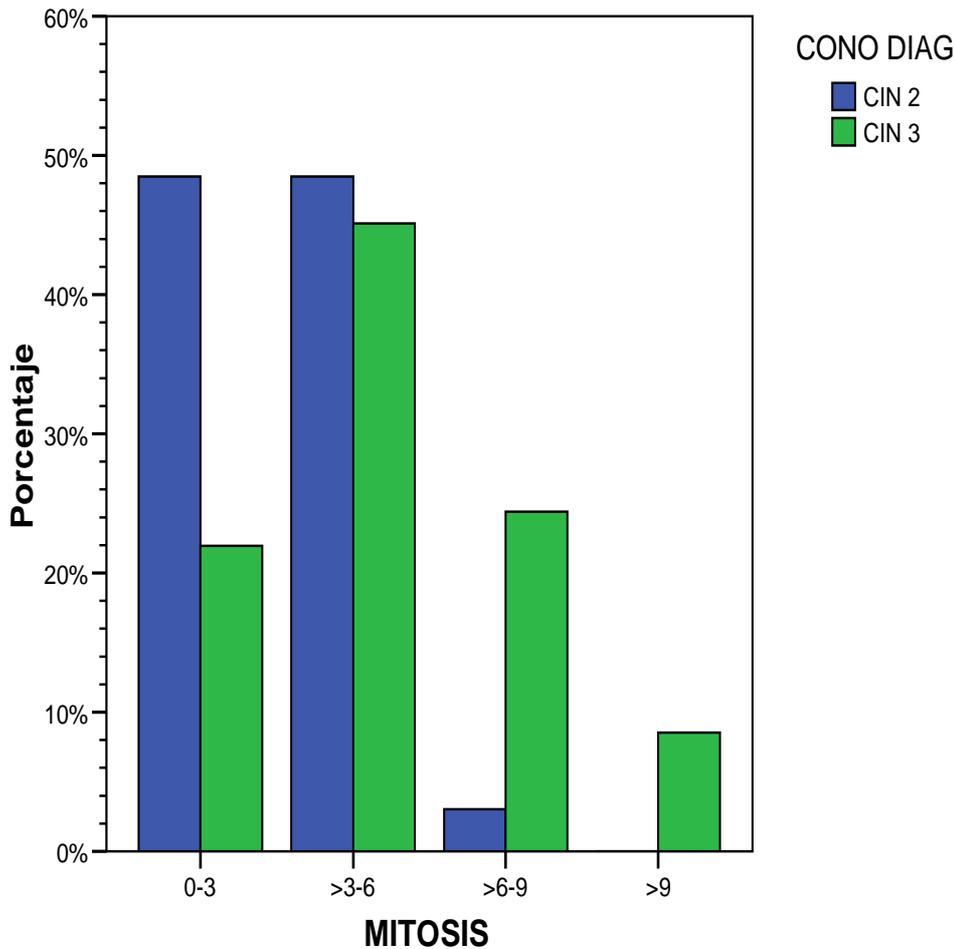


Fig. 45 Distribución del índice mitótico según tipo de CIN

La aplicación de la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes da un p-valor de $0.000 < 0.05$ que indica que el índice mitótico en CIN 3 es significativamente mayor que en CIN 2. La diferencia media es de 2.62.

También hemos estudiado la relación entre tamaño de la lesión e índice mitótico. La mediana del área afectada por CIN es de 31.65. Hemos dividido en dos grupos las áreas de las lesiones, las inferiores a 30 mm^2 ($n=73$) y las iguales o superiores ($n=75$). La media del índice mitótico en las lesiones inferiores es de 3.20 con una desviación típica de 1.64, mientras que las lesiones iguales o superiores a 30 mm^2 tienen un índice mitótico promedio por mm lineal de 5.94 con una desviación típica de 4.0 (fig. 46). La aplicación de la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes nos da un p-valor de $0.000 < 0.05$ que indica que el índice mitótico en las lesiones iguales o mayores a 30 mm^2 es

significativamente mayor que en las menores. La diferencia media es de un índice mitótico por mm lineal de 2.74

