

# GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN CIN I

*Caterina Cortés Alaguero*

Ciencias y Letras





# **GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN CIN I**

*Caterina Cortés Alaguero*



**Editorial Área de Innovación y Desarrollo,S.L.**

Quedan todos los derechos reservados. Esta publicación no puede ser reproducida, distribuida, comunicada públicamente o utilizada, total o parcialmente, sin previa autorización.

© del texto: **los autores**

ÁREA DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO, S.L.

C/ Els Alzamora, 17 - 03802 - ALCOY (ALICANTE) [info@3ciencias.com](mailto:info@3ciencias.com)

Primera edición: **mayo 2017**

ISBN: **978-84-948690-7-5**

DOI: <http://dx.doi.org/10.17993/CcyLl.2018.20>

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.1. Epidemiología del VPH .....	10
1.2. La infección por el VPH.....	11
1.2.1. Organización genómica .....	11
1.2.2. Clasificación de los VPH: tipos, subtipos y variantes .....	12
1.2.3. Ciclo viral .....	13
1.2.4. Respuesta inmunitaria .....	15
1.2.5. Cofactores en la carcinogénesis cervical relacionados con la infección por el VPH .....	17
1.3. Diagnóstico Molecular de la infección por VPH .....	18
1.4. Uso de las técnicas de detección del ADN del VPH .....	21
1.4.1. Cribado mediante detección del VPH.....	22
1.4.2. Test de VPH para resultados ambiguos en la citología (ASCUS) y lesiones de bajo grado (LSIL .....	23
1.4.3. Test de VPH para seguimiento tras el tratamiento de lesiones cervicales .....	24
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo principal .....	27
2.2. Objetivos secundarios .....	27
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1. Localización del estudio.....	29
3.2. Procedimiento en consulta.....	29
3.3. Población de estudio .....	29
3.3.1. Criterios de inclusión.....	29
3.3.2. Criterios de exclusión .....	30
3.4. Técnicas diagnósticas: citología, colposcopia y biopsia .....	30
3.5. Recogida de datos .....	30
3.5.1. Variables recogidas y definición de términos empleados .....	31
3.6. Técnica de biología molecular .....	32
3.6.1. Procedimiento .....	33
3.6.2. Interpretación de los resultados .....	38
3.7. Recogida y análisis estadístico de los datos.....	40
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1. Descripción de la población .....	41
4.2. Genotipado del VPH .....	41
4.2.1. Porcentaje de virus.....	43
4.2.2. Porcentaje de virus de alto riesgo más frecuentes.....	44
4.2.3. Porcentaje de virus de bajo riesgo y adicionales.....	45
4.2.4. Edad y tipos de virus .....	46
4.2.5. Colposcopia y tipos virales .....	46
4.2.6. Afectación cervical y tipos virales .....	46
4.2.7. Citología y tipos virales.....	47
4.3. Regresión de CIN I en función del tipo de VPH.....	47

4.4. Detección CIN III .....	49
4.4.1. Relación entre la detección de CIN III y los genotipos de VPH.....	49
4.5. Tratamiento de las lesiones.....	51
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
5.1. Genotipo viral y regresión de la lesión .....	53
5.2. Detección de VPH. Infecciones simples y múltiples .....	55
5.3. Método utilizado para la detección viral .....	57
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación filogenética y epidemiológica de los VPH.....	13
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de virus de alto riesgo. ....	44
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de virus de BR más frecuentes.....	45
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de virus adicionales. ....	45
<b>Tabla 5.</b> Relación entre la regresión y los diferentes tipos de VPH .....	47
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de CIN I que regresa en relación con el tipo de VPH en las lesiones producidas por un único tipo viral.....	47
<b>Tabla 7.</b> Regresión espontánea de CIN I según los diferentes tipos virales.....	48
<b>Tabla 8.</b> Regresión espontánea de CIN I según los tipos virales de AR (I). ....	48
<b>Tabla 9.</b> Regresión espontánea de CIN I según los tipos virales de AR (II) .....	49
<b>Tabla 10.</b> Regresión espontánea de CIN I diferenciando las infecciones producidas por los virus 16 y/o 18 y el resto de virus alto riesgo.....	49
<b>Tabla 11.</b> Relación entre detección de CIN III y presencia de VPH.....	49
<b>Tabla 12.</b> Detección de CIN III según los diferentes genotipos virales de AR (I) .....	50
<b>Tabla 13.</b> Detección de CIN III según los diferentes tipos virales de AR (II).....	50
<b>Tabla 14.</b> Detección de CIN III diferenciando las infecciones producidas por los virus 16 y/o 18 y el resto de virus AR .....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalencia acumulada de los VPH más frecuentes en los cánceres de cérvix.....	11
<b>Figura 2.</b> Microscopía electrónica del VPH .....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura VPH 16 .....	13
<b>Figura 4.</b> Oncogénesis por el VPH .....	14
<b>Figura 5.</b> Mecanismos teóricos de la carcinogénesis cervical por VPH .....	15
<b>Figura 6.</b> Termociclador ( C1000 Thermal Cycler, BIO-RAD) .....	35

<b>Figura 7.</b> kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra .....	36
<b>Figura 8.</b> Auto-LiPA .....	37
<b>Figura 9.</b> Bandeja y tiras de hibridación.....	38
<b>Figura 10.</b> Plantilla con la posición de las diferentes sondas de oligonucleótidos que corresponden a un genotipo viral en la tira de hibridación reversa. Esta plantilla se coloca sobre cada tira para conocer el genotipo.....	39
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de VPH presente en las muestras.....	42
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de VPH de AR y BR presentes en las muestras.....	42
<b>Figura 13.</b> Esquema del porcentaje de VPH identificados en las muestras .....	43
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de VPH identificados por paciente .....	43
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de VPH implicados en la infección, diferenciando VPH 16 y 18, de otros virus de AR, BR y ausencia de VPH.....	45
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de genotipos más frecuentes .....	46
<b>Figura 17.</b> Necesidad de tratamiento según el tipo de VPH.....	51





# 1. INTRODUCCIÓN

La neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y el cáncer de cuello uterino representan uno de los principales problemas de salud pública que demanda una intervención prioritaria debido a sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. De manera general, el mayor número de casos diagnosticados de cáncer de cérvix, se encuentra entre los 35 y 45 años, y sólo el 10% se detectan en las mujeres mayores de 65 años (1). En España, en las mujeres entre los 15 y 44 años es el segundo cáncer en frecuencia, por lo que afecta sobre todo a mujeres jóvenes en edad reproductiva (2). Las consecuencias derivadas del tratamiento, no sólo afectan a su calidad de vida y a su reproducción, sino que es una neoplasia con una elevada tasa de años potencialmente perdidos en la mujer (3).

Los datos obtenidos en las numerosas investigaciones realizadas hasta ahora, ponen de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre la aparición de alteraciones de diverso grado de malignidad en el tracto genital femenino y la presencia y persistencia del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico.

Desde hace casi 30 años ya se sugirió por el profesor Harald Zur Hausen que algunos tipos de virus del papiloma humano eran los agentes causales del cáncer de cérvix uterino (4). Varios años después Della Torre (5) demostró con el microscopio electrónico la presencia de partículas virales del VPH en las infecciones subclínicas y en las neoplasias de cérvix. Esta asociación se considera como uno de los descubrimientos más importantes en la investigación sobre la etiología de un cáncer en humanos realizada en las últimas décadas. El carcinoma de cérvix es el primer cáncer en el que se ha identificado la existencia de una única causa obligatoria, la infección por VPH (6). En estos tumores, se identifica ADN del VPH entre el 90 y el 100% de los casos, este porcentaje ha ido en aumento a medida que se han desarrollado más y mejores técnicas de biología molecular (7). El cáncer de cérvix, tanto escamoso como glandular, resulta de una infección no resuelta por determinados genotipos del virus del papiloma humano (8). Otros cánceres como el de vulva, vagina, pene y ano, los cánceres de orofaringe, las verrugas anogenitales y la papilomatosis respiratoria recurrente, también están producidos por el VPH (9). El modelo de carcinogénesis cervical se basa en la persistencia de la infección por VPH como elemento necesario para el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer.

El 80% de las mujeres se infectan a lo largo de su vida por uno o varios tipos de VPH (10). Alrededor del 90% de las infecciones, son benignas, transitorias y se resuelven espontáneamente en el plazo de 6 a 24 meses con la intervención adecuada del sistema inmune, aunque en algunos casos pueden pasar a un estado de latencia por un largo período de tiempo, siendo este grupo quienes presentan mayor riesgo de desarrollar lesiones del tracto anogenital (11). Durante el estudio de una mujer, cuando aparece un tipo de VPH por primera vez, no se puede saber si la infección

es de reciente adquisición, o si es una infección latente o una reinfección (12). Esta infección se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo, el virus está ahí y puede ser detectado por técnicas específicas de biología molecular. Posteriormente la infección puede manifestarse por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasia) detectados en citologías o biopsias del tejido afectado. En muy pocos casos, la infección progresa produciendo la aparición de tumores visibles (13). Por lo tanto, el cáncer es una consecuencia muy poco frecuente de la infección por VPH. Los eventos iniciales que conducen a la transformación maligna por virus oncogénicos no están del todo esclarecidos (14), pero se piensa que debe haber otros cofactores, tanto exógenos como endógenos, que junto con el VPH aumenten el riesgo de progresión de una lesión preneoplásica a cáncer (15).

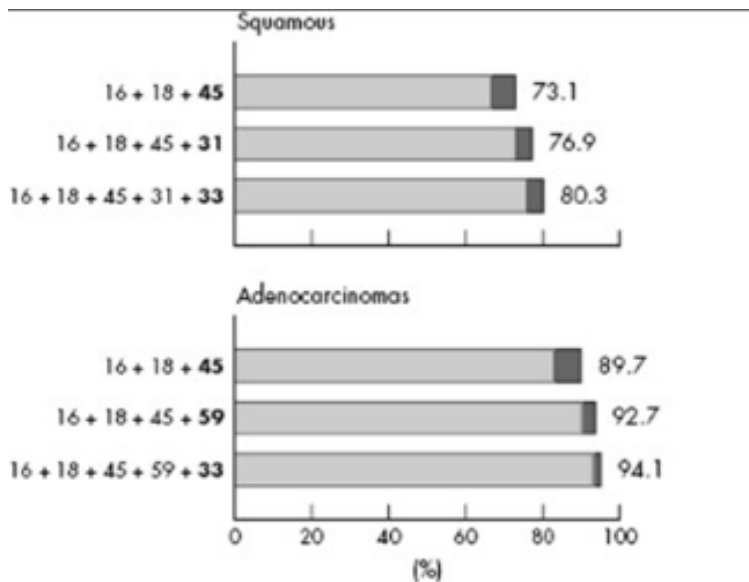
En los últimos 40 años, las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix han disminuido en la mayoría de países desarrollados. Esto se debe a la introducción y generalización de pruebas adecuadas de detección precoz, como son la citología de cérvix, la prueba de detección del VPH y la colposcopia. La fácil accesibilidad al cuello uterino, tanto a su inspección como a su estudio citocolposcópico e histológico, ha permitido el conocimiento extenso de la naturaleza de las lesiones intraepiteliales.

## **1.1. Epidemiología del VPH**

La mayoría de infecciones por el VPH son transitorias, pasando a ser no detectables al cabo de 1-2 años (16). Las infecciones producidas por virus de alto riesgo parecen persistir durante más tiempo que las producidas por tipos de bajo riesgo (17) y entre los de alto riesgo el que parece persistir más tiempo es el tipo 16 (18). Los genotipos virales encontrados en el 95% de casos de carcinoma escamoso de cérvix por orden decreciente son el 16, 18, 45, 31 y 33 y el resto de tipos filogenéticamente relacionados con el 16: 35, 52 y 58 (19). Solamente el 16 lo encontramos en el 50% de los casos, el 18 en el 14%, el 45 en 8% y el 31 en el 5% (20). En el adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso, la prevalencia encontrada del VPH es algo menor, del 76,4% (21). Los tipos virales más frecuentes son el 16, 18, 45, 59 y 33 y el resto de tipos filogenéticamente relacionados con éste 39 y 68. Esta especificidad no se sabe porque se produce. Los cánceres producidos por VPH 45 tienen un corto período de presentación, con o sin producción de lesión preinvasiva. Este tipo viral es muy raro encontrarlo en mujeres con citología negativa o en lesiones de bajo grado (0,4% y 3,7%, respectivamente), al contrario de lo que ocurre con el VPH tipo 16 (2,5% y 20%, respectivamente) (22) (Fig. 1).

Respecto a la incidencia, es decir, el número de nuevas infecciones por VPH que se presentan en una población susceptible a lo largo del tiempo, apenas existen estudios de seguimiento que permitan estimarla. Aproximadamente el 5-15% de mujeres VPH negativas se infectan cada año (23), la mayoría se producen en mujeres

jóvenes, pero la duración de la infección es similar entre mujeres jóvenes y mayores. Las tasas de incidencia son generalmente más altas para los virus de alto riesgo que para los de bajo riesgo (24). Los VPH de alto riesgo más frecuente son el 16, 18, 31, 33 y 51, pero sobretodo el 16. La coinfección por múltiples tipos y la infección secuencial por tipos nuevos es común (16).



**Figura 1.** Prevalencia acumulada de los VPH más frecuentes en los cánceres de cérvix.

**Fuente:** IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (25).

## 1.2. La infección por el VPH

### 1.2.1. Organización genómica

Los papilomavirus humanos pertenecen a la familia Papilomaviridae, son virus pequeños de 50nm de diámetro. Presentan una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (Fig. 2). Su ADN es circular, de doble cadena, de 8.000 pares de bases. Su estructura es compartida por los más de 100 tipos secuenciados. Consta de tres zonas: una región de control, denominada “long control region” (LCR), 8 genes de expresión temprana o E= early (E1-E8), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral, y 2 genes de expresión tardía o L=late (L1, L2) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside. Los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta peculiaridad convertirá a estos genes, especialmente a L1, en la diana principal de la detección de ADNs virales por métodos “consenso” al contrario de la detección “tipo específica” que utilizará genes de expresión temprana con alta variabilidad intertipo como E6 y E7 (Fig. 3) (26, 27).

### 1.2.2. Clasificación de los VPH: tipos, subtipos y variantes

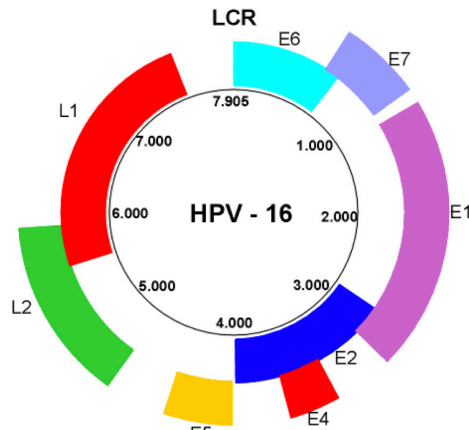
Históricamente, los VPH han sido agrupados junto con los polyomavirus, formando la familia Papovaviridae, pero desde el 2004 se consideran como subfamilias individuales. La familia Papilomaviridae está formada por más de 200 tipos virales de los cuales por lo menos 118 tipos se han aislado y caracterizado mediante la secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la región L1 del genoma viral, región bien conservada en todos los papilomavirus (28). Se define un nuevo tipo de VPH cuando la secuencia del gen L1 es diferente por lo menos en el 10% respecto al resto de los tipos virales. Cuando existe una diferencia en la región L1 entre el 2-10% en algún tipo de VPH ya conocido, se trata entonces de un subtipo. Las variantes de un tipo específico de VPH difieren en por lo menos el 2% del tipo viral aislado originalmente. Por ejemplo, del tipo 16 se conocen cuatro variantes: la E (Europea), Asi (Asiática), AA (Asiática-Americana) y Af (Africana). En la nueva taxonomía de los papilomavirus humanos, la alta relación filogenética entre los tipos de VPH se denomina “género”: alfa-papilomavirus (en el que se incluyen el VPH 16 y 18), beta-papilomavirus y gamma-papilomavirus. La menor relación filogenética comprende la “especie”, por ejemplo el género alfa-papilomavirus incluye 15 especies: en la especie 7 se ubica el VPH 18 y en la especie 9 el VPH 16. La clasificación biológica que indica la afinidad de los papillomavirus humanos por un tejido en particular comprende: los cutaneotróficos, que producen las verrugas cutáneas y plantares, y los mucosotróficos que afectan a las mucosas ano-genital y aerodigestiva (29). Estos últimos son clasificados también según su riesgo oncogénico en tipos de bajo riesgo (VPH-BR), probable alto riesgo (VPH-pAR) y de alto riesgo (VPH-AR). Un total de 12 virus se clasifican como de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108), tres como probable alto riesgo (26, 53 y 66) y 15 como de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) (20) (Tabla 1).