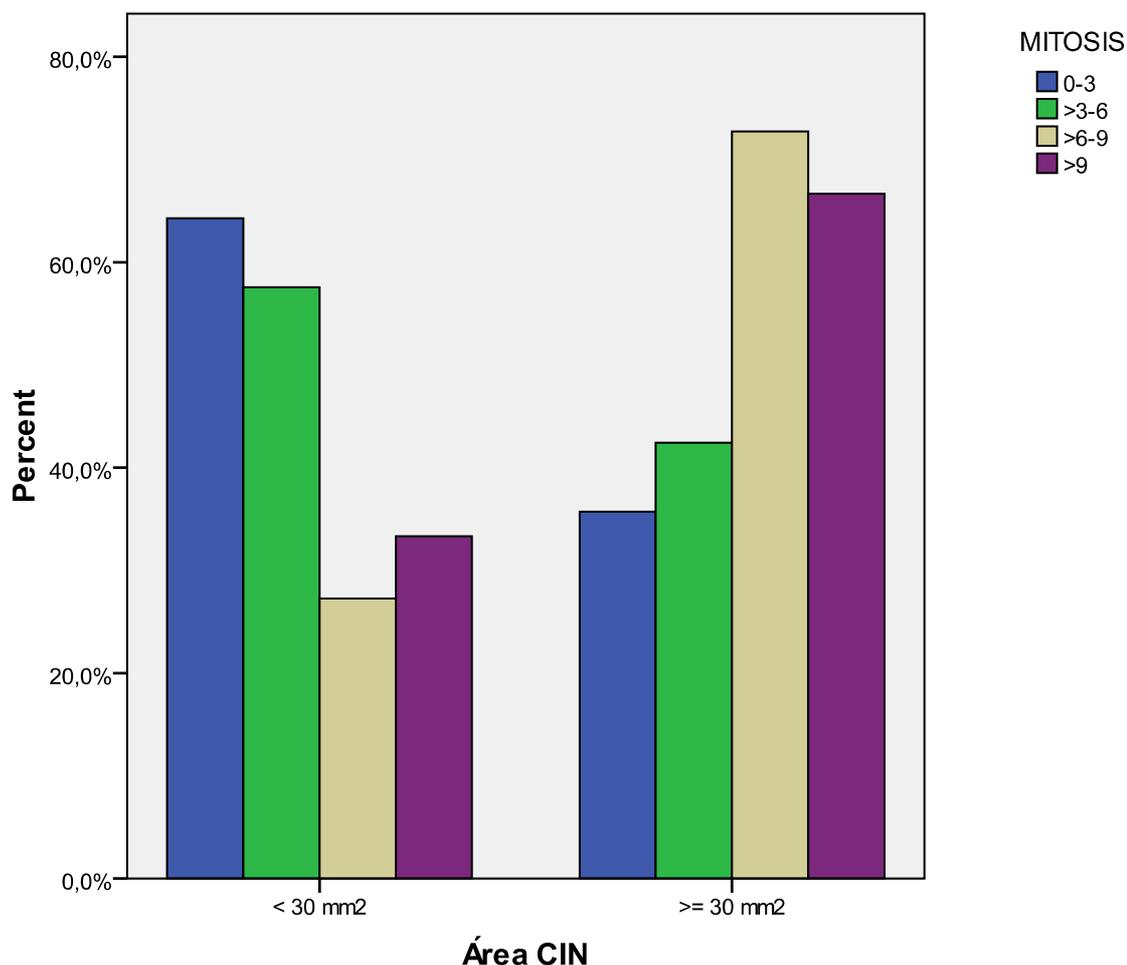


Fig. 46. Distribución del índice mitótico en CIN inferior o superior a 30

Cuando estudiamos la relación entre índice mitótico, extensión de la lesión y tipo de CIN. Los resultados se expresan en la tabla 6. Vemos que CIN 2 con un área igual o superior a 30 mm² tienen un índice mitótico de $3,18 \pm 1.81$ por mm lineal, mientras que en los 56 casos similares de CIN 3 es de $6,73 \pm 5.58$ mitosis por mm lineal. En las lesiones con un área de menos de 30 mm² ocurre algo similar, con un índice mitótico de $2,99 \pm 1.72$ en CIN 2 frente a $5,13 \pm 3.91$ de mitosis por mm lineal en CIN 3. Al estudiar la interacción entre índice mitótico y CIN respecto al área, mediante una ANOVA (Análisis de varianza) de dos factores, vemos que el primer factor, CIN con un p-valor de $0.000 < 0.05$ nos indica que el índice mitótico es diferente entre pacientes con un CIN 2 y CIN 3, con un p-valor de $0.331 > 0.05$ nos indica que en cuanto al segundo factor, Área, no existen diferencias

estadísticamente significativas entre los pacientes con un área $\leq 30 \text{ mm}^2$ o los de área superior, en cuanto al p-valor referente a la interacción de los dos factores con un valor de $0.215 > 0.05$, nos dice que la interacción entre Área y CIN no es estadísticamente significativa, por lo que podemos concluir que el único factor que diferencia el índice mitótico es el tipo de CIN.

Tabla 6 Actividad mitótica según CIN y área lesional de CIN

			Área CIN	
			Área CIN $\geq 30 \text{ mm}^2$	Área CIN $< 30 \text{ mm}^2$
Diagnóstico	CIN 2	Mitosis	3,18 \pm 1.81 (n=47)	2,99 \pm 1.72(n=19)
	CIN 3	Mitosis	6,73 \pm 5.58(n=56)	5,13 \pm 3.91(n=26)

La presencia de papilas vasculares en CIN la encontramos en el 45.3% de casos. La presencia de papilas en pacientes con CIN 2 es del 41.8% y en pacientes con CIN 3 del 58.2%. Los datos en forma de gráfico están representados en la fig. 47. La aplicación de una prueba χ^2 de Pearson da un resultado de p-valor de $0.533 > 0.05$ que demuestra que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de CIN en cuanto a la presencia de papilas vasculares en el epitelio, por lo tanto la presencia de papilas no es un indicador del tipo de CIN.

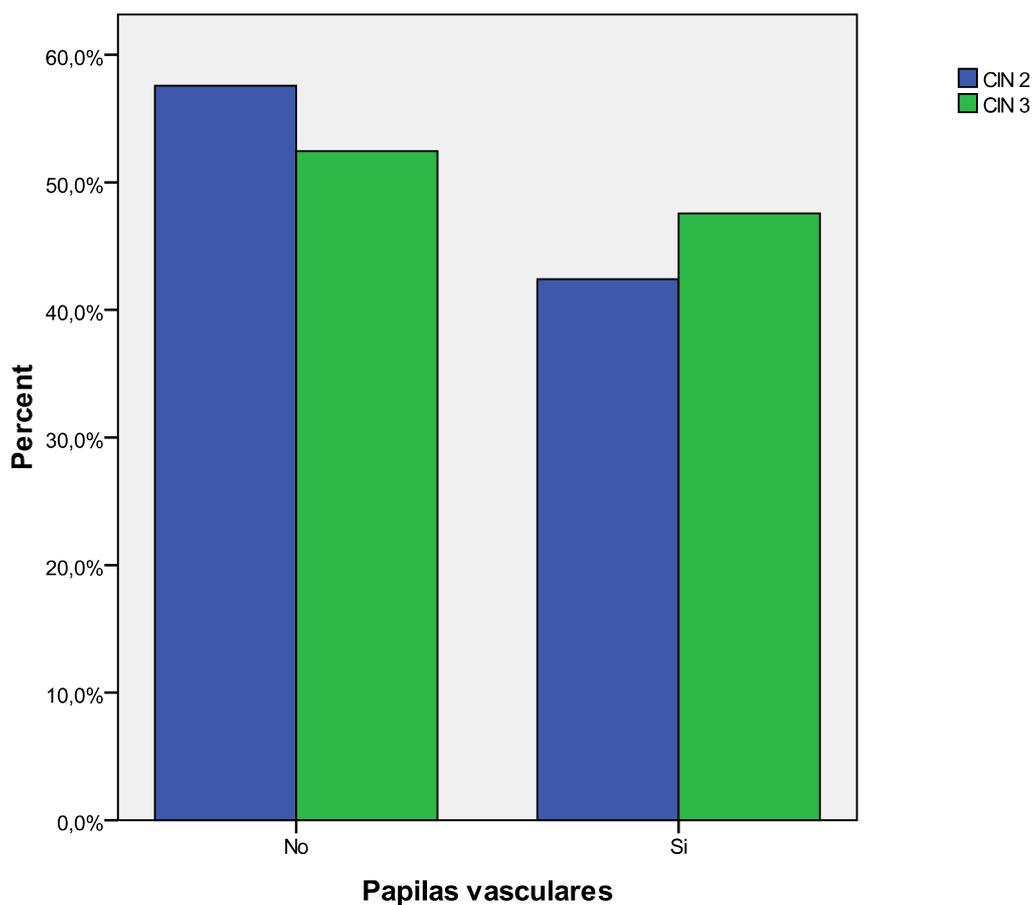


Fig. 47. Distribución de papilas vasculares en CIN

La detección de VPH mediante Hibridación in situ se realizó en 78 casos del periodo comprendido entre 1998 y 2003. Los resultados se expresan en la tabla 7. En conjunto se obtuvo positividad para VPH mediante Hibridación in situ en el 66.6 % del total de casos estudiados, no siendo ningún caso positivo para virus de bajo riesgo (VPH 6/11). El análisis estadístico no muestra diferencias significativas en la distribución de VPH en CIN.

Tabla 7 Resultados Hibridación in situ para VPH

Tabla de contingencia CONO DIAG * VPH

	VPH 6/11 No. (%)	VPH 16/18 No. (%)	VPH 31/33 No. (%)	VPH NEG. No. (%)
CIN 2	0	14 (40.0%)	14 (40.0%)	7 (20.0%)
CIN 3	0	18 (41.9%)	6 (14.0%)	19 (44.2%)
CIN	0	32 (41.1%)	20 (25.6)	26 (33.3)

La distribución de los casos positivos para VPH según CIN es en CIN 2 de 80% tanto para VPH 16/18 (40%) como para VPH 31/33 (40%) y en CIN3 un 55.9% de casos positivos tanto para VPH 16/18(41.9%) como para VPH 31/33 (14.0%). En CIN 3 se observa predominio de VPH 16/18 mientras que en CIN 2 se reparten equitativamente VPH 16/18 y VPH 31/33. El análisis estadístico para la comparación de proporciones de casos positivos y negativos mediante un test χ^2 de Pearson indica que hay diferencias estadísticamente significativas con un p-valor de $0.024 < 0.05$. En la comparación de proporciones de VPH-, VPH 16/18 y VPH 31/33 en CIN2 respecto CIN3 obtenemos con una prueba χ^2 de Pearson que con un p-valor de $0.014 < 0.05$ hay diferencias estadísticamente significativas.

Las áreas medias de CIN obtenidas para CIN 2 y CIN 3 agrupados en relación con el VPH detectado por Hibridación in situ se expresan en la tabla 8. La media de las áreas de CIN 3 son siempre superiores que las de CIN 2 independientemente de la ausencia o presencia de un determinado VPH.

Tabla 8

Áreas medias en mm² según tipo de VPH

	VPH 16/18	VPH 31/33	VPH NEG.
CIN 2	24.54±27.52	33.88±26.80	36.33±38.96
CIN 3	50.40±43.52	59.25±25.08	76.92±97.84
CIN	39.08±39.06	41.49±28.27	65.99±87.14

Al estudiar la interacción entre virus y CIN respecto al área, mediante una ANOVA (Análisis de varianza) de dos factores, vemos que con un p-valor de 0.500 > 0.05 no existe relación, ni respecto al tipo de VPH y el área, ni una interacción entre tipo de CIN y VPH al área afectada p-valor 0.885>0.05. Si observamos la gráfica de la fig. 48 vemos como tanto para CIN2 como para CIN3 la relación de medias según VPH es la misma, pero a distintos niveles según CIN.

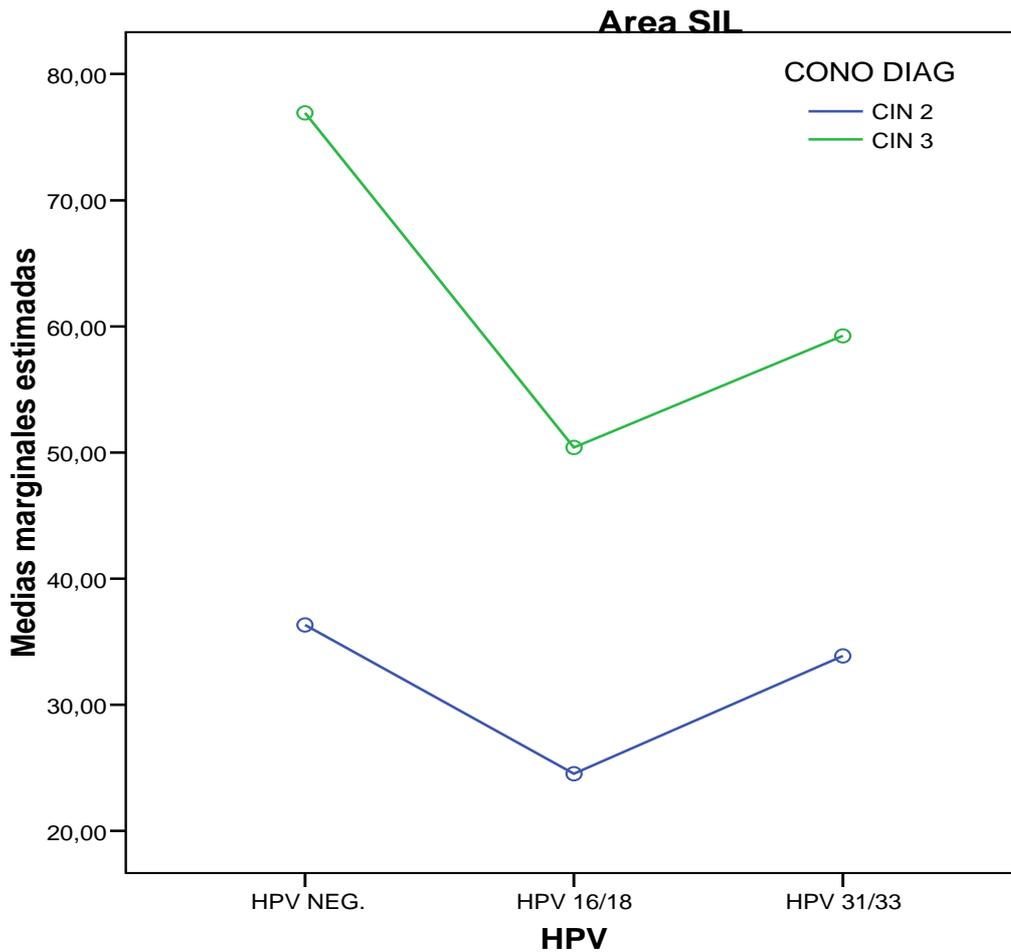


Fig. 48. Superficie afectada por CIN en relación con VPH

En la fig. 49 podemos observar la distribución de VPH según área afectada por CIN. La única relación estadísticamente significativa que se encuentra es la de área afecta y el tipo de CIN. Llama la atención en esta gráfica que la incidencia de VPH 31/33 va en aumento a medida que aumenta el tamaño del CIN, mientras que con VPH 16/18 la incidencia es más heterogénea con un pico en el grupo de lesiones entre 10-20 mm².