Los VPH 16 y 18 (30) se han relacionado como agentes causales del 70% de los cánceres escamosos de cérvix, junto con el resto de VPH-AR llegan a producir el 99,7% de todos los carcinomas de cérvix (18).



**Figura 2.** Microscopia electrónica del VPH.

**Fuente:** <http://ccr.cancer.gov/> National Cancer Institute



**Figura 3.** Estructura VPH 16.

**Fuente:** www.nih.gov/ National Institutes of Health.

**Tabla 1.** Clasificación filogenética y epidemiológica de los VPH.

Clasificación filogenética	Clasificación Epidemiológica	
	<i>Alto riesgo</i>	<i>Bajo riesgo</i>
<i>Alto riesgo</i>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26, 53,66	70
<i>Bajo riesgo</i>	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108

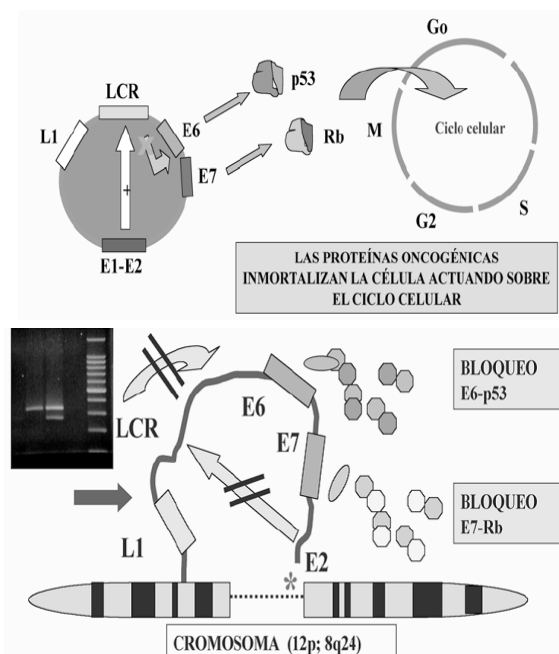
**Fuente:** Muñoz N. et al. 2003. *N Engl J Med.*; 348(6):518-27. (20).

### 1.2.3. Ciclo viral

Las oncoproteínas de los VPH de alto riesgo oncogénico modulan la función de una variedad de proteínas celulares involucradas en el control del ciclo celular y la replicación del genoma celular. Durante este proceso los puntos de control más importantes son bloqueados funcionalmente por estas oncoproteínas virales. La expresión continuada de sus oncogenes a través del tiempo puede conferirle a la célula infectada capacidad fenotípica maligna. Esto explicaría, por tanto, el riesgo elevado de desarrollar una lesión neoplásica cervical como resultado de la infección persistente por VPH AR. Sin embargo, el VPH no es suficiente para causar el desarrollo de la enfermedad invasora y metastásica, es necesaria la implicación de otros factores de tipo ambiental, relacionados con el virus e inclusive inherentes al mismo huésped (31).

Las proteínas E6 y E7 son las principales oncoproteínas de los VPH. Estas son capaces de unirse a la p53 y pRb, respectivamente, inhibirlas funcionalmente e inducir su degradación rápida por la vía de la ubiquitina-proteosoma. Además producen la

expresión de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, denominada TERT (telomerase reverse transcriptase), la cual promueve la inmortalidad celular (32). Esta interacción con células proliferativas, como son las del cuello uterino y especialmente las de la zona de la unión escamo-cilíndrica que es un epitelio inestable, impiden la correcta reparación del ADN, conducen a una inestabilidad genómica y aumentan la probabilidad de desarrollar mutaciones específicas, esenciales para la progresión a cáncer invasor. Además hay lesiones malignas en las que el virus no está integrado en el genoma celular sugiriendo la presencia de mecanismos oncogénicos múltiples (33), (Fig.4).



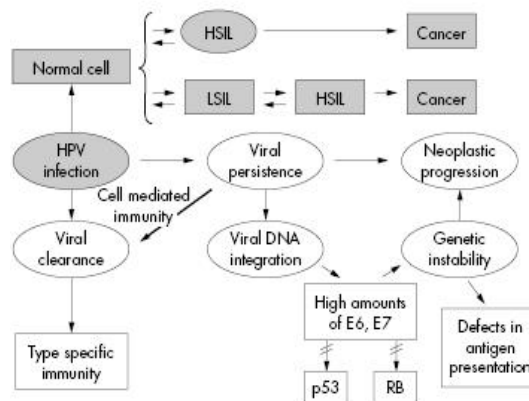
**Figura 4.** Oncogénesis por el VPH.

**Fuente:** Puig-Tintoré LM.,Alba A., et al.(2002). Madrid: Meditex-Sanex. (34).

El ciclo de replicación del VPH se inicia cuando durante la actividad sexual, se crean microtraumas del epitelio genital, sobre todo de la zona de transformación, permitiendo la exposición de las células basales en activa proliferación a los diferentes tipos de VPH (31). Se produce la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1. Los virus localizados en este estrato basal pueden permanecer en forma extracromosómica (episomal) no integrados, manteniendo la replicación de su ADN en un número de copias bajo (35). Si la infección adopta un curso subclínico o latente, es muy probable que se trate de una infección por un tipo viral de bajo riesgo oncogénico que será dominada por la respuesta rápida de la inmunidad celular, desapareciendo espontáneamente sin provocar ningún tipo de evidencia clínica ni citológica (13).

Cuando se produce la integración del ADN viral en el genoma del huésped, la capacidad de regulación represora de E1 y E2 sobre E6 y E7 se pierde, por lo que pE6 y pE7 se sobreexpresan de forma continuada, lo cual es necesario para los procesos de proliferación-inmortalización celular (30).

La evolución del cáncer invasivo de cuello uterino es una complicación rara de la infección viral que ocurre después de un largo período de persistencia viral. El bloqueo funcional de la pRb y p53, junto a otros muchos reguladores del ciclo celular, conducen a la inestabilidad genética por acumulo de aberraciones en los cromosomas celulares constituyendo el inicio del proceso multifactorial de la carcinogénesis cervical (27). Al quedar sin efecto el sistema de reparación de errores en las secuencias de ADN, la célula precancerosa es incapaz de eliminar el virus y también se ve imposibilitada para corregir los errores intrínsecos acaecidos. De este modo va acumulando alteraciones genéticas, a lo que se suma la condición de que esta célula no puede “morir”, convirtiéndose en una célula “inmortalizada” con ADN en progresiva decadencia, un ente neoplásico con capacidad invasora y metastásica (36) (Fig. 5).



**Figura 5.** Mecanismos teóricos de la carcinogénesis cervical por VPH.

**Fuente:** Bosch FX, et al. (2002). J Clin Pathol. 55(4):244-65. (8).

#### 1.2.4. Respuesta inmunitaria

La inmunidad del huésped está formada por dos mecanismos básicos de defensa: la inmunidad innata y la adaptativa. La inmunidad innata representa una respuesta inicial inespecífica frente a la mayoría de patógenos desconocidos o que no han generado un contacto suficiente como para desencadenar una respuesta adaptativa. Es la reacción natural ante cualquier agresión que atrae a fagocitos (neutrófilos, células dendríticas, macrófagos) y células NK (natural killer). En función de la magnitud del daño celular, la naturaleza del antígeno y el tipo de respuesta efectora a inducir, la inmunidad innata activa mediante las células dendríticas los mecanismos

de inmunidad adaptativa. El sistema adaptativo se caracteriza por la especificidad de protección y de memoria, mediada fundamentalmente por linfocitos T o anticuerpos. Estos suponen la línea de defensa inicial y se produce localmente o acceden a la zona agredida por el aumento de la permeabilidad capilar, provocada por la reacción inflamatoria (35).

La respuesta inmunitaria frente a la infección por VPH viene definida por las peculiares características biológicas del virus y del entorno en el que se desarrolla su tropismo. El tracto genital inferior, en especial el epitelio cervical, tiene varias vías de defensa primaria, por tratarse de un epitelio expuesto a la entrada de multitud de patógenos. La primera vía de defensa la constituye la propia integridad del epitelio, que favorece la eliminación de las partículas virales por los procesos normales de descamación. Pero hay casos en los que el VPH logra alcanzar las capas basales, pudiendo ser eliminado a este nivel por mecanismos de inmunidad inespecífica mediados por elementos como interferón o células NK y así se evita la entrada de las partículas virales en la célula (27). La aparición de una infección persistente por el VPH demuestra que el sistema innato es muchas veces sorteado (37). La ausencia de esta respuesta inespecífica, que supone la internalización de la partícula viral dentro de la célula basal, da lugar a la infección por VPH. Una vez el virus se afianza en su huésped comenzara una relación con este que desembocara en la muerte de la célula infectada, o en la inmortalización de esa célula que, en presencia de condiciones favorables intrínsecas y/o extrínsecas, se podrá convertir en una célula tumoral (38). Los mecanismos que utiliza la célula infectada para protegerse son de dos tipos básicamente: uno dependiente de la propia fisiología celular y otro de la inmunidad específica celular. En ocasiones, cuando una célula infectada comienza su proceso de replicación los mecanismos de control del ciclo celular detectan un ADN extraño y promueven la muerte celular programada con todo el contenido viral. Los mecanismos de defensa basados en la inmunidad celular específica requieren la identificación de proteínas virales, que actuaran como antígenos, y el desarrollo de una respuesta citotóxica contra las células que lo porten en su interior. Los VPH de alto riesgo tienen la cualidad de bloquear ambos mecanismo de defensa. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo pueden unirse y bloquear, respectivamente, las proteínas p53 y Rb del ciclo celular como se ha comentado anteriormente (32). La disfunción que genera este bloqueo se traduce en la incapacidad de la célula para poner en marcha la apoptosis, con lo que aparecen células inmortalizadas sin capacidad de defenderse no solo de la infección presente sino de los propios errores genéticos intrínsecos de la replicación y maduración celular. La célula queda, de este modo, en un estado susceptible a la transformación tumoral (39). Por otro lado, los VPH de alto riesgo utilizan complejos mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria específica celular, encargada de eliminar las células infectadas, así como la respuesta humoral responsable de proteger frente a nuevos contactos mediante generación de anticuerpos y células de memoria. Las características del epitelio cervical hacen que su “excesiva estanqueidad” impida, en muchas ocasiones, la



presentación de las partículas virales en el entorno de los ganglios linfáticos, donde se genera la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. El VPH es un auténtico especialista en la evasión del control por el sistema inmunitario (202,203). En los casos en los que se logra seroconversión, es decir, desarrollar una respuesta humoral mediada por anticuerpos, los títulos medios observados tras la infección natural pueden ser insuficientes para evitar la reinfección por ese mismo tipo viral, además de ser inútiles para impedir la infección por otros genotipos diferentes del VPH (40).

### *1.2.5. Cofactores en la carcinogénesis cervical relacionados con la infección por el VPH*

La asociación observada entre VPH y cáncer de cérvix está entre las más consistentes de las identificadas hasta el momento, hay consenso en calificarla como causa necesaria, pero insuficiente, ya que no todas las infecciones por VPH persisten o progresan a carcinoma de cérvix (7).

Persistencia, desde el punto de vista clínico, se puede definir como la detección del mismo tipo viral dos o más veces en un periodo de tiempo. No hay consenso respecto al tiempo que es necesario, se ha descrito hasta un año (13). La presencia continua de un VPH-AR, es necesaria para el desarrollo, mantenimiento y progresión de las lesiones preneoplásicas de cérvix a cáncer de cérvix (11,41). El tiempo medio observado hasta la regresión de infecciones prevalentes oscila desde 4-6 meses hasta 1-2 años en distintos estudios, dependiendo de las estrategias de seguimiento y de las definiciones. Aunque el tiempo hasta la regresión puede variar de un estudio a otro, casi todos los resultados muestran que en aproximadamente el 90% de las mujeres se observa regresión de un tipo específico del VPH después de dos años de seguimiento (37).

Respecto al **genotipo viral**, las infecciones producidas por virus oncogénicos persisten más tiempo que los no oncogénicos con un promedio de 13 y 8 meses respectivamente (17). Sobre todo los tipos VPH 16 y 18 tienen mayor riesgo de progresión (18) especialmente a partir de los 30 años (42). La duración media de estos dos genotipos tiende a ser más larga aún, por períodos de entre 16 a 24 meses (17). En lo que respecta a la progresión de una infección producida por los tipos 16 y 18 el porcentaje también es mayor que el observado en otros tipos virales. Las infecciones por el VPH tipo 16 progresan a CIN III en un 17,2%, y los VPH 18 lo hacen en un 13,6%, mientras que las infecciones por otros tipos virales de alto riesgo progresan en un 3% (43). Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Khan (42). Las mujeres negativas para VPH progresan a CIN III en un 0,8% (44). La transmisión también es mayor en el caso de los tipos de alto riesgo, especialmente el VPH 16.

La utilidad de la medida de la **carga viral** como factor pronóstico se está debatiendo, hay afirmaciones muy dispares en lo que respecta a su valor clínico. Varios estudios

epidemiológicos han demostrado una asociación entre la carga viral y el aumento de riesgo de cáncer de cérvix, como el de Ordi (45), a mayor carga viral > 100 URL mayor riesgo de progresión a CIN y cáncer. En el estudio de Gravitt (46) se observa que sólo la alta carga viral del VPH tipo 16 predice el desarrollo de una lesión preneoplásica de alto grado. En el trabajo de Carcopino (47) no se encuentra mayor riesgo de progresión a una lesión de alto grado. Pero estos estudios resultan insuficientes. Por lo que la presencia de una baja carga viral no debe considerarse excluyente de lesión grave. Además en las lesiones preneoplásicas leves adquiridas recientemente también se detecta una alta carga viral y lo mismo ocurre con las verrugas genitales (6).

La **integración del ADN viral** en el ADN del huésped parece ser crucial en la transformación maligna (30). Sin embargo, existe un porcentaje de lesiones tumorales en las que o no se ha demostrado integración o bien coexisten las formas episomal e integrada. En el estudio de Hudelist se describe la capacidad del VPH16 de inducir transformación maligna sin integrarse (48).

Es discutible si la **coinfeción** aumenta el riesgo de progresión o afecta la persistencia de un tipo viral (37). Las infecciones por múltiples tipos virales se han observado más frecuentemente en mujeres jóvenes (49). En las lesiones CIN I (en citología) en el 63,1% de los casos y en el 80,8% de CIN $\geq$  II (en citología) (50) se han detectado múltiples tipos virales. Los VPH más frecuentes en los diferentes grados de CIN fueron 16, 31 y 52 (50). En el estudio de Moscicki (37) se observó que el 20-30% de las mujeres con cualquier grado de patología cervical presentaban infección por múltiples tipos virales. En el estudio de Trottier (51), realizado en 2.462 mujeres se observa un aumento del riesgo de cáncer cervical en las infecciones múltiples, el cual va aumentando con el número de VPH. Este mismo resultado se obtiene en el estudio de Chaturvedi (52), y Dal Bello (50). Sin embargo en otros muchos trabajos no se observa esta relación (8,49,53). La persistencia del ADN del VPH es el verdadero precursor de las lesiones preneoplásicas cervicales, que es independiente de la coinfección por varios tipos virales (53). Según Moscicki (37) el cáncer cervical suele ser un evento monoclonal asociado a un solo tipo de VPH, pudiendo estar el epitelio circundante infectado por otros tipos virales.