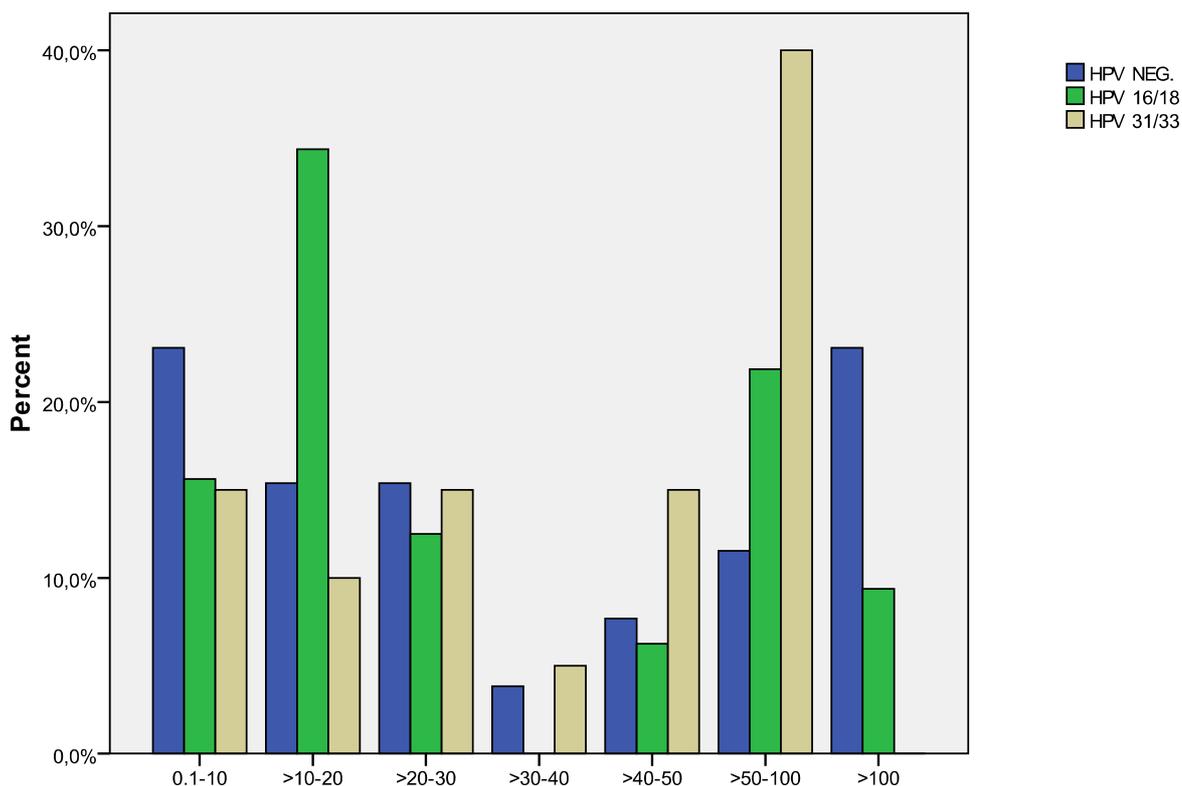


Fig. 49. Distribución del VPH por áreas afectadas por CIN

Si comparamos la afectación del Área entre CIN2 y CIN3 en cada uno de los grupos VPH Neg, VPH 16/18 y VPH 31/33, con un test U de Mann Whitney, obtenemos unos p-valores de 0.572, 0.025 y 0.062 respectivamente, la cual cosa nos indica que solo en los pacientes con virus VPH 16/18 hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la media de área SIL.

El estudio de la relación entre índice mitótico y tipo de VPH presente en la lesión nos da los siguientes resultados:

En los pacientes con VPH16/18 el índice mitótico medio es de 5.2 con desviación típica de 4.8, entre los que tienen VPH 31/33 fue de 3.4 con una desviación típica

de 2.7 y con VPH negativo fue de 5.4 con una desviación típica de 4.4. La aplicación de una prueba de H de Kruskal-Wallis nos indica con un p-valor de $0.082 > 0.05$ que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de VPH en cuanto al índice mitótico, si comparamos VPH- con VPH+ con una prueba U de Mann-Whitney tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas con un p-valor de $0.428 > 0$.

Hemos estudiado también la relación entre edad y extensión de CIN. Los datos se exponen en las tablas 9 y 10. La segmentación de la población por décadas, muestra diferencias significativas entre CIN 2 y CIN 3 en cuanto al área afectada en todas las franjas de edad salvo en los pacientes ≥ 50 años. La comparación se ha realizado mediante un test U de Mann-Whitney para muestras independientes, los p-valores se muestran en la tabla 10.

Tabla 9 Áreas medias de CIN según grupo de edad

Edad	TOTAL	
	Media	Desv. Típ.
20-29 (n=27)	39.31	34.50
30-39 (n=78)	47.76	47.41
40-49 (n=20)	65.22	57.83
>=50 (n=23)	70.23	96.28

Tabla 10 Áreas medias de CIN según edad y tipo de CIN

Edad	CIN 2		CIN 3		p-valor
	Media	Desv. Típ.	Media	Desv. Típ.	
20-29 (n=27)	21.90	21.11	58.05	36.92	0.003*
30-39 (n=78)	24.24	19.20	70.10	55.12	0.000*
40-49 (n=20)	31.00	32.61	83.65	60.92	0.019*
>=50 (n=23)	43.90	40.47	81.76	111.69	0.871

*p-valor<0.05

Al relacionar edad con tipo de VPH (tabla 11) no vemos diferencias entre los diferentes grupos analizados:

<i>Tabla 11</i>	Edad media	Desviación típica
VPH Negativo	41.54	12.79
VPH 16/18	36.31	11.30
VPH 31/33	38.75	11.83