### **1.3. Diagnóstico Molecular de la infección por VPH**

Las técnicas de biología molecular se emplean para detectar la presencia de VPH, diagnosticar las lesiones neoplásicas intraepiteliales, y algunas pueden determinar el genotipo y la carga viral. Se basan en la detección específica de secuencias de ADN del VPH en el material a estudiar o en la visualización de señales químicas amplificadas.

Básicamente estas técnicas consisten en enfrentar el ADN de la muestra a una sonda cuya secuencia es complementaria de la secuencia de ADN que intentamos detectar.

Una secuencia de ADN solamente hibrida con otro ADN o ARN si el 100% de las bases son complementarias a una determinada temperatura.

Los métodos utilizados en el diagnóstico molecular del VPH muestran una gran variabilidad entre ellos en cuanto a sensibilidad y especificidad (54). Los resultados moleculares dependen de multitud de factores, como son la calidad de la toma, el tipo de muestra, la forma de conservación, como se extraiga y purifique el ADN, la selección de la técnica molecular, los reactivos utilizados y la lectura e interpretación de los resultados (55).

El modo de detección de estos híbridos, la composición de las sondas de ADN y la existencia o no de amplificación de la señal marcarán las diferencias entre las diferentes técnicas.

Existen varios métodos de detección de ADN de VPH: captura híbrida, PCR consenso, PCR específica, amplificación enzimática isotérmica, hibridación inversa en fase sólida, amplificación del ARNm de los oncogenes E6/E7. Los análisis más utilizados actualmente son: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se realiza la amplificación de la secuencia y el sistema de captura de híbridos (HC), que produce la amplificación de la señal (56).

Los primeros test aprobados por la FDA (Federal Drug Administration) fueron:

- Captura de híbridos II (CH-II)
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### **Captura Híbrida (HC II)**

La captura de híbridos II fue el primer test aprobado por la FDA en el año 2003. Está disponible comercialmente por Digene Corporation (Bethesda-USA). Realiza la hibridación del ADN del VPH con sondas ARN específicas, captura el híbrido con anticuerpos específicos marcados con sustancias luminiscentes produciéndose una señal amplificada. Contiene 13 sondas para virus de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 para virus de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44), pero no permite distinguir entre los diferentes tipos virales ni la presencia de infecciones múltiples. Presenta una sensibilidad cercana a la reacción en cadena de la polimerasa (57).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Consiste en multiplicar el número de copias de un segmento de ADN viral si está presente en la muestra. Este proceso, que se conoce como amplificación, hace que sea una técnica muy sensible capaz de detectar el ADN del virus, aunque solo se encuentren unas pocas copias o aunque solo estén presentes en una sola célula entre miles. Además se puede utilizar con muestras almacenadas en parafina (58). Uno de los inconvenientes de la técnica es que detecta pacientes con infecciones

no progresivas y mujeres con infección latente sin alteraciones citológicas, cuya evolución desconocemos, pero probablemente se resuelvan en gran parte de forma espontánea. Otro de sus problemas es la elevada posibilidad de contaminación.

La PCR utiliza pequeñas sondas de ADN que se denominan cebadores o “primers”, los cuales localizan específicamente secuencias de ADN viral. Tras una serie de reacciones de desnaturalización y copia de esa región de ADN se va a producir la amplificación en cadena de la región de interés que luego puede ser visualizada por diferentes técnicas. En este método se combinan por una parte la especificidad de la unión de los dos “primers” y por otra parte la sensibilidad que resulta del proceso de amplificación.

El método más utilizado es la “PCR consenso”, en la cual se amplifica una región con secuencia muy similar entre todos los VPHs para, posteriormente, por métodos de hibridación específica, enzimáticos o de secuenciación de ADN, realizar el genotipado específico del virus. El primer cebador que se popularizó fue el que usa como diana de amplificación la región común L1, utilizando los “primers” MY09 y MY11. El amplificado generado es de aproximadamente 450 pares de bases. Después se han diseñado variantes como PGMY09/11, GP5/GP6 o su variante P5+/GP6+, SPF10...a menor región para amplificar, mayor es la sensibilidad para detectar la presencia del VPH (59).

Este último cebador, el SPF10 amplifica una región muy pequeña de la región L1, de 65 pb, común a los diferentes VPHs. Esto le confiere una gran sensibilidad especialmente para ADNs archivados en parafina o muy degradados, por lo que su uso ha cobrado especial importancia en los estudios retrospectivos (60). Se realiza la PCR consenso, marcando los productos con biotina durante el proceso de amplificación. Los productos obtenidos se hibridan con sondas específicas en placa o en tira. En el caso en el que se utilicen tiras que son de nitrocelulosa, se enfrenta el producto desnaturalizado previamente en condiciones alcalinas, a una tira reactiva que contiene múltiples tipos de ADN viral fijados. Una vez revelado, mediante colorimetría, se obtiene una distribución en bandas que se puede comparar con un patrón establecido y así determinar el tipo o tipos virales presentes. Comercialmente este sistema está comercializado por Innogenetics (INNO-LiPA HPV TM) y Roche Diagnostics (Linear Array Genotyping HPV Test TM). El SPF10-HPV-INNO-LiPA es altamente sensible y específico. En conclusión, es un método simple, rápido y fácilmente reproducible para detectar y genotipar las infecciones por VPH (61).

Permite la identificación simultánea de 28 genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, 73, 82), de probable alto riesgo (26, 53, 66) y de bajo riesgo (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70, 71, 74) y si hay una infección múltiple. Además presenta mayor sensibilidad para detectar la presencia de infección por VPH comparándolo con otros métodos, ya que el fragmento amplificado es menor, de

sólo 65 pb. Su sensibilidad es especialmente alta para los tipos 16, 31, 35,45 y 52, y en la detección de infecciones múltiples en una misma paciente (62).

Si comparamos los dos métodos descritos, la captura de híbridos y la reacción en cadena de la polimerasa la concordancia en los resultados para la identificación del VPH entre ambos es alta (63, 64). En ambas pruebas la sensibilidad para la detección del VPH es independiente de la edad, alcanzado valores del 90%. Además son más sensibles que la citología convencional o la líquida (65). Pero su especificidad en mujeres jóvenes es baja debido a la alta prevalencia de las infecciones transitorias en estas edades (66).

#### **1.4. Uso de las técnicas de detección del ADN del VPH**

La detección de ADN de VPH de alto riesgo se considera potencialmente útil en tres aplicaciones clínicas: como prueba de cribado primario, de selección de mujeres con resultados ambiguos o lesiones citológicas de naturaleza menor que necesitan derivarse para diagnóstico y tratamiento, y por último, como prueba de seguimiento para mujeres tratadas por lesiones intraepiteliales de alto grado (66).

Hoy en día disponemos de diferentes guías de actuación, tanto a nivel mundial, como de subcontinentes o continentes, según países, comunidades... por ejemplo: la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), la FDA (Food and Drug Administration, Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos), la FLASOG (Federación Latinoamericana de Sociedades de Obstetricia y Ginecología), la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia), la SOGC (The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada), entre otros.

La FDA utiliza las técnicas de detección del ADN del VPH:

- en el cribado de mujeres de 30 años o mayores junto con la citología.
- en mujeres de cualquier edad con una citología de ASCUS para valorar la necesidad de remitirlas a colposcopia.

Las indicaciones de la SEGO son (67):

- test cribado primario (mujeres mayores de 30 años) junto con la citología.
- si la prueba de VPH da positiva y la citología normal, emplear el genotipado y si el resultado es positivo para 16 o 18 se remiten a colposcopia.
- mujeres mayores de 21 años con citología ASCUS/ AGC.
- mujeres mayores de 50 años con citología LSIL.
- seguimiento de mujeres con CIN I (por biopsia) seleccionadas tras colposcopia.

- control tras tratamiento.

### **1.4.1. Cribado mediante detección del VPH**

El modo de incorporación del test de ADN de VPH en el cribado continua siendo controvertido a pesar de la multitud de estudios realizados comparando esta técnica con la citología (66). La International Agency for Research on Cancer (IARC) ha confirmado que existe suficiente evidencia sobre la utilidad de la prueba de VPH para reducir la incidencia y la mortalidad por cáncer de cérvix (107). En un estudio publicado en el 2009 (69), realizado en un país en desarrollo, la incorporación del test de detección de ADN VPH en el cribado inicial produjo un impacto significativo y relevante en la reducción de la mortalidad por cáncer de cérvix escamoso en la población estudiada.

En varios estudios se ha demostrado que la detección de VPH-AR es significativamente más sensible que la citología cervical para identificar a mujeres con lesiones CIN II o mayores (66,70-71), sobre todo cuando se realiza en mujeres de 30 años o más ya que por debajo de esta edad, la mayoría de personas presentan infecciones transitorias por VPH (72). Respecto a la especificidad, la prueba del VPH es menos específica que la citología para mujeres jóvenes, pero a partir de los 30 años o más, las diferencias entre ambas pruebas son mínimas al haber desaparecido las infecciones virales irrelevantes que no llegan a producir cambios citológicos (73). Por lo que la utilización conjunta de la prueba de VPH y la citología en el cribado tiene su justificación en el elevado valor predictivo negativo (74). Las mujeres negativas para ambas pruebas tienen un riesgo inferior a 1 entre 1000 de estar afectadas por una lesión mayor que CIN II (75).

Respecto al genotipado en mujeres con citología normal es útil, ya que el tipo 16 de VPH está vinculado a un 22-26% de riesgo acumulado a 10 años de sufrir CIN 2 o más, el tipo 18 a un 17-19%, el VPH-31 a un 14,3% y el VPH-33 a un 14,9%, por lo que estas mujeres deberían ser remitidas a colposcopia (76). El resto de tipos de VPH de AR se asocian a un 3% de riesgo, donde se recomendaría repetir la prueba junto con una citología a los 12 meses (77) aunque hay estudios que no recomiendan su genotipado al ser causa de CIN 2-3, pero no de cáncer invasor. En las mujeres VPH negativas el porcentaje tiende a ser cero (42). No se deben utilizar test que detecten VPH de bajo riesgo, ya que estos no incrementan el riesgo de cáncer de cérvix pero si aumentan el gasto del cribado innecesariamente (78).

Se ha planteado alargar el tiempo en la periodicidad del cribado. Si al inicio es negativo se puede alargar cada 5-10 años ya que presenta un alto valor predictivo negativo (VPN), su interpretación es más objetiva y tiene un período de protección más largo comparado con la citología (69). Además es mucho más efectivo que la

citología y la colposcopia en predecir el riesgo de cáncer de cérvix y sus precursores (70). El uso del genotipado del VPH cada vez se está haciendo más importante, por la diferente implicación de los tipos de VPH en la patogénesis del cáncer cervical, para monitorizar la eficacia de las vacunas y en los estudios de epidemiología realizados en todo el mundo (79).

Como desventaja, presenta una menor especificidad sobre todo en las mujeres jóvenes, debido a la alta prevalencia de infecciones transitorias. Además las técnicas desarrolladas hoy en día únicamente permiten identificar la presencia de la infección y la carga viral, pero no el grado de persistencia u otros factores oncogénicos, los test no aportan suficiente información en la mayoría de los casos para predecir el riesgo individual de desarrollar lesiones malignas. Son necesarios implantar programas para no sobre tratar a las mujeres con resultados positivos para el ADN-VPH, en las que no se haya demostrado una infección persistente. Otras desventajas son la necesidad de un laboratorio con mayor infraestructura y que la técnica en si es cara (80).

#### ***1.4.2. Test de VPH para resultados ambiguos en la citología (ASCUS) y lesiones de bajo grado (LSIL)***

Existe controversia sobre el manejo más apropiado de las mujeres con un resultado ambiguo en la citología (ASCUS) y las que presentan una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL). Muchas de estas alteraciones citológicas desaparecen sin necesidad de tratamiento, pero algunas de ellas pueden constituir una lesión grave subyacente o en desarrollo. Para solucionar este problema el Instituto Nacional de Cáncer, Bethesda, inició el estudio ALTS (ASCUS/LSIL Triage Study) (81,82). ALTS es un estudio multicéntrico y aleatorio diseñado para evaluar tres métodos alternativos de gestión en estos casos: realizar una colposcopia inmediata, repetir una citología a los 6 meses o hacer el test del ADN del VPH. En la primera opción, se remitía directamente a la mujer a colposcopia, para identificar el tejido anormal, realización de biopsia en los casos necesarios y tratamiento si así se requería, es lo que se hace en Estados Unidos. En la segunda opción, se repetía la citología cada seis meses, si en el seguimiento la paciente presentaba una alteración mayor en la citología o se mantenía la citología alterada, se remitían a colposcopia, es lo que se hace en Canadá y en varios países de Europa. Y en la tercera opción, se realizaba el test del ADN del VPH junto con la citología. Si el test daba positivo para un VPH oncogénico o la citología daba alterada, se remitían a colposcopia (83). Con ello se quería determinar que opción era más efectiva en la detección temprana de una lesión de mayor grado, que técnica era más aceptada por las pacientes y cuál era la más costo-efectiva. Las mujeres que se incluyeron en el estudio fueron con ASCUS (n= 3488) y LSIL (n= 1572). Las mujeres en cada categoría se designaron al azar a uno de los tres brazos del estudio. El período de inclusión fue de noviembre del 1996 a diciembre del 1998, y se controlaron durante dos años, concluyéndolo a finales del 2000. El resultado de enfermedad era el diagnóstico histológico de CIN 3. Llegaron a la conclusión como otros estudios de que en el caso de LSIL, la prevalencia del VPH oncogénicos era tan alta, un 83%, que

las pruebas de ADN del VPH no permitían una selección de las pacientes con riesgo de desarrollar CIN III (82, 84). La SEGO recomienda su uso sólo en las mujeres con LSIL a partir de los 50 años (67). Otros autores también recomiendan su uso en mujeres mayores (85). La American Society of Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) no recomienda su uso, propone la derivación a colposcopia y si la colposcopia y/o biopsia son normales o solo de CIN I, sí recomiendan la prueba de detección del VPH transcurridos 12 meses o dos citologías de repetición tras la citología inicial de LSIL (86).

En el caso de las mujeres con ASCUS, el porcentaje de VPH-AR positivas varía entre 39 y 48% (84), por lo que su empleo reducía a la mitad el número de mujeres con ASCUS que debían enviarse a realizar una colposcopia (87). El test de ADN-VPH detectó al 96% de mujeres con ASCUS que tenían una lesión precancerosa. Además si tenemos en cuenta la edad, en las mujeres mayores de 30 años el valor predictivo positivo del test ADN-VPH se incrementa, ya que en las jóvenes las infecciones por VPH son muy frecuentes (88). Por el contrario las mujeres con citología ASCUS pero VPH-AR negativas podían ser seguidas con repetición de la citología sin necesidad de colposcopia, ya que en ningún caso se detectó una lesión CIN2 o mayor (72). Por lo que los autores concluyen que el test de ADN-VPH en las mujeres con ASCUS, es más sensible e igualmente específico que repetir la citología a los 6 meses (89).

En lo que respecta al uso del genotipado del VPH en las mujeres con ASCUS, hay estudios con resultados dispares. Por ejemplo en varios estudios realizados (90, 91) las mujeres con presencia del VPH tipo 16 presentaban un riesgo acumulado de desarrollar una lesión  $\geq$ CIN III mayor que en el resto de los casos, por lo que recomienda realizar un test que demuestre la presencia del tipo 16 para llevar a cabo un seguimiento más agresivo en estos casos. Por otro lado, otro estudio (92) no cree beneficioso en el caso de ASCUS, la realización del genotipado, ya que en las mujeres que tienen una lesión  $\geq$ CIN II, con infección por VPH se debe en el 50% de los casos a los tipos VPH 16 o 18, y el otro 50% a otros tipos de alto riesgo. Además el riesgo acumulado de presentar CIN II o mayor es alto en ambos casos, del 40% para VPH 16 o 18, y del 20% en el resto, por lo que si da positivo se debe remitir en todos los casos a colposcopia.