Se realiza una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que no demuestra diferencias significativas entre los tres grupos de VPH con una p-valor de 0.384>0.05

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

7.1 Discusión

Desde que en las reuniones de Bethesda se introdujo la nueva terminología diagnóstica citológica en dos categorías de bajo y alto grado, existe la controversia entre los patólogos de adoptar el mismo sistema para el diagnóstico biopsico. Existen autores (53;54) que proponen incorporar esta nomenclatura a los estudios histológicos. Los datos en apoyo para un sistema diagnóstico de únicamente dos clases son:

1. La segregación general de tipos de VPH de bajo y alto riesgo con Lesiones de Bajo Grado (LBG) y Lesiones de Alto Grado (LAG).
2. Mejor reproducibilidad entre patólogos para el diagnóstico
3. Bajo riesgo existente de progresión a carcinoma para las LBG
4. Idéntico tratamiento para CIN 2 y 3

No obstante también existen opiniones contrarias (55-57) que se basan en:

1. VPH de alto riesgo se detecta en LBG
2. Algunas LBG han progresado a carcinomas invasivos
3. Algunos estudios sugieren que existe mayor riesgo de progresión para CIN 3 que CIN 2
4. CIN 2 es una lesión más heterogénea biológicamente y con mayores índices de regresión

Entre los factores de riesgo que favorecerían la persistencia y la progresión a cáncer se consideran el tabaco (58;59), la inmunidad (60) y el tamaño de la lesión precancerosa (61;62).

Los datos aportados por nuestro estudio favorecerían el mantenimiento de los CIN de alto grado separados en dos categorías, ya que estadísticamente vemos que CIN 3 es significativamente mayor que CIN 2 con una media de 72.61 +/- 67.81 mm² y 26.55 +/- 24.30 mm² respectivamente.

Puesto que la progresión de las lesiones intraepiteliales a carcinoma se ha visto que entre otros factores se asocia a lesiones extensas, creemos que nuestros datos apoyan mantener CIN 2 y 3 como entidades separadas ya que el tamaño de

CIN 3 es significativamente mayor que CIN 2 y por tanto el riesgo de desarrollar un carcinoma invasivo será superior.

No hemos encontrado trabajos comparativos de medición de la superficie del CIN 2 y 3 semejantes al nuestro, pero entre los trabajos que estudian la extensión de CIN podemos citar el de Tidbury *et al.* (63) realizado en pacientes con carcinoma escamoso microinvasivo que demuestra que el tamaño medio de CIN 3 asociado a microinvasión es siete veces mayor que cuando no existe. La dimensión lineal total media de sus 39 casos fue de 63.5 mm (rango 11.4-162.4 mm). Es decir que si estos datos los equiparamos a nuestro estudio tendremos que multiplicar la longitud por el grosor del corte, dando una media de área afectada de 127.0-190.5 mm² según grosor del corte (2-3 mm) que es sensiblemente mayor que nuestros casos de CIN 3 ya que en nuestro estudio no incluimos CIN 3 asociado a microinvasión.

También hemos demostrado diferencias significativas entre la extensión longitudinal de ambas lesiones siendo CIN 3 con una longitud máxima (LM) de 6.64 +/- 3.91 mm significativamente mayor que las de CIN 2 que fueron de 3.41 +/- 2.04 mm. Uno de los pocos trabajos que da datos comparativos de la extensión lineal de CIN 2 y 3 es el realizado por Abdul-Karim *et al.* (64) en donde CIN 2 tiene una longitud media máxima de 5.84 +/- 4.13 y CIN 3 de 7.60 +/- 4.32 mm. Boonstra *et al.* (65) estudiaron en 65 piezas de conización la extensión lineal de CIN III obteniendo una longitud media máxima de 7.4 +/- 3.7 mm. Para Pinto *et al.* (66) la longitud media máxima fue de 5.15 mm +/- 2.58 en CIN 3. Kimura *et al.* (67) obtuvo una LM de 4.72 +/- 2.60 mm en CIN 2 y de 8.19 +/- 3.92 en CIN 3.

En un trabajo publicado por Sherman *et al.* (68) con 40 piezas de LEEP, procedentes del estudio ALTS (69) de seguimiento durante 2 años en pacientes diagnosticadas inicialmente por citología de LSIL o ASCUS, realiza una medición lineal de cada corte afectado por CIN 3 sumando posteriormente todas las mediciones de cada caso. Ello le da una longitud media de 6.5 mm por caso. Es decir que su análisis demuestra que la gran mayoría de CIN 3 detectados en el grupo de ALTS era de pequeño tamaño con una media de dos fragmentos de tejido afectados. Si trasladamos estos datos a nuestro estudio teniendo en cuenta

el grosor del corte nos dará que el área afectada por CIN 3 variará de 13 a 19.5 mm², cifra muy inferior al de nuestro trabajo ya que el grupo de pacientes que nosotros estudiamos presenta como diagnóstico citológico inicial en la mayoría de casos un HSIL.

La afectación del epitelio glandular endocervical por epitelio displásico del CIN hemos demostrado que se da con mayor frecuencia en CIN 3 que en CIN 2, con una frecuencia que se acerca al 90% en los casos de CIN 3 y de menos del 50% en CIN 2. Del mismo modo hemos encontrado diferencias entre las dos lesiones en cuanto a la profundidad que alcanza la invasión intraglandular, siendo significativamente mayor en CIN 3 que en CIN 2. Kimura en su trabajo (67) también estudió la afectación intraglandular en 17 casos de CIN 2 y 78 de CIN 3, obteniendo una profundidad media en CIN 2 de 0.84+/-0.51 y de 1.41+/-0.90 en CIN 3 que son datos bastante similares a los nuestros. Boonstra (70) estudió juntamente con la extensión de CIN 3 la profundidad de la afectación glandular con unos resultados algo mayores que los nuestros ya que la profundidad máxima media fue de 1.6+/-1.0 mm frente a los 1.10 +/-0.68 mm de nuestros casos. En este trabajo Boonstra propuso que la destrucción mínima de tejido en CIN 3 debería ser de al menos 4 mm de grosor para poder asegurar un tratamiento completo de la lesión. Abdul-Karim (36) en su trabajo también estudió la profundidad de la afectación glandular, siendo de 0.93+/-0.71 mm en CIN 2 y de 1.35+/-1.15 mm en CIN 3.

Los datos aportados hasta ahora confirman el diferente comportamiento local de ambas lesiones y ello podría implicar diferentes estrategias a la hora de plantear un tratamiento. La exéresis de las lesiones tipo CIN 3 deberá ser más extenso y profundo que las de CIN 2 sino queremos realizar tratamientos quirúrgicos incompletos de dichas lesiones. Por este motivo en CIN 3 se ha propuesto la realización de una reexéresis del canal endocervical tras el primer paso con la LEEP, para evitar las recidivas y la lesión residual endocervical(71). En CIN 2 se podrían plantear tratamientos escisionales más conservadores dada la menor extensión superficial y profunda de las lesiones, a fin de evitar las complicaciones que pueden aparecer. La conización mediante asa cervical está asociada con un

incremento del riesgo de ruptura prematura de membranas y nacimientos prematuros (72).

La última diferencia que hemos podido comprobar entre CIN 2 y CIN 3, corresponde a su actividad proliferativa. El índice mitótico por mm de lesión es significativamente menor en CIN 2 que en CIN 3, siendo de 3.14 ± 1.58 para el primero y de 5.76 ± 3.92 para el segundo, con una diferencia media de 2.62. Podemos destacar que CIN 2 con más de 6 mitosis por mm lineal es un hecho muy ocasional, menos del 3% de casos, de la misma forma que CIN 3 con menos de 2 mitosis por mm lineal es también un hecho muy infrecuente, aproximadamente 7% de casos.

No hemos encontrado en la literatura ningún trabajo similar, aunque existen diversos trabajos que han estudiado el índice mitótico en CIN, definido como el conteo de mitosis en diez campos de gran aumento en la zona con mayor actividad mitótica (73-76) aportando datos de índice mitótico mayor en CIN 2-3 mayor que en CIN 1. A nuestro entender es una forma de realizar el conteo de mitosis muy sesgado, ya que únicamente se limita a la zona con mayor actividad mitótica. En el trabajo de Fadare et al (73) aportan datos comparativos entre CIN 2 y CIN 3 no obteniendo diferencias significativas en cuanto a índice mitótico de ambas lesiones, con 4.0 ± 2.4 en CIN 2 y 4.9 ± 4.7 en CIN 3. En el trabajo de Van Leeuwen et al (76) obtienen un índice mitótico de 3 en CIN 1, 4 en CIN 2 y 9 en CIN 3. Los datos aportados en nuestro trabajo se refieren a la actividad mitótica en toda la extensión de la lesión y no únicamente del área con mayor actividad. Nuestros datos al ser expresados por mm de lesión permiten aplicar sus resultados a las biopsias cervicales realizadas mediante pinza, en las que se obtienen muestras de tejido de muy pocos milímetros. Estos datos podrían ayudar en casos de difícil diferenciación entre CIN 2 y CIN 3. También podrían ayudar al diagnóstico diferencial entre ambas entidades, ya que la reproducibilidad diagnóstica entre interobservadores e intraobservadores es bastante mala como así se ha podido comprobar en numerosos trabajos (51;52;77-79).

Cuando hemos comparado la actividad mitótica según área afectada por CIN, hemos podido comprobar que las lesiones inferiores a 30 mm^2 aunque presentan

un índice mitótico inferior que las mayores, la diferencia no es estadísticamente significativa. Cuando hemos comparado la actividad mitótica de CIN 2 y las de CIN 3 según área afectada, hemos podido comprobar que independientemente del área afectada, siempre CIN 3 presenta significativamente mayor actividad mitótica que CIN 2. Es decir no existe interacción entre área afectada y Cin, por lo que podemos concluir que el único factor que diferencia la actividad mitótica es el tipo de CIN. En la literatura no hemos podido encontrar ningún trabajo que haya estudiado esta relación.

La presencia de papilas vasculares intraepiteliales no ha aportado datos diferenciales entre CIN 2 y 3, hallándose presentes casi en un 42% de casos de CIN 2 y un 58% de CIN 3, sin que existan diferencias significativas estadísticas. Panjković (80) estudió la microvascularización presente en CIN a nivel subepitelial e intraepitelial demostrando que aumentaba la vascularización a medida que CIN aumentaba de grado, hallando diferencias significativas entre CIN 1 y CIN 3, pero no entre CIN 2 y 3. Otros autores han realizado estudios de la densidad de microvascularización en tejido normal, CIN y carcinoma invasivo con resultados dispares. Para Lee et al (81) encontraron aumento de la microvascularización a medida que progresaba CIN y el carcinoma invasivo. En cambio Triratanachat et al (82) no encontraron diferencias entre el tejido normal, CIN 1 y CIN 2.

El estudio de VPH mediante Hibridación in situ nos muestra una distribución de los serotipos en CIN 2 y CIN 3 similar a la aportada por otros autores (83) con predominio de VPH 16/18 en CIN 3 y una distribución similar de los serotipos 16/18 y 31/33 en CIN 2. En cuanto a la relación existente entre área de CIN y tipo de VPH presente en la lesión no hemos encontrado diferencias significativas entre los casos causados por VPH 16/18, VPH 31/33 o los casos con VPH negativo. En la revisión bibliográfica realizada no hemos encontrado ningún estudio que relacione tipo de VPH con extensión.

En nuestra serie vemos que predominan de forma significativa las pacientes con CIN 2 y 3 con edades comprendidas entre 30 y 40 años con un 52.7 % del total de pacientes. Estos datos de prevalencia son similares a los aportados por otros autores (84). Al explorar la relación existente entre área de CIN y edad de las

pacientes vemos que existen diferencias significativas entre CIN 2 y CIN 3 en cuanto al área afectada en todas las franjas de edad salvo en las pacientes de más de 50 años.