### ***1.4.3. Test de VPH para seguimiento tras el tratamiento de lesiones cervicales***

El tratamiento de las lesiones intraepiteliales de cérvix como se ha explicado anteriormente es mediante la conización. De estas mujeres tratadas, entre el 5 y 35% van a presentar una recurrencia de la enfermedad (93). Esto se puede deber al fallo del tratamiento inicial, o por recidiva de la lesión por la persistencia del VPH (94). Su seguimiento hasta ahora ha sido con citología y colposcopia. Pero en los últimos años, se ha estudiado el uso del test de VPH para predecir el riesgo de recidiva por persistencia del virus (95). Se ha visto que un resultado del test negativo en el primer



control postconización tiene un alto valor predictivo negativo, del 97,99%, por lo que se pueden reducir el número de controles colpocitológicos (95). Además si el resultado es positivo ayuda a identificar al 91% de mujeres con enfermedad residual o recurrencia de lesiones  $\geq$ CIN II aun cuando la citología ha resultado normal (96). Por tanto junto con la citología, que presenta mayor especificidad, forman una buena herramienta en el seguimiento de pacientes intervenidas por lesiones CIN II/III, con una sensibilidad y VPN del 100% (97). De esta forma se reduce el número de reconizaciones e histerectomías. La negativización del test ADN-VPH, citología y colposcopia a los 6 y los 12 meses de la conización, permite devolver a la mujer al programa de cribado (97).

Así, concluimos que la determinación del VPH posconización es una herramienta útil para el seguimiento de estas mujeres, al disminuir la necesidad de múltiples controles, disminuir la ansiedad de la mujer ante la negativización de la citología y el VPH, y al aumentar la detección de mujeres con riesgo de recurrencia. Aunque aún son necesarios más estudios que comparen el uso del test ADN-VPH, con la citología y/o colposcopia con un mayor tiempo de seguimiento en estas pacientes, para definir el mejor manejo posible.



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

Un importante reto para la práctica clínica es el manejo de las lesiones CIN I. Como hemos visto, estas lesiones regresan en una porción significativa, pero bien es cierto que un determinado número de ellas constituyen verdaderas lesiones precancerosas.

Desde un punto de vista clínico, sería interesante contar con un marcador que nos permitiera identificar las lesiones que regresarán espontáneamente de aquellas destinadas a progresar.

Hay datos para poder pensar que este marcador puede ser la determinación del ADN de VPH. Así, nos planteamos la hipótesis que las lesiones de CIN I asociadas a virus de alto riesgo, teniendo en cuenta el genotipo, van a tener una evolución diferente a las asociadas a virus de bajo riesgo o sin virus.

Si esto es así, sería posible:

- Mejorar la calidad de atención de las pacientes en lo que respecta a este problema.
- Mejorar la calidad de vida de las mujeres que sufren este problema.
- Reducir costos a los servicios hospitalarios, por atención del problema y sus complicaciones.

### 2.1. Objetivo principal

Determinar si el genotipado del VPH es útil clínicamente para conocer la regresión o necesidad de tratamiento de las lesiones diagnosticadas histológicamente como CIN I.

### 2.2. Objetivos secundarios

Valorar en las lesiones CIN I:

1. Si el hallazgo de ADN de VPH de AR supone un factor pronóstico para determinar su regresión espontánea.
2. Si el tipo específico de VPH ya sea de alto o bajo grado influye en la regresión espontánea.
3. Identificar las lesiones CIN I donde la infección está producida por múltiples tipos de VPH y si afecta en la regresión.
4. Número de lesiones de CIN I asociadas con VPH 16 o 18 exclusivamente.



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Localización del estudio

Hemos realizado un estudio de cohortes, longitudinal y retrospectivo para valorar los resultados clínicos de la evolución de las lesiones de CIN I diagnosticadas en la consulta de Patología Cervical del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA).

### 3.2. Procedimiento en consulta

En el área de salud de Albacete se realizan citologías dentro del cribado oportunista. Éstas citologías son tomadas en las consultas de ginecología del hospital o por las matronas en los centros de salud. Al obtener el resultado de dichas citologías, si estas están alteradas (ASCUS, AGUS, LSIL, HSIL,...) se las remite a la consulta de Patología Cervical.

En la primera visita que se lleva a cabo en la consulta de Patología Cervical se realiza una citología y una colposcopia con toma de biopsia/s según los hallazgos encontrados bajo visión colposcópica. Con los resultados de estas pruebas se realiza el diagnóstico.

Durante el tiempo de estudio, a las pacientes que presentan lesiones de bajo grado en la biopsia se les propone un control a los 4-6 meses. Si aceptan dicho control, en la segunda visita se les realiza el estudio de forma similar al primero. Durante el período de seguimiento a las mujeres con lesión persistente a los 4-6 meses se les ofrece tratamiento. En los casos en los que regresa la lesión se continúan haciendo exámenes periódicos cada 6 meses los primeros años y después cada año. Si la lesión persiste o progresa a mayor grado se tratan.

### 3.3. Población de estudio

- Se estudian las mujeres a las que se les ha diagnosticado de CIN I mediante biopsia en su primera visita en la consulta de Patología Cervical.
- Se recogen los casos de 12 años, entre el año 1995 al 2007 incluidos.
- El diseño del trabajo corresponde a un estudio de cohortes, longitudinal, retrospectivo.
- El número de pacientes estudiadas ha sido 329.

#### 3.3.1. Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticadas por biopsia de VPH, CIN I o CIN I-II.
- No gestantes.

- Inmunocompetentes.
- No presenten lesiones vaginales concomitantes.

### 3.3.2. Criterios de exclusión

- Que no tengan dos años de seguimiento.
- No poder acceder a las historias clínicas.
- Imposibilidad de obtener material de ADN de la biopsia.
- Pacientes tratadas tras realizar la primera biopsia de inicio del estudio.

Se ha podido estudiar el 82,56% de las pacientes seleccionadas.

## 3.4. Técnicas diagnósticas: citología, colposcopia y biopsia

La toma de la citología se realiza en posición ginecológica, realizamos la triple toma: muestra vaginal, exocervical y endocervical. Tras la recogida y extensión lo fijamos en el portaobjetos.

A continuación realizamos la colposcopia sin retirar el espéculo. Aplicamos el ácido acético para identificar las zonas sospechosas de malignidad “acetoblancas”. El test de Schiller (captación de lugol) lo realizamos a continuación. Tomamos una o varias biopsias en los casos necesarios bajo visión colposcópica. En las pacientes donde la imagen atípica penetra en el canal endocervical o en casos de citologías atípicas o malignas con colposcopias normales y/o uniones escamosocilíndricas no visibles, realizamos un legrado endocervical o toma con cytobrush.

## 3.5. Recogida de datos

Los datos de las pacientes se recogieron en una ficha donde constaba: el número de historia clínica, nombre y apellidos de la paciente, la edad, la edad del primer coito, la paridad, si presentaba o no la menopausia, si era fumadora y en qué cantidad, uso del preservativo, uso de anticonceptivos hormonales en el momento de inclusión en el estudio, resultado de la citología previa al inicio del estudio, si presentaba síntomas y de qué tipo, citología al inicio del estudio, colposcopia inicial, afectación del cérvix, fecha 1ª biopsia, tipo de biopsia, resultado de la biopsia, genotipos de VPH, tipo de infección, regresión espontánea, progresión a  $\geq$  CIN III, meses hasta la progresión, tratamiento, meses hasta el tratamiento, tipo de tratamiento y fin del estudio.

Se establecieron medidas para la protección de datos de las pacientes, de manera que los datos de filiación quedaron ocultos desde el inicio del trabajo. Se les asignó una clave numérica, quedando la correlación clave numérica-paciente en un ordenador protegido con contraseña.

### 3.5.1. Variables recogidas y definición de términos empleados

**Genotipo:** variable cualitativa nominal. Genotipo del o de los virus del papiloma humano que se detectan: 6, 11, 26,...:si/no.

**Clasificación de los genotipos:** los genotipos del VPH los clasificamos como AR (alto riesgo), BR (bajo riesgo), pHR (probable alto riesgo), adicionales y X. Los genotipos clasificados por Muñoz (Muñoz et al, 2003) como pHR los hemos clasificado dentro del grupo de los de alto riesgo. Hay otros genotipos que no están clasificados dentro de los de alto riesgo ni en los de bajo riesgo, se clasifican como “adicionales”: 69, 71, 74 y X. Los VPH X corresponde a aquellas muestras para las que el patrón de bandas obtenido no pueda asignarse a ningún patrón de genotipo, o aquellas que no tengan bandas específicas de tipo (1-28), pero tengan como mínimo una banda de control positiva de VPH, por lo que deben clasificarse como VPH positivas, pero de tipo no identificable (VPH X).

Con la técnica de biología molecular que hemos utilizado para detectar la presencia y tipo de VPH pueden aparecer en el informe final de cada muestra virus marcados entre paréntesis. En estos casos, no podemos saber si el virus está presente en la muestra como coinfección con otros tipos virales, o no está pero aparece en el informe final porque comparte su patrón de bandas de hibridación con otros tipos virales y no hay manera de diferenciarlos, ejemplos: VPH18-(VPH39), VPH31-(VPH52)-(VPH54), VPH33-(VPH52)-(VPH54),...

En el análisis estadístico comparamos los resultados incluyendo y excluyendo estos virus sin obtener diferencias, por lo que finalmente los hemos excluido del estudio, ya que no podemos saber si están presentes o no.

**Tipo de infección VPH:** variable cualitativa nominal: virus de AR (alto riesgo), BR (bajo riesgo), valor negativo (no infección por VPH), X (presencia de un VPH no reconocido por las sondas de hibridación utilizadas), infección por múltiples virus BR, múltiples virus AR, múltiples virus BR y AR.

**Vigilancia:** variable cualitativa nominal: si/no.

**Regresión espontánea:** variable cualitativa nominal: si/no. Definida como la desaparición de la lesión sin tratamiento al obtener dos controles negativos consecutivos, entendiendo como control negativo: citología normal y colposcopia normal, o si la colposcopia está alterada, la citología y la biopsia son normales.

**Persistencia:** aquella que no ha regresado espontáneamente ni se ha tratado.

**≥CIN III:** variable cualitativa nominal: si/no. Si se produce la aparición de una lesión

grado 3 o mayor durante el seguimiento (diagnostico mediante biopsia).

**Tratamiento:** variable cualitativa nominal: si/no. Realización de tratamiento con objeto curativo (escisional o destructivo).

### **3.6. Técnica de biología molecular**

El procesamiento del ADN se realizó en las instalaciones y equipos del laboratorio de oncología molecular del CRIB (Centro Regional de Investigaciones Bioéticas) en la Facultad de Medicina y en la Unidad de la AECC de Investigación Oncológica Traslacional del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

El método elegido para el aislamiento, detección y genotipado del ADN-VPH de las muestras del estudio fue la realización de la PRC (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando los cebadores consenso SPF10 realizando el genotipado mediante la hibridación reversa en tira (PCR-SPF10/LiPA).

#### **Esquema de los pasos seguidos:**

- Corte de los bloques de parafina.
- Extracción del ADN-VPH de cada muestra del estudio.
- Amplificación del ADN extraído mediante PCR.
- Hibridación reversa del producto amplificado en tira.
- Interpretación visual del patrón de las señales.

El proceso se dividió en dos fases: PrePCR y PostPCR, que se desarrollaron en laboratorios independientes para evitar posibles contaminaciones.

#### **Material de laboratorio:**

- Material general de laboratorio para técnicas de biología molecular (tubos para microcentrífuga y de PCR, tampones, micropipetas, puntas de pipeta, gradillas, cajas de almacenaje de alícuotas, guantes, hielo picado,...)
- Termociclador (C1000 Thermal Cycler, BIO-RAD)
- Espectrofotómetro (NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer)
- Centrífuga (MiniSpin plus, Eppendorf)
- Vórtex (Labnet.Vx 100)
- Bloque incubador (Thermomixer Confort, Eppendorf)
- Microtomo (Minot de rotación)



- Material de extracción de DNA
- “Kits” para amplificación (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp, de Innogenetics, Bélgica) y para la hibridación (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra, de Innogenetics, Bélgica).

### **3.6.1. Procedimiento**

A partir de las historias clínicas de las pacientes se obtuvo el número de biopsia correspondiente. Con estos números, se recuperaron los bloques de parafina de cada caso del archivo de Anatomía Patológica.

#### **Corte de los bloques de parafina:**

La obtención del material de bloques de parafina se obtuvo mediante cortes seriados de 5 µm de espesor. Estos cortes se realizaron en un microtomo de rotación o tipo Minot. Se utilizó una cuchilla diferente para cada caso. Para evitar cualquier posible contaminación, el microtomo se limpió periódicamente con etanol 96°. El material obtenido se introdujo en microtubos previamente esterilizados de 1,5 ml y debidamente referenciados con el número de la biopsia correspondiente.

#### **Extracción de ADN-VPH:**

Para el siguiente paso se utilizó el buffer de extracción (lisis):

- Tris 50 mM pH8 223,25 µl
- Tween 20 0,5% 1,25µl
- EDTA 1mM Ph 8.8 0,5µl
- Proteinasa K(1mg/ml) 25µl

Según el número de muestras que se tenía se calculó la cantidad final de cada reactivo y se mezcló todo excepto la proteinasa K. De la dilución obtenida se introdujo en cada microtubo/muestra 225 µl. Por último se añadieron los 25µl de proteinasa K.

La mezcla resultante se incubó durante 16 horas como mínimo, a 56°C en el bloque incubador (Thermomixer Confort, Eppendorf).

Posteriormente se inactivó la proteinasa K durante 5 minutos a una temperatura de 100°C. Se centrifugó a 13.000rpm otros cinco minutos y se recogió el sobrenadante de cada muestra.

En aquellos casos en los que la muestra presenta mucha parafina se probó a realizar la extracción del ADN desparafinando y no desparafinando diferentes cortes de una misma biopsia, y se comprobó que las concentraciones y calidad del ADN resultaban muy similares en ambos casos, ya que el kit que se utiliza para la posterior

amplificación no necesita desparafinado en el momento de la extracción del ADN (Kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp., Innogenetics, Bélgica).

### **Determinación de la calidad del ADN extraído:**

Una vez extraído el ADN se cuantificó su concentración por espectrofotometría (NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer). Se valoró la absorbancia en U.V. a 280/260 nm que resulta directamente proporcional a la cantidad de ADN de la muestra. Para controlar la pureza de la preparación de ADN se utilizó la relación A260/A280. Para una muestra pura de ADN, la relación de absorbancias a 260 y 280 nm es de alrededor el 1,8-2,0. Valores menores de 1,8 indican que la preparación está contaminada con proteínas.

### **Amplificación del ADN extraído (PCR-SPF10):**

Para realizar la amplificación se puso como concentración mínima de ADN 13 µl/ng, que es la concentración más baja que comprobamos que permitía realizar la detección de ADN viral y su genotipado. Al realizar la hibridación con concentraciones menores ésta resultó fallida. En estos casos se realizó de nuevo la extracción de ADN.

El siguiente paso consistió en realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de amplificar un segmento del ADN viral, de la región L1, que genera un producto amplificado de 65 pb. Para ello se utilizó el Kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp. (Innogenetics, Bélgica) que contiene una mezcla de 10 cebadores consenso "SPF10".

En cada reacción de PCR se incluyó un control positivo proporcionado por la casa comercial y un control negativo que consistía en 10 µl de agua estéril, con todos los componentes de la reacción excepto el ADN viral, para descartar la existencia de una contaminación, lo cual invalidaría el estudio.

Los reactivos que incluye el Kit son:

AMP MIX: contiene cebadores biotinilados en tampón con mezcla de un exceso de desoxinucleósidos 5'-trifosfatos (dNTP) que contiene deoxiuridina trifosfato (dUTP), MgCl<sub>2</sub> y NaN<sub>3</sub> al 0,05% como conservante.

ENZ MIX: contiene polimerasa AmpliTaq Gold y uracil-N-glicosilasa (UNG).

La polimerasa se denomina polimerasa AmpliTaq Gold, debe su nombre a la bacteria *Therrnus aguaticus*, de la que fue aislada. Es una polimerasa de ADN termoestable.

En cada tubo de PCR se pusieron 40µl de la mezcla Master Mix, que contiene: 37,7µl AMP MIX + 2,3µl ENZ MIX.



- Extender cebadores → 72°C →45 seg
- Mantener a → 72°C →5 min (extensión final)

### Hibridación reversa en tiras:

Una vez finalizada la PCR, se realizó la hibridación del amplificado con el kit de INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics, Bélgica) (Fig. 7) de forma automatizada utilizando el procesador mecanizado Auto-LiPA (Fig.14). La hibridación reversa en fase sólida sirve para la detección y genotipado del VPH.



**Figura 7.** kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra.

**Fuente:** propia.

### Material y reactivos de la hibridación:

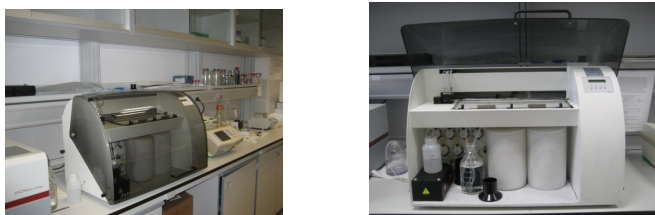
- 20 tiras/ Kit.
- Bandeja (30 canales máximo)
- Auto-LiPA
  - ☒ Solución desnaturalizante: solución alcalina EDTA.
  - ☒ Solución de hibridación: tampón SSC con laurilsulfato sódico.
  - ☒ Solución de lavado astringente: tampón SSC con SLS.
- Conjugado 100x: estreptavidina marcada con fosfatasa en tampón Tris con estabilizadores de proteínas y MIT como conservante.
- Diluyente de conjugado: tampón fosfato con NaCl, Triton®, estabilizadores de proteínas y MIT como conservante.
- Sustrato BCIP/NBT 100x.
- Tampón sustrato: tampón Tris con NaCl, MgCl<sub>2</sub> y MIT como conservante.
- Solución de lavado 5x: tampón fosfato con NaCl, Triton® y MIT como conservante.

Este método permite identificar 29 genotipos distintos del virus del papiloma humano mediante la detección de secuencias específicas de la región L1 del genoma de VPH. De éstos, 10 son virus de bajo riesgo (6, 11, 34, 40, 43, 44, 54, 70, 71), 16 de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,68, 69, 73, 82) y 3 de

probable alto riesgo (26, 53, 66). Puede determinar también VPHs adicionales: 69/71 y 74 y genotipos no tipificables: X.

Al realizar el análisis estadístico los genotipos de probable alto riesgo se han considerado como de alto riesgo.

La hibridación y lavados deben realizarse exactamente a  $49^{\circ}\text{C}\pm 0.5$ , que es la temperatura indicada para evitar resultados FALSOS POSITIVOS (temperatura inferior) o FALSOS NEGATIVOS o muy débiles (temperatura superior).



**Figura 8.** Auto-LiPA.

**Fuente:** propia.

#### **Pasos a seguir en el Auto-LiPA:**

1. Se calienta el baño a  $49^{\circ}\text{C}$ .
2. Se identifican tantas tiras como casos a examinar.
3. Se preparan las concentraciones adecuadas de cada reactivo.
4. Se introducen los reactivos en el sitio que le corresponda del Auto-LiPA.
5. Se selecciona tantos canales como muestras se tenga (1 canal por tira).
6. Se coloca  $10\ \mu\text{l}$  de solución de desnaturalización en la parte superior de cada canal y se agregan  $10\ \mu\text{l}$  del producto biotinilado amplificado, mezclándolo cuidadosamente por pipeteo, varias veces.
7. Se coloca una tira diferente por canal.
8. Los pasos siguientes se realizan automáticamente en el Auto-LiPA en un proceso que dura alrededor de tres horas donde se produce la hibridación del producto amplificado en la tira, seguido de varios lavados astringentes y la adición del conjugado y sustrato, dando lugar al desarrollo de diferentes bandas moradas en cada tira según el resultado de la genotipificación.
9. Por último se extraen las tiras que se deben secar (Fig. 9).



**Figura 9.** Bandeja y tiras de hibridación.

**Fuente:** propia.

### 3.6.2. Interpretación de los resultados

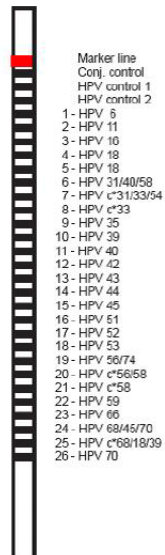
Los resultados se interpretan o bien con la plantilla de referencia (Fig. 10) o bien por escáner. Se comprobó que los resultados eran idénticos por lo que de forma rutinaria se utilizó para la lectura de los resultados el escáner.



#### INNO-LIPA HPV Genotyping Extra Interpretation Chart

		HPV genotypes																																			
Probe #	6	11	16	18	18	26*	31	33	35	39	40	43	44	45	51	52	53*	53*	54	56	58	58	58	58	59	66*	68	68†††	70	73	74**	82	Probe #				
	LR	LR	HR	HR	HR	pHR	HR	HR	HR	HR	LR	LR	LR	HR	HR	HR	pHR	pHR	LR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	pHR	HR	LR	LR	HR	HR						
1	X																																1				
2		X																																2			
3			X																															3			
4				X																														4			
5					X																													5			
6						X																												6			
7																																			7		
8										X													X	X					X					8			
9									X	X										X															9		
10									(X)***	X																									10		
11											X																								11		
12				X	X																														12		
13												X																							13		
14													X																						14		
15														X																					15		
16															X	X																			16		
17																X																			17		
18									X	X										X	X	X	X	X											18		
19																	X	X																		19	
20																																				20	
21																					X															21	
22																						X	X	X	X											22	
23																																				23	
24																																					24
25																X																				25	
26																																					26
27																																					27
28																																					28

\*: 26, 53 and 66 are considered probable high-risk (pHR) genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.  
 \*\*: 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.  
 \*\*\*: probeline 10 may show weak reactivity when probelines 6 and 9 are positive, in this case the sample should be interpreted as genotype 31.



**Figura 10.** Plantilla con la posición de las diferentes sondas de oligonucleótidos que corresponden a un genotipo viral en la tira de hibridación reversa. Esta plantilla se coloca sobre cada tira para conocer el genotipo.

**Fuente:** Innogenetics, Bélgica.

Para la interpretación de los resultados se tuvieron en cuenta las siguientes instrucciones:

- La primera banda es la línea del Control del Conjugado (inmediatamente después de la línea de marcaje roja). Esta línea controla la adición de reactivo de conjugado y la solución substrato durante el procedimiento de hibridación. Debe ser siempre positiva y debe tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira durante el mismo ensayo.
- La segunda banda es una banda de control de ADN humano. Se añaden los cebadores que amplifican un fragmento del gen humano HLA-DPB1 al kit de amplificación de VPH para controlar la calidad de la muestra y la eficacia de la extracción.
- El control positivo contiene VPH 6 y HLA-DPB1.
- Una muestra se considera VPH positiva si por lo menos una de las bandas para tipos específicos o una de las bandas de control de VPH es positiva, independientemente de la intensidad de color de la bandas.
- Las muestras para las cuales se ha obtenido un patrón de bandas

diferente a los especificados o que no han mostrado ninguna banda específica (bandas 1 a 26) pero si han mostrado al menos una de las bandas de control de VPH positiva, se consideraron VPH positivo pero no tipificable: VPH X.

### **3.7. Recogida y análisis estadístico de los datos**

Se han establecido medidas encaminadas a la protección de datos de los pacientes, de manera que, una vez iniciado el trabajo, los datos de filiación quedaron ocultos. A los pacientes se les asignó una clave numérica que ha sido la que se ha utilizado para la investigación y la correlación clave numérica- paciente quedando en un ordenador protegido con contraseña.

Una vez extraídos los datos de la historia, se introducen en una base de datos de Excel diseñada con este propósito.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Statistical Package Science v. 120 (SPSS 12.0 for Windows) con el cálculo de valores estadísticos descriptivos.

La asociación entre las variables nominales se ha realizado mediante el diseño de tablas de contingencia, utilizando el test de la  $\chi^2$  y cuando no se cumplían los criterios para su uso, la prueba exacta de Fisher. Para analizar las variables cuantitativas con las nominales, se emplea la prueba de Kruskal-Wallis. Tras estudiar la relación existente entre las variables iniciales, realizamos un análisis multivariante mediante regresión logística no condicional con las variables que en el análisis univariante demuestran alguna relación. Se calculan las OR. Para el estudio estadístico de los casos en que el tiempo de estudio se contempla, se usa el análisis de supervivencia de Kaplan Meier.

Se define como evento terminal el diagnóstico de lesión de CIN III o la necesidad de tratamiento. La duración del tiempo de control se establece como el tiempo que transcurre entre el momento del inicio del estudio y el momento del diagnóstico del evento terminal. En los casos en que no se produce el evento terminal, se considera el final de seguimiento como el último control que se dispone de la paciente o transcurridos cinco años.

Se calcula el intervalo de confianza al 95%.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Descripción de la población

Las pacientes que han sido objeto del presente estudio tenían unas edades comprendidas entre los 18 y los 60 años, con una edad media de 34,6 años ( $\pm$  8,5) y una mediana de 34 años. De las 232 mujeres estudiadas sólo 15 (6,5%) eran menopáusicas.

Respecto a la edad de inicio de las relaciones sexuales varió entre los 14 y los 35 años. La mayoría de mujeres (177; 76,3%) iniciaron sus relaciones sexuales con una edad igual o superior a los 18 años. Ciento cuarenta (60,3%) mujeres tenían al menos un parto.

El hábito tabáquico estaba presente en 138 (59,5%) mujeres, de las cuales 67 (28,9%) fumaban en una cantidad igual o menor a 10 cigarrillos al día; 55 (23,7%) entre 10 y 20 cigarrillos al día; y 16 (6,9%) más de 20 cigarrillos al día.

Respecto al método de planificación familiar utilizado en el momento de inicio del estudio, el que se empleaba con más frecuencia era el preservativo, por 88 (37,9%) mujeres. El segundo más utilizado fueron los métodos de anticoncepción hormonal, en 47 (20,2%) pacientes. En 30 (12,9%) casos se habían realizado un método quirúrgico de planificación familiar, de éstos, en 19 (8,2%) casos sus parejas tenían hecha la vasectomía y en 11 (4,7%) casos ellas se habían realizado la ligadura tubárica bilateral. El DIU (dispositivo intrauterino) era utilizado por 19 (8,2%) mujeres. No utilizaban ningún método de planificación familiar 36 (15,5%) mujeres y en 8 (3,4%) casos no tenían relaciones sexuales.

Casi la totalidad de las pacientes, 218 (94%), se encontraban asintomáticas en el momento de inicio del estudio; sólo en 10 casos (4,3%) presentaban síntomas de vaginitis, en 3 casos (1,3%) coitorragia y en un caso (0,4%) sangrado postmenopáusico. La mayoría de las pacientes, 218 (94%), consultaron por alteración citológica, en 10 (4,3%) casos consultaron tanto por alteración en la citología como por síntomas de vaginitis y en 4 (1,7%) casos sólo por sintomatología, de éstos 3 (1,3%) por coitorragia y un (0,4%) caso por sangrado postmenopáusico.

### 4.2. Genotipado del VPH

Se identificó infección por VPH en 224 pacientes (96,6%), sólo en 8 (3,4%) no se encontró ningún tipo viral (Fig. 11).

Hay que destacar que de estas 224 mujeres que presentaban infección por VPH, en 212 casos (94,6%) aparecía uno o varios virus de alto riesgo. Los virus de bajo riesgo aparecían en menor porcentaje, sólo en 68 casos (29,9%) (Fig.12).

En 99 mujeres (42,6%) la infección era producida por un único tipo viral. En 87 mujeres (37,5%) la infección era producida por un único tipo de virus de alto riesgo. En 8 mujeres (3,4%) la infección era producida por un único virus de bajo riesgo. En 4 mujeres (1,7%) la infección era producida por la presencia de un sólo virus de tipo adicional (69/71, 74) o no reconocido (VPH X). En 125 mujeres (53,9%) la infección estaba producida por múltiples tipos virales tanto de alto riesgo como de bajo riesgo. Destacando que siempre que se encontró una infección de este tipo había uno o varios virus de alto grado, independientemente de que hubiera virus de bajo riesgo (Fig. 13).

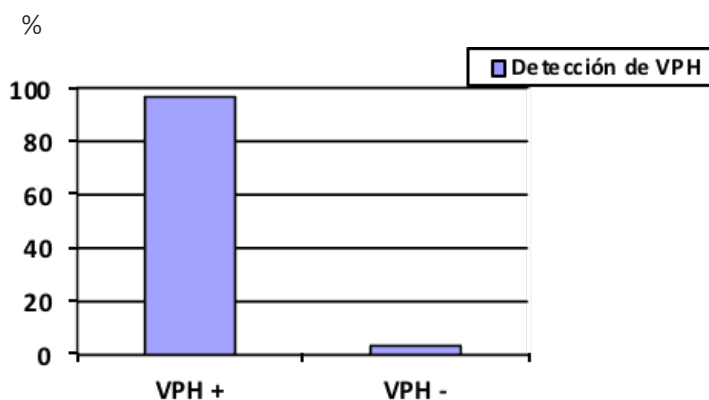


Figura 11. Porcentaje de VPH presente en las muestras.

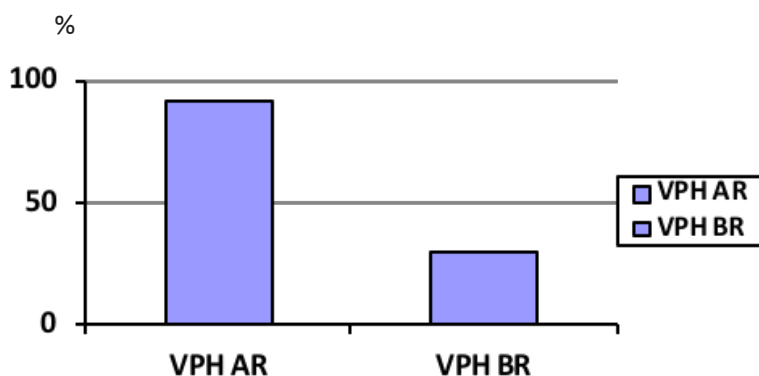
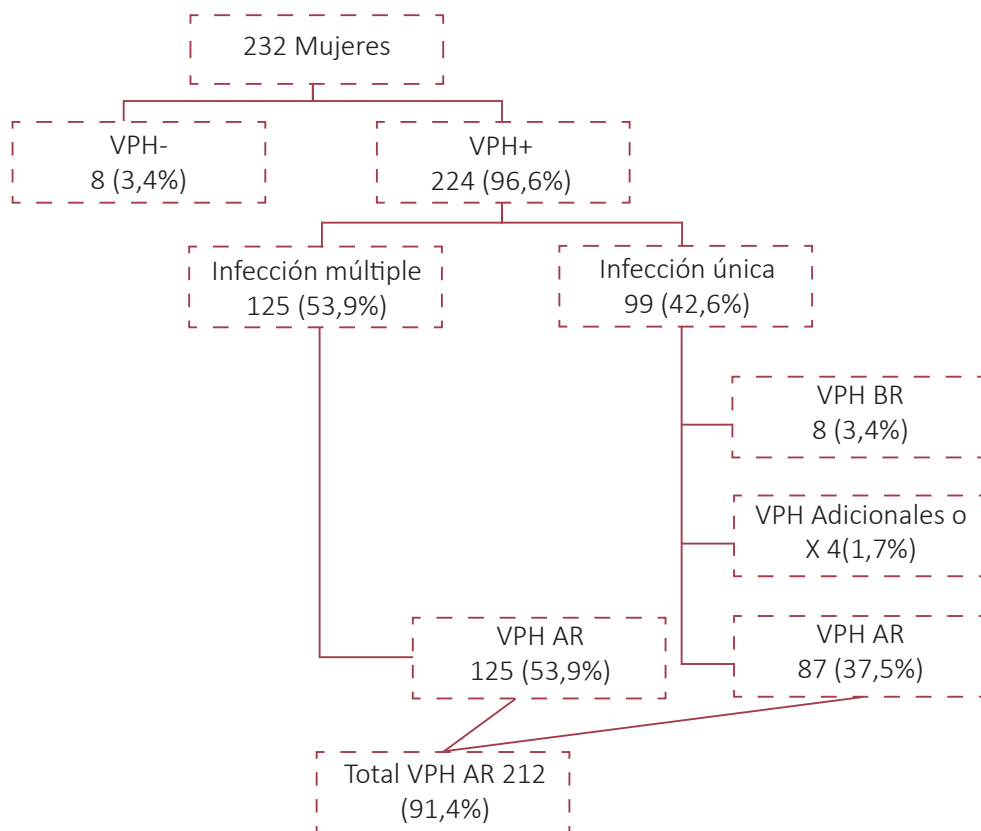


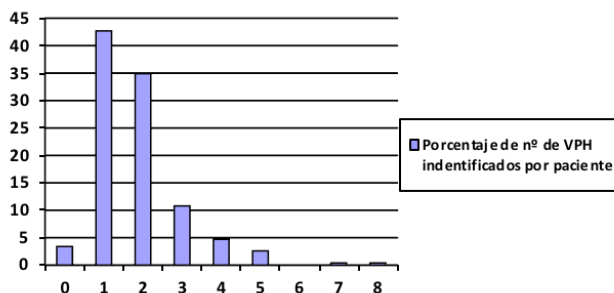
Figura 12. Porcentaje de VPH de AR y BR presentes en las muestras.