No hemos encontrado diferencias significativas en las edades medias de las pacientes con diferentes VPH, lo que indica que no existe ninguna relación entre edad y tipo de VPH presente en CIN.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

8.1 Conclusiones

1. Hemos demostrado que CIN 3 afecta superficies significativamente mayores que CIN 2 y a la vez se trata de lesiones con mayor tamaño longitudinal en el canal cervical y con una actividad mitótica por mm. lineal superior. También hemos podido demostrar que no existe relación entre tamaño del CIN y tipo de VPH presente en la lesión, de igual forma que tampoco existe relación entre el tamaño del CIN y la edad de las pacientes, confirmando que el factor determinante para el tamaño de la lesión es el tipo de CIN.
2. CIN 3 presenta mayor afectación y profundidad de las glándulas endocervicales que CIN 2.
3. La vascularización Intraepitelial, en forma de papilas intravasculares, no es diferente en CIN 2 y CIN 3.
4. Hemos demostrado que VPH 16/18 es más prevalente en CIN 3, mientras que en CIN 2 la prevalencia entre VPH 16/18 y VPH 31/33 es similar.
5. Dado que uno de los factores más importantes de la progresión a cáncer invasivo es la persistencia de la lesión y la extensión de la misma, podemos concluir sin ningún tipo de duda que a pesar que CIN 2 y CIN 3 son consideradas desde el punto de vista citológico como una sola entidad “lesión de alto grado”, su potencial de malignización no es igual y debemos seguir manteniendo CIN 2 y CIN 3 como dos entidades diferentes.
6. Los datos publicados indican que los serotipos VPH 16 y 18 se encuentran en cerca del 70% de cánceres invasivos y en nuestro estudio hemos podido demostrar que VPH 16/18 predomina en CIN 3, así como que los tamaños de las lesiones causadas por estos virus son siempre mayores en CIN 3 que en CIN 2, volviendo a confirmar la mayor relación existente entre CIN 3, VPH 16/18 y cáncer invasivo que en el caso de CIN 2.

CAPÍTULO IX

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

9.1 Líneas de investigación futuras

1. Dado que el estudio mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa del tipo de VPH presente en CIN es un método mucho más sensible que la Hibridación in situ realizada en nuestro estudio. Sería oportuno realizar PCR de todos los casos del estudio a fin de confirmar los datos apuntados por nuestro estudio en el sentido de diferente distribución de serotipos de VPH en CIN 2 y CIN 3.
2. Estudio del tamaño de CIN asociado a carcinoma microinfiltrante para intentar confirmar el tamaño del CIN como factor implicado en la progresión a cáncer invasivo.
3. Estudio de las posibles diferencias en la microvascularización existente en el tejido conjuntivo subepitelial de CIN 2 y CIN 3.
4. Estudio de las posibles diferencias entre CIN 2 y CIN 3 con diferentes marcadores inmunohistoquímicos como Ki 67, relacionado con la proliferación celular, P16, como marcador de progresión hacia carcinoma invasivo y P53 como marcador de alteración de la apoptosis.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

(1) Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):3-13.

(2) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, (1995, Lyon F, Centre international de recherche sur le cancer. Human papillomaviruses. --. Lyon, France: IARC, 1995.

(3) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6):518-527.

(4) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.

(5) Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(3):217-226.

(6) Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105(3):386-393.

(7) Wright TC, Jr., Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003; 348(6):489-490.

(8) 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(16):2114-2119.

(9) 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, 2003.

(10) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.

(11) Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenck U, Baldauf JJ, Da Silva D et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. *Cytopathology* 2008; 19(6):342-354.

(12) Puig-Tintoré LM AMABFCXCCCCBXTBAVAJVVE. La infección por papilomavirus. Documentos de Consenso SEGO 2002 2004; Ed. Madrid, 2003; (Marzo): 41-104.

(13) Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(1):27-41.

(14) Bosch FX, Schiffman M, Solomon D. Future Directions in Epidemiologic and Preventive Research on Human Papillomaviruses and Cancer. Proceedings of a workshop. Bethesda, Maryland, USA, June 2002. J Natl Cancer Inst Monogr 2003;(31):1-130.

(15) Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG et al. American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. CA Cancer J Clin 2007; 57(1):7-28.

(16) Garland SM. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. Pathology 2002; 34(3):213-224.

(17) Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. J Clin Pathol 2003; 56(7):532-536.

(18) de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis 2007; 7(7):453-459.

(19) Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine 2008; 26 Suppl 10:K1-16.

(20) Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. Mod Pathol 2006; 20(2):167-174.

(21) Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, Guerrerro E, Ghaffari AM, Kaldor J et al. Importance of human papillomavirus endemicity in the incidence of cervical cancer: an extension of the hypothesis on sexual behavior. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3(5):375-379.

(22) Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus in cervical cancer. Curr Oncol Rep 2002; 4(2):175-183.

(23) Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2007; 370(9590):890-907.

(24) Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. Mod Pathol 2004; 17(11):1314-1322.

(25) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348(6):518-527.

(26) Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J et al. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus

(HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(5):483-488.

(27) Garland SM. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology* 2002; 34(3):213-224.

(28) Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286(24):3106-3114.

(29) Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 341(22):1633-1638.

(30) Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ* 2003; 168(4):421-425.

(31) Molano M, Van den BA, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003; 158(5):486-494.

(32) 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(6):485-490.

(33) 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(7):423-428.

(34) Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(17):1336-1343.

(35) 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(16):2114-2119.

(36) Wright TC, Jr., 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(4):340-345.

(37) Jordan J, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Schenck U, Baldauf JJ, Da Silva D et al. European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2. *Cytopathology* 2009; 20(1):5-16.

(38) Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S et al. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *N Engl J Med* 2007; 356(19):1928-1943.

- (39) The FUTURE II Study Group. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *N Engl J Med* 2007; 356(19):1915-1927.
- (40) Baden LR, Curfman GD, Morrissey S, Drazen JM. Human Papillomavirus Vaccine -- Opportunity and Challenge. *N Engl J Med* 2007; 356(19):1990-1991.
- (41) Sawaya GF, Smith-McCune K. HPV Vaccination -- More Answers, More Questions. *N Engl J Med* 2007; 356(19):1991-1993.
- (42) Agosti JM, Goldie SJ. Introducing HPV vaccine in developing countries--key challenges and issues. *N Engl J Med* 2007; 356(19):1908-1910.
- (43) Myers E, Huh WK, Wright JD, Smith JS. The current and future role of screening in the era of HPV vaccination. *Gynecol Oncol* 2008; 109(2 Suppl):S31-S39.
- (44) Franco EL, Cuzick J. Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 1:A16-A23.
- (45) Flores Y, Bishai D, Lazcano E, Shah K, Lorincz A, Hernandez M et al. Improving cervical cancer screening in Mexico: results from the Morelos HPV Study. *Salud Publica Mex* 2003; 45 Suppl 3:S388-S398.
- (46) Lorincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex* 2003; 45 Suppl 3:S376-S387.
- (47) Myers E, Huh WK, Wright JD, Smith JS. The current and future role of screening in the era of HPV vaccination. *Gynecol Oncol* 2008; 109(2 Suppl):S31-S39.
- (48) 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(3):516-520.
- (49) Kimball KJ, Huh WK. Cytology versus high-risk HPV testing for follow-up of HPV-positive women without CIN. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6(1):96-100.
- (50) Wright TC, Jr. Cervical cancer screening in the 21st century: is it time to retire the PAP smear? *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50(2):313-323.
- (51) Carreon JD, Sherman ME, Guillen D, Solomon D, Herrero R, Jeronimo J et al. CIN2 is a much less reproducible and less valid diagnosis than CIN3: results from a histological review of population-based cervical samples. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26(4):441-446.
- (52) Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am J Clin Pathol* 2007; 127(5):805-815.