**Figura 13.** Esquema del porcentaje de VPH identificados en las muestras.

#### 4.2.1. Porcentaje de virus

En 81 (34,9%) mujeres se identificaron dos tipos virales, en 25 mujeres (10,8%) 3 tipos virales, en 11 (4,7%) cuatro tipos virales, en 6 (2,6%) cinco tipos virales, en 1 (0,4%) siete tipos virales y en 1 (0,4%) ocho tipos virales (Fig. 14).



**Figura 14.** Porcentaje de VPH identificados por paciente.

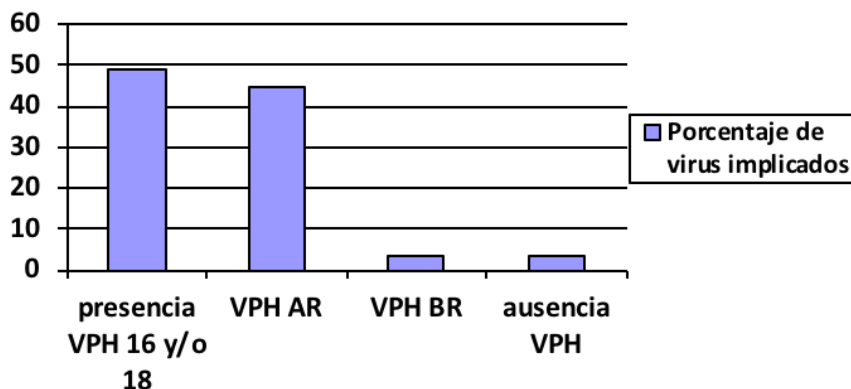
#### 4.2.2. Porcentaje de virus de alto riesgo más frecuentes

Los tipos de VPH de alto riesgo más frecuentes fueron VPH 16, VPH 51 y VPH 53 (Tabla 2).

En 99 mujeres (42,7%) encontramos infección por el VPH tipo 16. De éstas, en 36 mujeres (15,5%) la infección estaba producida sólo por este virus. En el caso del virus tipo 18, lo encontramos en 26 mujeres (11,2%), pero produciendo la infección como único virus sólo se identificó en 5 mujeres (2,2%). En 12 mujeres (0,5%) se identificó infección por ambos virus 16 y 18. El tipo 45 sólo se ha identificado en 2 mujeres (0,9%), siempre junto con otros tipos virales. En 99 mujeres (42,6%) la infección fue producida por virus de alto riesgo, pero ninguno de ellos era ni 16 ni 18 (Fig. 15).

**Tabla 2.** Porcentaje de virus de alto riesgo.

Tipo de virus de alto riesgo	n pacientes	Porcentaje
16	99	42,7%
51	46	19,8%
53	44	19%
31	32	13,8%
18	26	11,2%
33	18	7,8%
58	17	7,3%
52	15	6,5%
39	14	6%
66	12	5,2%
56	11	4,7%
68	11	4,7%
35	5	2,2%
82	4	1,7%
45	2	0,9%
26	1	0,4%



**Figura 15.** Porcentaje de VPH implicados en la infección, diferenciando VPH 16 y 18, de otros virus de AR, BR y ausencia de VPH.

#### 4.2.3. Porcentaje de virus de bajo riesgo y adicionales

Los tipos de VPH de bajo riesgo más frecuentes detectados fueron VPH 6 y el VPH 11 (Tabla 3 y 4).

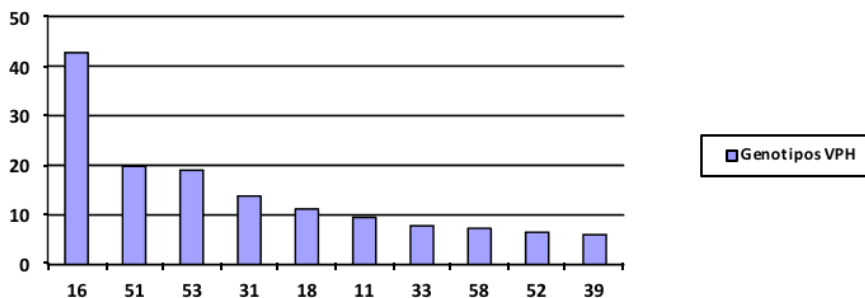
**Tabla 3.** Porcentaje de virus de BR más frecuentes.

Tipo VPH de BR	n pacientes	Porcentaje
11	22	9,5%
6	5	2,2%
44	4	1,7%
54	4	1,7%
70	3	1,3%

**Tabla 4.** Porcentaje de virus adicionales.

Tipo VPH adicionales	n pacientes	Porcentaje
X (desconocido)	11	4,7%
69/71	6	2,6%
74	2	0,9

Por lo que el VPH más frecuente teniendo en cuenta todos los tipos de virus, fueron los genotipos 16, 51 y 53, todos de alto riesgo (Fig. 16).



**Figura 16.** Porcentaje de genotipos más frecuentes.

No se detectó en ningún caso los tipos de VPH de alto riesgo 34 y 73 y de bajo riesgo 40, 42, 43, 57, 61, 72, 81 y 83. A lo largo de los 12 años estudiados, no se observó diferencias en el porcentaje de la mayoría de virus encontrados, a excepción de los tipos 45 y 82, ambos de alto riesgo. El 82 empezó a detectarse a partir del 2001 y el 45 en el 2006.

#### **4.2.4. Edad y tipos de virus**

No observamos diferencias en cuanto al número de virus y la edad de las pacientes. Ni observamos más infecciones múltiples en las mujeres jóvenes, al contrario de lo que se podría esperar. El mayor número de virus identificado fue en una mujer de 49 años, donde se observaron 8 tipos virales (31, 51, 52, 53, 54, 66, 74 y 82).

En las mujeres menopáusicas (n=15) en 3 no se identificó VPH. En dos mujeres sólo se detectó un tipo viral, y en el resto, 10 (67%), casos la infección estaba producida por múltiples tipos virales. Los virus más frecuentemente detectados fueron el 16 en 5 (33,3%) casos, el 31 en 4 (26,7%) casos y el 33 (20%) en 3 casos.

#### **4.2.5. Colposcopia y tipos virales**

Cuando en la colposcopia observamos cambios compatibles con una lesión de alto grado, todos los virus identificados fueron de alto riesgo. En el resto de colposcopias, el porcentaje de virus de alto grado también fue, entre el 84 y 92%, por lo que no encontramos diferencias ( $p=0,59$ ).

#### **4.2.6. Afectación cervical y tipos virales**

No encontramos diferencias en los tipos de virus en cuanto a la afectación cervical ( $p=0,5$ ).

#### 4.2.7. Citología y tipos virales

Tampoco encontramos diferencias en los tipos de virus en cuanto al resultado de la citología ( $p=0,55$ ).

### 4.3. Regresión de CIN I en función del tipo de VPH

Se produjo la regresión espontánea de la lesión según los criterios descritos anteriormente en 125 casos (53,9%).

Se produjo mayor regresión en las lesiones donde no identificamos VPH o en los que aparecieron VPH adicionales, en el resto la regresión fue menor, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 5).

**Tabla 5.** Relación entre la regresión y los diferentes tipos de VPH.

Tipo VPH	Regresión espontanea	
	Si	No
AR	112 (52,8%)	100 (47,2%)
BR	4 (50%)	4 (50%)
Adicionales, X	3 (75%)	1 (25%)
VPH-	6 (75%)	2 (25%)
p=0,513		
AR: alto riesgo		
BR: bajo riesgo		
X: genotipo desconocido		

En la tabla 6 observamos el porcentaje de CIN I que regresaron en relación con el tipo de VPH en las lesiones producidas por un único tipo viral. Si analizamos la presencia o no de virus de alto riesgo tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas [ $p=0,397$ ; OR=0,7 (IC 95%: 0,2-1,7)]. Si realizamos el análisis diferenciando la presencia de un solo tipo de virus de AR, varios o ninguno tampoco encontramos diferencias en la regresión de las lesiones ( $p=0,696$ ).

**Tabla 6.** Porcentaje de CIN I que regresa en relación con el tipo de VPH en las lesiones producidas por un único tipo viral.

Genotipo VPH	Regresión	
	n pacientes	%
6	2	50%
11	5	60%
16	36	51%
18	5	60%

31	13	69%
33	6	17%
51	18	61%
53	8	62%

Respecto a los virus de BR, tampoco hubo diferencia en cuanto a la regresión, [p=0,981; OR=1(IC95%:0,5-2)]. El mismo resultado obtuvimos en el caso de que en el análisis diferenciáramos la presencia de un único virus de BR, varios o ninguno.

Si realizamos el análisis estadístico diferenciando las infecciones en las que no se detectan virus, de las producidas por virus de BR, desconocidos, de AR 16, 18 u otros, tampoco obtenemos significación estadística (Tabla 7).

**Tabla 7.** Regresión espontánea de CIN I según los diferentes tipos virales.

Tipo de virus	n total	regresión	%	OR
<b>Sin virus</b>	8	6	75%	1 (ref.)
<b>BR,X, adicionales</b>	12	7	58,3%	0,5 (0,06-3,3)
<b>16</b>	38	20	52,6%	0,4 (0,06-2,1)
<b>16 + AR</b>	49	22	44,9%	0,3 (0,05-1,5)
<b>18</b>	5	3	60%	0,5 (0,04-5,5)
<b>18+AR</b>	9	5	55,6%	0,4 (0,05-3,3)
<b>16+18</b>	12	8	66,7%	0,7 (0,09-4,9)
<b>AR no 16 o 18</b>	99	54	54,5%	0,4 (0,07-2,1)
p= 0,775				
BR: bajo riesgo, X: genotipo desconocido, AR: alto riesgo, OR: Odds ratio				

Si sólo tenemos en cuenta los virus de alto riesgo, tampoco se encuentra ninguna significación estadística (Tabla 8).

**Tabla 8.** Regresión espontánea de CIN I según los tipos virales de AR (I).

Tipo de virus	n total	n regresión	%	OR
<b>16</b>	38	20	52,6%	1 (ref)
<b>16 + AR</b>	49	22	44,9%	0,7 (0,3-1,7)
<b>18</b>	5	3	60%	1,3 (0,2-9)
<b>18+AR</b>	9	5	55,6%	1,1 (0,3-4,8)
<b>16+18</b>	12	8	66,7%	1,8 (0,5-7)
<b>AR no 16 o 18</b>	99	54	54,5%	1,1 (0,5-2,3)
p=0,79				
AR: alto riesgo				
OR: Odds ratio				



Si agrupamos por una parte las infecciones producidas por el virus 16 con o sin otros virus, el 18 con o sin otros virus, el 16 y 18 juntos, y otros virus de alto riesgo diferentes al 16 o al 18, tampoco encontramos ninguna significación estadística (Tabla 9).

**Tabla 9.** Regresión espontánea de CIN I según los tipos virales de AR (II).

Tipo de virus	n total	n regresión	%	OR
<b>16 +/- otros virus</b>	87	42	48,3%	1 (ref.)
<b>18 +/- otros virus</b>	14	8	57,1%	1,4 (0,4-4,5)
<b>16+18</b>	12	8	66,7%	2,1 (0,6-7,6)
<b>AR sin 16 o 18</b>	99	54	54,5%	1,3 (0,7-2,3)
p=0,6				
AR: alto riesgo, OR: Odds ratio				

Si agrupamos las infecciones producidas por los virus 16 y/o 18 con o sin otros virus frente a las infecciones producidas por otros virus de alto riesgo, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (Tabla10).

**Tabla 10.** Regresión espontánea de CIN I diferenciando las infecciones producidas por los virus 16 y/o 18 y el resto de virus alto riesgo.

Tipo de virus	n total	n regresión	%	OR
<b>16 y/o 18+/- virus</b>	113	58	51,3%	1 (ref.)
<b>AR no 16 ni 18</b>	99	54	54,5%	1,1 (0,7-1,9)
p=0,64				
AR: alto riesgo, OR: Odds ratio				

## 4.4. Detección CIN III

### 4.4.1. Relación entre la detección de CIN III y los genotipos de VPH

En todas las lesiones que detectamos CIN III dio positivo el análisis para el virus del papiloma humano. No encontramos diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por el pequeño número de la muestra (Tabla 11).

**Tabla 11.** Relación entre detección de CIN III y presencia de VPH.

VPH	Detección de CIN III	
	No	Si
<b>No</b>	8 (100%)	0 (0%)
<b>Si</b>	210 (93,8%)	14 (6,3%)
p=0,68		

Además en todos los casos que detectamos CIN III, se identificaron virus de alto riesgo, en concreto los tipos: 16, 18, 31, 33, 39, 51 y 58.

Si realizamos el análisis diferenciando la presencia de un solo tipo de virus de AR, varios o ninguno, no encontramos diferencias en detección de las lesiones CIN III ( $p=0,768$ ). Si diferenciamos las lesiones producidas por el virus tipo 16 solo o junto con otros virus de alto riesgo, el 18 solo o junto con otros virus de alto riesgo, el 16 y 18 juntos y otros virus de alto riesgo excluyendo el 16 y 18, tampoco obtuvimos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 12).

**Tabla 12.** Detección de CIN III según los diferentes genotipos virales de AR (I).

Tipo de virus	Detección de CIN III	
	No	Si
16	35 (92,1%)	3 (7,9%)
16 + AR	44 (89,8%)	5 (10,2%)
18	5 (100%)	0 (0%)
18+AR	8 (88,9%)	1 (11,1%)
16+18	11 (91,7%)	1 (8,3%)
AR no 16 o 18	95 (96%)	4 (4%)
p= 0,509		
AR: alto riesgo		

Si agrupamos por una parte las infecciones producidas por el virus 16 con o sin otros virus, el 18 con o sin otros virus, el 16 y 18, y otros virus de alto riesgo diferentes al 16 o 18, tampoco encontramos ninguna significación estadística ( $p=0,396$ ) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Detección de CIN III según los diferentes tipos virales de AR (II).

Tipo de virus	Detección de CIN III	
	No	Si
<b>16 +/- otros virus</b>	79 (90,8%)	8 (9,2%)
<b>18 +/- otros virus</b>	13 (92,9%)	1 (7,1%)
<b>16+18</b>	11 (91,7%)	1 (8,3%)
<b>AR sin 16 o 18</b>	95 (96%)	4 (4%)
p=0,386		

Si agrupamos las infecciones producidas por los virus 16 y/o 18 con o sin otros virus frente a las infecciones producidas por otros virus de alto riesgo, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,16$ ) (Tabla 14).

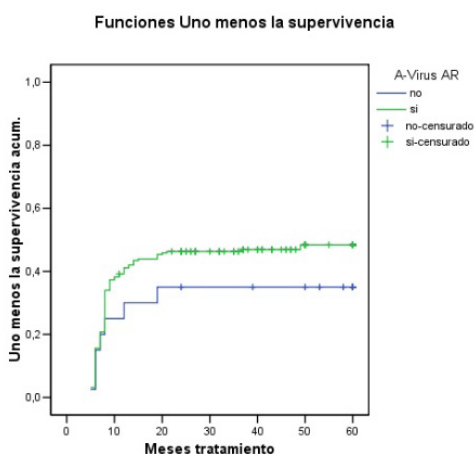
**Tabla 14.** Detección de CIN III diferenciando las infecciones producidas por los virus 16 y/o 18 y el resto de virus AR.

Tipo de virus	Detección de CIN III	
	No	Si
<b>16 y/o 18</b>	103 (91,2%)	10 (8,8%)
<b>AR no 16 ni 18</b>	95 (96%)	4 (4%)
$p=0,16$		

#### 4.5. Tratamiento de las lesiones

Se realizó tratamiento a 109 (46,9%) mujeres, de éstas se realizó una técnica de tipo destructivo en 59 casos (25,4%) y escisional en 50 (21,5%).

No encontramos diferencias en cuanto a la necesidad de tratamiento según el tipo de VPH utilizando la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (Fig. 17).



**Figura 17.** Necesidad de tratamiento según el tipo de VPH.

La mayoría de CIN III se diagnosticó al inicio del estudio, por lo que el mayor número de mujeres tratadas se concentra en los primeros meses de seguimiento.



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Genotipo viral y regresión de la lesión

El conocimiento del potencial carcinogénico individual de los diferentes tipos virales permanece limitado. Según nuestros resultados las lesiones producidas por virus de alto riesgo regresan en el 52,8% ( $p=0,513$ ). En las lesiones donde hemos detectado infección por el VPH tipo 16 con o sin otros virus de bajo riesgo, se produce la regresión en el 52,6%. Cuando detectamos VPH tipo 18 regresan en el 60%, en los casos que están presentes el virus 16 y 18 regresan en el 66,7% y cuando hay infección por un virus de alto riesgo diferente al 16 o 18 la regresión es del 54,5% ( $p=0,775$ ). Si analizamos las lesiones producidas por el VPH 16 y el 18 regresan en porcentaje similar a las causadas por los otros tipos virales de alto riesgo, 51,3% frente a 54,5% respectivamente ( $p=0,64$ ). Por lo tanto parece que el genotipado de los VPH 16 y 18 no es útil para pronosticar una menor regresión, aunque la precisión de estos porcentajes está limitada por el pequeño número de la muestra.

Si analizamos los otros tipos virales, cuando aparecen de forma aislada, obtenemos para el VPH 51 una regresión del 61%, para el VPH 53 un 62%, para el VPH 31 un 69% y para el VPH 33 un 17%. En caso de las infecciones por VPH 33 no podemos afirmar que la regresión sea menor porque el número de casos es reducido.

Cuando no se detecta virus, la regresión es del 75%; si el virus es de bajo riesgo regresan en la mitad de los casos y si es un virus adicional o desconocido en el 58,3%. Pero estos datos no resultan estadísticamente significativos ( $p=0,513$ ), probablemente por la escasa muestra. Creemos que dado que la citología con VPH negativo se considera un falso positivo de la citología, se podría decir que CIN I en biopsia con VPH negativo puede ser una sobre interpretación de la biopsia.

A. Bais et al. (98)irrespective of their HPV status, were monitored at 12 months; women with a high-grade lesion were monitored at 6 and 12 months. Fifty-one of the 105 women (49% estudiaron el riesgo que presentaban las mujeres con citología repetida de LIEBG de progresar a una lesión de alto grado cuando la prueba para el VPH daba negativa. Para ello realizaron el seguimiento de mujeres controladas por LIEBG en varios hospitales alemanes de 1999 a 2003. Incluyeron un total de 105 pacientes a quienes realizaron una colposcopia con biopsia y toma de muestra para analizar el ADN viral con la técnica de PCR y los cebadores GP5+/GP6+. Excluyeron a las mujeres que no entendían el idioma, a las embarazadas, a las menores de 30 años, a las mayores de 60 y a las que presentaban un linfoma no Hodgkin. Observaron un 49% de mujeres con VPH negativo; de éstas, 27 con biopsia negativa, y 23 con biopsia de CIN I no progresando en ningún caso a una lesión de alto grado. Por ello concluyeron que estas mujeres debían volver al cribado poblacional.

Respecto al genotipado de las lesiones de bajo grado hay pocos estudios que analicen la influencia del tipo viral detectado y la regresión de la lesión. La mayoría de ellos examinan los factores que influyen en la progresión de las lesiones de alto grado.

Una de estas pocas investigaciones corresponde al trabajo de Matsumoto (99). Se trata de un estudio multicéntrico de cohortes prospectivo. Incluye 905 mujeres controladas entre los años 1999 y 2007 por el grupo *Japan HPV and Cervical Cancer* (JHACC). Dicho grupo analizó mujeres procedentes de nueve hospitales remitidas por citologías con lesión intraepitelial de bajo grado. A estas pacientes se les realizó una nueva citología, colposcopia y toma de biopsia. Los criterios de inclusión seguidos exigían que tuvieran una citología con LIEBG evidente y una biopsia de CIN I o II, una edad comprendida entre los 18 y 54 años y ser la primera vez que se les diagnosticaba una infección a nivel cervical. Los criterios de exclusión se aplicaron a mujeres que al revisar la citología dieran ASCUS o LIEAG; que la biopsia no confirmara un CIN I, II y aquellas con menos de dos visitas. Incluyeron 540 mujeres y les aplicaron controles cada 3-4 meses con citología y colposcopia. Al inicio del estudio se tomó a todas las mujeres una muestra para la detección del VPH, se realizó una PCR utilizando los cebadores L1C1/L1C2+L1C2M y MY09/MY11. Concluyeron que la probabilidad de regresión en los dos años siguientes al comienzo del estudio para CIN I era del 64% en global; este porcentaje aumentaba al 75% para las infecciones con virus de bajo riesgo o VPH ADN negativas y disminuía al 59% con la presencia de virus de alto riesgo, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ). Si diferencian las lesiones donde detectan el tipo VPH 16 la regresión es del 65% ( $p=0,03$ ), para el tipo VPH 18 es del 70,1% ( $p=0,11$ ), para los tipos VPH 16 y 18 juntos del 65,9% ( $p=0,01$ ), para VPH 31 es del 50% ( $p=0,25$ ), para VPH 33 es del 35,7% ( $p=0,02$ ), para VPH 51 es del 55,1% ( $p=0,04$ ) y para virus de alto riesgo sin 16 ni 18 es del 57,3% ( $p=0,001$ ). En el caso de virus indeterminados es del 83,4% ( $p=0,82$ ). Si observan el riesgo que presentan las mujeres de progresar a CIN III durante los 5 años siguientes con la presencia de alguno de los siguientes VPH: 16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58 es de un 20,5%; para otros VPH de alto riesgo es de un 6% y para VPH negativo es de un 1,7% ( $p=0,0001$ ). Concluye que el genotipado de los tipos virales: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58, y no por separado del tipo 16 o 18, en las mujeres con LIEBG/CIN I-2 es útil, ya que las mujeres con infección por uno de estos tipos virales presentan mayor riesgo de progresar a CIN III en los 5 años ulteriores. Si comparamos estos porcentajes de regresión con los nuestros resultan similares. Sin embargo en nuestro estudio no encontramos significación estadística; lo que puede deberse a que el número de casos es menor que en su investigación. Los porcentajes de progresión no los podemos comparar ya que en nuestro estudio no controlamos las lesiones durante 5 años, si éstas no regresan en un período de tiempo menor se tratan.

En el estudio de Brisson (100) se investigan las similitudes entre los factores que afectan a las lesiones de alto grado con las de bajo grado. Incluyen 612 controles y cuatro grupos de casos, todos ellos estudiados con colposcopia y biopsia. El primer

grupo lo forman 548 mujeres con un CIN II o III; el segundo consta de 338 casos de CIN I, el tercero abarca 225 mujeres con signos de infección por VPH y el último incluye 6 pacientes con cáncer invasor de cérvix. Los años de estudio fueron 1988 y 1989. Respecto a la presencia de VPH tipo 16 en las lesiones de bajo grado encontraron un aumento escaso del riesgo relativo (RR=1,6; p=0,051), sin embargo en las lesiones de alto riesgo fue del 8.7, siendo estadísticamente significativo (p<0,0001).

En el estudio de Dal Bello (50) no se encontró mayor riesgo de progresión en las mujeres infectadas por VPH tipo 16 y/o 18 comparadas con las infectadas por otros tipos virales de AR. Para el tipo viral 16 se obtuvo una OR de 8.89 (4.49-17.58) y para el tipo viral 31 una OR de 17.13 (5.78-50.79).

Sin embargo, hay otros estudios que sí describen un mayor riesgo. Así, en el metaanálisis de Clifford (43) se obtuvo como resultado que las mujeres con LIEBG en citología y ADN-VPH positivo para el tipo 16 o el 18 tenían mayor riesgo de progresar a un carcinoma escamoso. Se llegó a esta idea porque en el 70% de los carcinomas se detectaron dichos virus, pero no porque los estudios demostrasen una mayor progresión de las lesiones con la presencia de estos virus.

A esta misma conclusión llegó la investigación de Castle (101) que encontró tres veces más riesgo de progresar a CIN III en las mujeres con CIN I en histología y VPH 16 positivo (22,1%) o VPH 18 (17,7%), respecto a otros VPH carcinogénicos (6,1%), por lo que sugiere mayor control en estas mujeres.

En el trabajo de Ho (102), encuentra que en las mujeres con CIN I cuyo resultado de la prueba de ADN viral da negativo a los 12 meses de seguimiento, tienen un riesgo menor de progresar a CIN III que las mujeres con VPH de AR (RR 2,26; p<0,001) o con VPH16/18 (RR 1.98; p=0,002) o con infecciones por múltiples tipos virales (RR 1,68; p=0,006). Estas tres investigaciones no las podemos comparar con nuestro estudio porque en nuestros casos, como se ha comentado, no se han dejado progresar las lesiones.

## 5.2. Detección de VPH. Infecciones simples y múltiples

En nuestro estudio en el 96,6% de las pacientes encontramos infección por VPH. De estas en el 53,9% se detectan múltiples tipos virales. Estos porcentajes tan elevados también se describen en otras investigaciones (50, 103).

La mayoría de lesiones CIN I están asociadas a infecciones por virus de papiloma humano de alto riesgo, pero la distribución de los tipos virales son diferentes a las asociadas a los casos de CIN II-III (43).

Si analizamos los tipos de VPH detectados en nuestros resultados el virus de alto

riesgo que aparece más frecuentemente es el VPH 16; se demuestra en un 43% de los casos. Este hecho se repite en la mayoría de los trabajos publicados aunque los porcentajes aportados para lesiones de CIN I (en histología) no son tan elevados como en nuestros casos (53, 101, 104). El segundo VPH detectado más frecuentemente en el mundo es el VPH 18 (20), sin embargo en nuestro estudio solo se demostró en un 11,2%, detrás del VPH 51(19,8%), VPH 53 (19%) y VPH 31 (13,8%). Nuestros descubrimientos son similares a los descritos por otros estudios (103,105). Una posible explicación es que la prevalencia de los diferentes tipos virales de VPH varía según la región estudiada (106), y que además se ha producido un incremento de la inmigración en los últimos años (107).

Dal Bello (50) estudia un total de 1323 mujeres, controladas por citología alterada, historia previa de lesión intraepitelial cervical, presencia de condilomas o vulvodinia. El seguimiento duró 3 años, del 2005 al 2007. Realizó colposcopia a 919 (69,5%) mujeres de las cuales 320 (35,2%) mujeres tenían un diagnóstico final de CIN I en histología. Para la detección del VPH utilizó la misma técnica que en nuestro trabajo, la PCR SPF10-LiPA. Su estudio no especifica los criterios de inclusión ni de exclusión. Detectó presencia de VPH en el 97,3% de las lesiones de CIN I, y de este porcentaje en el 63,1% la infección se produjo por múltiples tipos virales. De éstos los más frecuentes son el VPH 16, 31 y 52.

En el trabajo de Cobo (108) realizado en un hospital de Andalucía, se controlaron 135 pacientes con citología alterada del 2006 al 2007. Todas las pacientes se controlaban cada seis meses con citología durante tres años. Tomaban biopsia si así lo creían conveniente. Incluyeron pacientes que presentaban una citología alterada y excluyeron aquellas que no aceptaron el seguimiento. En 68 casos obtuvieron un resultado de CIN I tras biopsia. La detección del VPH la realizaron con PCR y el genotipado con hibridación de arrays (Clinical Arrays<sup>®</sup>). En las mujeres con CIN I detectaron infección en el 94,1%, de estas 19,1% por virus de bajo riesgo, 38,2% de alto riesgo, 16,2% de probable alto riesgo y en el 20,6% infección por múltiples tipos.

Contrariamente, en otros estudios el porcentaje de detección de infección por VPH en las lesiones de bajo grado fue menor (43,101). Clifford (295) realizó uno de los mayores metaanálisis encontrados en la literatura; incluyó un total de 55 estudios efectuados en todo el mundo de 1989 al 2004, que cuenta con 8308 casos de CIN I (en citología y/o biopsia). Detectó infección por VPH en 5910 mujeres, que corresponde al 71% de los casos. El método utilizado fue la PCR con los cebadores MY09/11, PGMY09/11, GP5+/6+ o SPF10. Este porcentaje está por debajo de nuestros resultados. Esta diferencia puede explicarse porque los estudios que incluye utilizan la PCR con cebadores con menor sensibilidad para detectar VPH sobre todo cuando los tipos virales son diferentes al 16 o 18. Además en la mayoría de estudios se utiliza la citología sin confirmación histológica, por lo que pueden ser falsos positivos de la citología y no haber enfermedad, por ello el ADN viral es negativo.



En la investigación de Castle (101) se utilizaron pacientes incluidas en el estudio ALTS. Su análisis se centró en las mujeres con LIEBG o ASCUS, que fueron diagnosticadas de CIN I en histología entre 1997 y 2001. Sumaron un total de 594 casos, su promedio de edad era de 24 años y, los comparó con 570 mujeres con biopsia negativa o sin biopsia (si no presentaban lesiones en la colposcopia), con una edad media de 23 años. En las mujeres con CIN I demostró la presencia de VPH de AR en el 81,1%. Para la detección de VPH se utilizó el sistema de captura de híbridos (HC2; Qiagen). Estas mujeres se controlaron durante dos años saliendo del estudio si se diagnosticaba un CIN II-III. Las diferencias con nuestro estudio son varias. Por una parte, la técnica que emplea no es tan sensible como la nuestra y además no permite detectar múltiples infecciones por VPH. Por otra parte, no diferencia las lesiones producidas por virus de bajo riesgo con las que no se detectan virus, y por último estas pacientes tienen una citología de LIEBG o ASCUS, mientras que en nuestro estudio pueden tener citologías desde ASCUS a LIEAG.