(53) Crum CP. Symposium part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(1):5-12.

(54) Cooper K, Evans M, Mount S. Biology and evolution of cervical squamous intraepithelial lesions: a hypothesis with diagnostic prognostic implications. *Adv Anat Pathol* 2003; 10(4):200-203.

(55) Schneider V. Symposium part 2: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Counterpoint. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(1):13-17.

(56) Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):14-19.

(57) Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol* 2009; 113(1):18-25.

(58) Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control* 2003; 14(9):805-814.

(59) Harris TG, Kulasingam SL, Kiviat NB, Mao C, Agoff SN, Feng Q et al. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Epidemiol* 2004; 159(9):834-842.

(60) Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J et al. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(5):483-488.

(61) al Nafussi AI, Hughes DE. Histological features of CIN3 and their value in predicting invasive microinvasive squamous carcinoma. *J Clin Pathol* 1994; 47(9):799-804.

(62) Yonemoto Y, Wada Y, Suzuki H, Higashiiwai H, Yajima A. [A histopathological study on the biological behavior of carcinoma in situ of the uterine cervix]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1994; 46(5):442-448.

(63) Tidbury P, Singer A, Jenkins D. Cin-3 - the Role of Lesion Size in Invasion. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1992; 99(7):583-586.

(64) Abdul-Karim FW, Fu YS, Reagan JW, Wentz WB. Morphometric study of intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1982; 60(2):210-214.

(65) Boonstra H, Aalders JG, Koudstaal J, Oosterhuis JW, Janssens J. Minimum extension and appropriate topographic position of tissue destruction for treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1990; 75(2):227-231.

(66) Pinto AP AP, Tuon FF, Torres LF, Collaco LM. Limiting factors for cytopathological diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesions: a cytohistological correlation between findings in cervical smears and loop electrical excision procedure. *Diagn Cytopathol* 2002; 26(1):15-18.

(67) Kimura M, Matsumoto T, Morizane T, Sonoue H, Ogishima D, Kinoshita K. Histopathological study of the spreading neoplastic cells in cervical glands and surface epithelia in cervical intra-epithelial neoplasia and microinvasive squamous cell carcinoma: Ki-67 immunostaining is a useful marker for pathological diagnosis from the gland involvement site. *Pathol Int* 2006; 56(8):428-433.

(68) Sherman ME, Wang SS, Tarone R, Rich L, Schiffman M. Histopathologic extent of cervical intraepithelial neoplasia 3 lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance low-grade squamous intraepithelial lesion triage study: implications for subject safety and lead-time bias. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(4):372-379.

(69) Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(5):397-402.

(70) Boonstra H, Aalders JG, Koudstaal J, Oosterhuis JW, Janssens J. Minimum extension and appropriate topographic position of tissue destruction for treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1990; 75(2):227-231.

(71) Kietpeerakool C, Khunamornpong S, Srisomboon J, Siriaunkgul S, Suprasert P. Cervical intraepithelial neoplasia II-III with endocervical cone margin involvement after cervical loop conization: is there any predictor for residual disease? *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33(5):660-664.

(72) Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005; 19(4):545-561.

(73) Fadare O, Yi X, Liang SX, Ma Y, Zheng W. Variations of mitotic index in normal and dysplastic squamous epithelium of the uterine cervix as a function of endometrial maturation. *Mod Pathol* 2007; 20(9):1000-1008.

(74) Popiolek D, Ventura K, Mittal K. Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions based on quantitative analysis of proliferative activity. *Oncol Rep* 2004; 11(3):687-691.

(75) Payne S, Kernohan NM, Walker F. Proliferation in the normal cervix and in preinvasive cervical lesions. *J Clin Pathol* 1996; 49(8):667-671.

(76) Van Leeuwen AM, Pieters WJ, Hollema H, Burger MP. Atypical mitotic figures and the mitotic index in cervical intraepithelial neoplasia. *Virchows Arch* 1995; 427(2):139-144.

(77) Malpica A, Matisic JP, Niekirk DV, Crum CP, Staerke GA, Yamal JM et al. Kappa statistics to measure interrater and intrarater agreement for 1790 cervical biopsy specimens among twelve pathologists: qualitative histopathologic analysis and methodologic issues. *Gynecol Oncol* 2005; 99(3 Suppl 1):S38-S52.

(78) Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001; 285(11):1500-1505.

(79) Creagh T, Bridger JE, Kupek E, Fish DE, Martin-Bates E, Wilkins MJ. Pathologist variation in reporting cervical borderline epithelial abnormalities and cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1995; 48(1):59-60.

(80) Panjkovic M, Ivkovic-Kapicl T. [Angiogenesis in squamous precancerous cervical lesions]. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(1):7-11.

(81) Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Lee MC, Park CS. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in progression of cervical neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 2002; 24(2):103-113.

(82) Triratanachat S, Niruthisard S, Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(2):575-580.

(83) Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod Pathol* 2004; 17(11):1314-1322.

(84) Oncins R, Fuente C, Najar M. [Descriptive study of cervical intraepithelial neoplasia grade III (CIN III) cases in the area of the hospital of Barbastro]. *Aten Primaria* 2001; 28(7):457-462.

CAPÍTULO XI

ANEXOS

11.1 Hoja de recogida de datos

Nº Historia	
Nº Registro cono	
Edad	
Diagnóstico cono	
Tamaño cono	
Nº cortes cono	
Grosor promedio cortes	
Longitud de CIN en cada corte	
Suma total longitudes	
Área afectada por CIN	
Longitud máxima CIN	
Afectación intraglandular	
Profundidad máxima intraglandular	
Nº mitosis totales	
Mitosis por mm (mitosis totales/suma total long.)	
Papilas intravasculares	
Resultado HIS. VPH	