Se debate el riesgo que produce la presencia de varios tipos de VPH en una lesión cervical respecto a la detección de un solo tipo viral. En nuestro estudio no encontramos diferencias si las lesiones son producidas por uno o por varios tipos de VPH de alto riesgo. Exactamente como en nuestro trabajo, existen estudios donde no se demuestra una menor regresión si se detectan varios virus de alto riesgo (8, 49, 53, 105). Por el contrario, otros estudios sí encuentran relación, sobre todo cuando, formando parte de esta infección, se detecta el VPH 16 (50, 51, 99, 103). El mecanismo por el que se produce un incremento en el riesgo al presentar una lesión por múltiples tipos virales se postula que podría ser el incremento de la susceptibilidad del huésped, lo que se traduciría en el aumento de la persistencia de la infección. Otro planteamiento es que la presencia de múltiples virus podría deberse a un fallo en la inmunidad (109).

### **5.3. Método utilizado para la detección viral**

Se debe tener en cuenta que según la muestra utilizada, si es en citología o biopsia y según el método utilizado para la detección del VPH puede variar el número de virus detectados (110).

En nuestro estudio la técnica empleada ha sido una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los cebadores consenso SPF10 y realizando el genotipado mediante la hibridación reversa en tira (PCR-SPF10/LiPA). Ha resultado ser un método excepcional, incluso con tejido fijado en parafina (111) gracias al cual hemos identificado infección viral en el 96,6% de las muestras. Se podría pensar que este porcentaje tan elevado se puede deber a una contaminación de las muestras, pero en todos los experimentos se ha utilizado un control positivo y uno negativo para impedir que se produzca este error.

Además, este método permite identificar los genotipos de VPH de mayor relevancia conocidos con una alta sensibilidad analítica, especificidad y rapidez (50, 61, 62). Otro aspecto a destacar es el alto valor predictivo negativo (112) y el elevado número de infecciones múltiples obtenidas, en nuestra investigación, un 48%. En estudios como el realizado por Perrons (113) se destaca la utilidad de esta técnica para detectar infecciones por VPH de alto riesgo y por múltiples tipos virales. Sólo los investigadores que usan LiPA o Linear Array para el genotipado garantizan la mayor eficacia en la detección de los diferentes tipos virales (79). La desventaja que presenta este método en la práctica clínica habitual es que se necesita personal muy entrenado para su realización, se lleva a cabo con maquinaria específica y hay que minimizar los riesgos inherentes a la técnica de amplificación. Sería necesario un método sensible y específico, rápido, fácil y barato.

## 6. CONCLUSIONES

1. El genotipado del VPH en las lesiones CIN I, no proporciona información pronóstica sobre aquellas lesiones que tenderán a regresar en un mayor o menor porcentaje. Ni siquiera la detección de virus de alto riesgo, como el tipo 16 o 18, tienen relevancia pronóstica.
2. No se ha demostrado que el tipo específico de VPH, o la presencia de VPHs de alto o bajo grado, influyan en la regresión espontánea de las lesiones.
3. En las infecciones donde se detectan múltiples tipos virales tampoco se produce una mayor o menor regresión de las lesiones.
4. Nuestro estudio reafirma que el porcentaje de regresión de las lesiones CIN I es elevado, lo que permite realizar un control de estas pacientes y por lo tanto, un manejo conservador.
5. La mayoría de lesiones de CIN I están producidas por virus de alto riesgo y en la mitad de los casos se detectan múltiples tipos virales.
6. Los VPH más frecuentes detectados en CIN I son 16, 51 y 53.
7. Las infecciones producidas por los tipos virales 16 y/o 18 exclusivamente, no llegan al 25%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Insinga RP, Glass AG, Myers ER, Rush BB. (2007). Abnormal outcomes following cervical cancer screening: event duration and health utility loss. *Med Decis Mak.*; **27(4)**: 414-22.
2. Bosch FX. (2006). *Epidemiología de las infecciones por el virus del papiloma humano (VPH): riesgo de carcinoma cérvico-uterino y otros tumores anogenitales. Nuevas opciones preventivas. 4ª Monografía Sociedad Española de Epidemiología. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: Epidemiología y Prevención.* MADRID: EMISA.
3. Cox JT. (1995). Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. *Baillières Clin Obstet Gynaecol.* **9(1)**: 1-37.
4. Zur Hausen H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* **36(2 pt 2)**:794.
5. Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. (1978). Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori.* **64(5)**:549-53.
6. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* **370(9590)**:890-907.
7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* **189(1)**:12-9.
8. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* **55(4)**:244-65.
9. Parkin DM, Bray F. (2006). Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* **24 Suppl 3**: S3/11-25.
10. Schiffman MH. (1992). Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.*; **84(6)**:394-8.
11. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.*; **338(7)**: 423-8.

12. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Herrero R, Trivett M, et al. (2006). Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Res.* 66(22):11070-6.
13. Schiffman M, Kjaer SK. (2003). Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (31):14-9.
14. Lizano-Soberón M., Carrillo-García A., Contreras A. (2009). Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología.* 205-16.
15. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31):20-8.
16. Trottier H, Franco EL. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.*; 24 Suppl 1:S1-15.
17. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(6):485-90.
18. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 87(11):796-802.
19. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 26 Suppl 10:K1-16.
20. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.*; 348(6):518-27.
21. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 88(1):63-73.

22. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 11(11):1048-56.
23. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *J Am Med Assoc*. 2001; 285(23):2995-3002.
24. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJC, Ronderos M, et al. (2004). Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 190 (12): 2077- 87.
25. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2007). *IARC monographs on the evaluation of Human Papillomaviruses*. Lyon, France.
26. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:S3/1-10.
27. Delgado A. (2007). *Infección por VPH. Neoplasias y patologías asociadas. Prevención y vacunas*. Bilbao. Asociación Española de Pediatría.
28. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324(1):17-27.
29. Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. (1992). Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol*. 73 (Pt 10):2653-60.
30. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*. 3(5):1151-7.
31. Muñoz N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 19(1-2):1-5.
32. Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 88(13):5523-7.

33. Ferenczy A, Franco E. (2002). Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 3(1):11-6.
34. Puig-Tintoré LM.,Alba A., Bosch FX., Castellsague X. et al.(2002). *La infección por papilomavirus*. Madrid: Meditex-Sanex.
35. Ramzi S. Cotran, Stanley Leonard Robbins, Vinay Kumar, Tucker Collins. Patología estructural y funcional: Robbins. 6ª ed. Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A; 2000.
36. Rivera R., Delgado J., Painei V., et al. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 71 (2):135-40.
37. Moscicki A-B, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* 24 Suppl 3:S3/42-51.
38. Zur Hausen H, de Villiers EM. (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 48: 427-47.
39. Bayas JM., Torné A., García-Sicilia J., Alba A. (2009). Infección natural y vacunas frente al virus del papiloma humano: papel de los anticuerpos en la protección a largo plazo. *Progresos Obstet Ginecol.* 52: 281-93.
40. Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Bratti MC, et al. (2004). Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(2):324-7.
41. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. (1999). Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet.* 354(9172):20-5.
42. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 97(14):1072-9.
43. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. (2005). Human papillo-mavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(5):1157-64.

44. Safaeian M, Herrero R, Hildesheim A, Quint W, Freer E, Van Doorn L-J, et al. (2007). Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 Assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5,683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J Clin Microbiol.* 45(5):1447-9.
45. Ordi J, Puig-Tintoré LM, Torné A, Sanz S, Esteve R, Romagosa C, et al. (2003). Contribution of high risk human papillomavirus testing to the management of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Med Clínica.* 121(12):441-5.
46. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, et al. (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer.* 121(12):2787-93.
47. Carcopino X, Bolger N, Henry M, Mancini J, Boubli L, Olive D, et al. (2011). Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology. *J Med Virol.* 83(4):637-43.
48. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, Watkins-Riedel T, et al. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 92(3):873-80.
49. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, et al. (2004). Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol.* 57(1):68-72.
50. Bello BD, Spinillo A, Alberizzi P, Cesari S, et al. (2009). Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: Prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *J Med Virol.* 81(4):703-12.
51. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, et al. (2006). Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(7): 1274-80.
52. Chaturvedi AK, Dumestre J, Gaffga AM, et al. (2005), Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from three clinical settings. *J Med Virol.* 75(1):105-13.



53. Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, Passerini R, S, et al. (2009). Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: prevalence and distribution of different genotypes. *J Med Virol.* 81(2):271-7.
54. De Guglielmo Z, Rodríguez A. (2010). Methods used in the identification of human papillomavirus. *An Sist Sanit Navar.* 33(1):71-7.
55. Villa LL, Denny L. (2006). Chapter 7: Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International J Gynecol Obstet.* 94(Supplement 1):S71-S80.
56. Iftner T, Villa LL. (2003). Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (31):80-8.
57. Cavazza ME., Correnti M. (2004). Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades. *Dermatol Venez.* 42:6-10.
58. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. (1988). Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 167(1):225-30.
59. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, et al. (1996). Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 34(3):745-7.
60. Quint WG, Scholte G, van Doorn LJ, Kleter B, Smits PH, Lindeman J. (2001). Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF(10) PCR and HPV genotyping. *J Pathol.* 194(1):51-8.
61. Melchers WJ, Bakkers JM, Wang J, de Wilde PC, Boonstra H, Quint WG, et al. (1999). Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types. Clinical evaluation and follow-up. *Am J Pathol.* 155(5):1473-8.
62. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, et al. (1998). Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 153(6):1731-9.
63. de Sanjosé S., García AM. (2006). *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. 4ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología.* Madrid: EMISA.

64. Schiffman M, Wheeler CM, Dasgupta A, Solomon D, Castle PE, ALTS Group. (2005). A comparison of a prototype PCR assay and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus DNA in women with equivocal or mildly abnormal papanicolaou smears. *Am J Clin Pathol.* 124(5):722-32.
65. Puig-Tintoré LM, Cortés X, Castellsague X, Torne A, Ordi J. et al. (2006). Prevención del cáncer de cuello uterino, ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Progresos Obstet Ginecol.* 49(Supl2):5-62.
66. Cuzick J, Clavel C, Petry K-U, Meijer CJLM, Hoyer H, Ratnam S, et al. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer J Int Cancer.* 119(5):1095-101.
67. Cortés J., Martín-Torres F., Ramón y Cajal JM., et al. (2010). Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Progresos Obstet Ginecol.* 53 Supl 1:1-19.
68. IARC Hand books on Cancer Prevention. (2005).*Cervix Cancer Screening.* Lyon, France.
69. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, et al. (2009). HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med.* 360(14):1385-94.
70. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, et al. (2010). Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 11(3): 249-57.
71. Ratnam S, Franco EL, Ferenczy A. (2000). Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(9):945-51.
72. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, et al. (2003). Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet.* 362 (9399): 1871-6.
73. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. (2007). Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol.* 104(1):232-46.

74. Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, et al. (2006). The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res.* 66(21):10630-6.
75. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry K-U, Szarewski A, Munk C, et al. (2008). Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* 337:a1754.
76. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Hansson BG, et al. (2007). HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: a population-based prospective study. *Br J Cancer.* 97(1):129-32.
77. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al. (2004). Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 103(2): 304-9.
78. Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M. (2007). American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. *Am J Clin Pathol.* 127(3):335-7.
79. Van Hamont D, van Ham MAPC, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG. (2006). Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 44(9): 3122-9.
80. Malila N, Leinonen M, Kotaniemi-Talonen L, et al. (2013). The HPV test has similar sensitivity but more overdiagnosis than the Pap test--a randomised health services study on cervical cancer screening in Finland. *Int J Cancer.* 132(9):2141-7.
81. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. (2003). A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol.* 188(6):1393-400.
82. Schiffman M, Adriansa ME. (2000). ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Cytol.* 44(5):726-42.
83. Stoler MH. (2001). HPV testing is not useful for LSIL Triage--but stay tuned. *Adv Anat Pathol.* 8(3):160-4.

84. Solomon D, Schiffman M, Tarone R, ALTS Study group. (2001) Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 93(4):293-9.
85. Ronco G, Cuzick J, Segnan N, Brezzi S, Carozzi F, Folicaldi S, et al. (2007). HPV triage for low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Eur J Cancer Oxf Engl.* 1990. 43(3):476-80.
86. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D, et al. (2007). 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *J Low Genit Tract Dis.* 11(4):223-39.
87. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM. (2005). Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer.* 117(6):1007-12.
88. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. (2002). Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst.* 94(2):102-7.
89. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. (2004). Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 96(4):280-93.
90. Guo M, Lin C-Y, Gong Y, Cogdell DE, Zhang W, Lin E, et al. (2008). Human papillomavirus genotyping for the eight oncogenic types can improve specificity of HPV testing in women with mildly abnormal Pap results. *Mod Pathol.* 21(8):1037-43.
91. Wong AK, Chan RC, Nichols WS, Bose S. (2009). Invader human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 assays as adjuncts to HPV screening of cervical papanicolaou smears with atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer.* 115(4):823-32.

92. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 99: Management of abnormal cervical cytology and histology. (2008). *Obstet Gynecol.* 112(6):1419-44.
93. Jain S, Tseng CJ, Horng SG, Soong YK, Pao CC. (2001). Negative predictive value of human papillomavirus test following conization of the cervix uteri. *Gynecol Oncol.* 82(1):177-80.
94. Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J, Mol BW, Lammes FB, et al. (1996). Human papillomavirus DNA after treatment of cervical dysplasia: low prevalence in normal cytologic smears. *Cancer.* 77(12):2538-43.
95. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. (2005). Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol.* 99(3 Suppl 1):S7-11.
96. Paraskevaidis E, Koliopoulos G, Alamanos Y, et al. (2001). Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 98(5 Pt 1):833-6.
97. Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, et al. (2006). Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol.* 103(2):631-6.
98. Bais AG, Rebolj M, Snijders PJF, de Schipper FA, van der Meulen DAI, et al. (2005). Triage using HPV-testing in persistent borderline and mildly dyskaryotic smears: proposal for new guidelines. *Int J Cancer J Int Cancer.* 116(1):122-9.
99. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al. (2011). Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int J Cancer.* 128(12):2898-910.
100. Brisson J, Morin C, Fortier M, Roy M, Bouchard C, Leclerc J, et al. (1994). Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol.* 140(8):700-10.
101. Castle PE, Gage JC, Wheeler CM, Schiffman M. (2011). The clinical meaning of a cervical intraepithelial neoplasia grade 1 biopsy. *Obstet Gynecol.* 118(6):1222-9.

102. Ho GYF, Einstein MH, Romney SL, Kadish AS, Abadi M, Mikhail M, et al. (2011). Risk factors for persistent cervical intraepithelialneoplasia grades 1 and 2: managed by watchful waiting. *J Low Genit Tract Dis.* 15(4):268-75.
103. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, et al. (2005). Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 191(11):1796-807.
104. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, et al. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer.* 131(10):2349-59.
105. Ho GY, Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M, et al. (1998). HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 78(3):281-5
106. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 7(7):453-9.
107. González-Bosquet E, Esteva C, Muñoz-Almagro C, Ferrer P, Pérez M, Lailla JM. (2008). Identification of vaccine human papillomavirus genotypes in squamous intraepithelial lesions (CIN2-3). *Gynecol Oncol.* 111(1):9-12.
108. Cobo F, Concha A, Ortiz M. (2009). Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution in Females with Abnormal Cervical Cytology. A Correlation with Histological Study. *Open Virol J.* 3:60-6.
109. Moscicki A-B, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. (2004). Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and-uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis.* 190(1):37-45.
110. Castle PE, Porras C, Quint WG, Rodriguez AC, Schiffman M, Gravitt PE, et al. (2008). Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol.* 46(10):3437-45.
111. Odida M, de Sanjose S, Sandin S, Quiros B, Alemany L, Lloveras B, et al. (2010). Comparison of human papillomavirus detection between freshly frozen tissue and paraffin embedded tissue of invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer.* 5:15.

112. Rodríguez-Iglesias M. (2012). Molecular diagnosis of human papillomavirus: new challenges in a different scenario. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 30(5):223-4.
113. Perrons C, Kleter B, Jelley R, Jalal H, Quint W, Tedder R. (2002). Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J Med Virol*. 67(2):246-52.







Ciencias y Letras

