

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,

Anatomía Patológica y Educación Física y Deportiva



**TESIS DOCTORAL**

**UTILIDAD DEL DOBLE MARCADOR**

**INMUNOHISTOQUÍMICO p16/Ki-67**

**EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE**

**LESIONES PRENEOPLÁSICAS DE CUELLO UTERINO**

**Isabel María Jurado Navarrete**

**Málaga, 2015**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Isabel María Jurado Navarrete

 <http://orcid.org/0000-0001-7667-0586>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





Dpto de Fisiología Humana, Histología Humana  
Anatomía Patológica y Educación Física y Deportiva  
Facultad de Medicina  
Universidad de Málaga

**Dr. D. Miguel Ángel Olalla Herrera**, Profesor Asociado Clínico del Departamento de Bioquímica, Cirugía, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y Coordinador de la Unidad de Patología del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.

**Dra. D<sup>a</sup> María Victoria Ortega Jiménez**, Facultativo Especialista de la UGC de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga y Profesora Asociada Clínico del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

**Certifican:**

Que el trabajo de tesis doctoral realizado por **D<sup>a</sup> Isabel María Jurado Navarrete** ha sido ejecutado bajo nuestra dirección y lleva como título **“UTILIDAD DEL DOBLE MARCADOR INMUNOHISTOQUÍMICO p16/Ki-67 EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LESIONES PRENEOPLÁSICAS DE CUELLO UTERINO”**.

Que dicho trabajo versa sobre un tema original de investigación y tiene el suficiente rigor científico para que, de acuerdo con la normativa legal vigente, sea presentado en esta Facultad, al objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste a los efectos legales, expedimos la presente certificación.

Fdo. Dr. Miguel Ángel Olalla Herrera

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Victoria Ortega Jiménez

*A mi marido y mi hija*

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es un esfuerzo el cual, directa o indirectamente, requiere de la participación y colaboración de un equipo de personas sin las cuales este proyecto no hubiese sido posible. A todas ellas, que invirtieron su tiempo y sus conocimientos, y me ayudaron en este largo y difícil camino quiero agradecerles su apoyo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis el apoyo mostrado:

- Al Dr. Miguel Ángel Olalla Herrera, por brindarme esta oportunidad y otras muchas en mi camino laboral y personal, y por transmitirme día a día su entusiasmo, su capacidad de trabajo y su saber. Por su apoyo incondicional, sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.
- A la Dra. María Victoria Ortega Jiménez, quien me animó y confió en mí para llevar a cabo este proyecto, por transmitirme en todo momento su ilusión y su energía.

A la Dra. Martina Álvarez Pérez, Profesora del Dpto. de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga, por sus valiosos consejos, y por demostrarme que con esfuerzo y trabajo se puede alcanzar cualquier meta. Y a otros profesionales del Departamento, como María José Lozano León, por su trabajo en la realización de la técnica inmunohistoquímica.

A mi marido, Pepe, pilar fundamental en mi vida, fuente inagotable de energía y optimismo, que está siempre a mi lado, ayudándome a superar las dificultades. Gracias por tu cariño, por estar en los momentos difíciles y convertir los problemas en soluciones.

A mi hija, Paloma, por su amor, y llenar mi vida de besos y abrazos.

A mis padres, ejemplo y modelo vital, los primeros que inculcaron en mí el espíritu de trabajo y esfuerzo, sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A mis hermanos, que siempre han creído en mí y desde la distancia me han apoyado en todo.

Al Dr. Luis Cándor Muñoz, primero y al Dr. Agustín Eslava Martín después, directores de la UGC de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, que confiaron en mí y me alentaron en todo momento a lo largo de estos años.

A todos/as mis compañeros/as de la UGC de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, por su inestimable ayuda y estímulo prestado y, en especial, a Susana Pérez Rodríguez, por su maravillosa forma de ser y toda la colaboración prestada para conseguir finalizar el proyecto que empezamos juntas.

A María Dolores Garcés Chaves, auxiliar de enfermería de la consulta de Patología del TGI de dicho Hospital, por su buena predisposición, ha estado todo este tiempo escuchando los devenires del día a día de esta tesis, siempre apoyando y ayudando en todo lo posible, haciendo más liviano el peso del trabajo. Gracias por tu infinita paciencia y tu sonrisa permanente.

Quiero así mismo resaltar las facilidades y apoyo manifestado por los profesionales de la UGC de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, en la búsqueda de datos, muestras y material utilizados en esta memoria, y en especial al Dr. Carlos González Hermoso y a la Dra. Isabel Hierro Martín.

Hago extensivo mi más cordial agradecimiento a todo el Servicio de Documentación Clínica del mismo hospital por su esfuerzo, dedicación y comprensión hacia mi persona para con el cometido de finalizar dicha memoria.

Y en última instancia, a todas las personas que han contribuido a que este proyecto haya sido posible, quiero expresarles mi cariño y mi agradecimiento más sincero.

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

**ACOG:** American College of Obstetrician and Gynecologist

**ACS:** American Cancer Society

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AEPC:** Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia

**AGUS:** Atypical glandular cells of undetermined significance (células glandulares atípicas de significado incierto)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ASC-H:** Atypical squamous cells can not exclude HSIL (células escamosas atípicas de significado incierto sin poder descartar lesión escamosa intraepitelial de alto grado)

**ASC-US:** Atypicall squamous cells of undetermined significance (células escamosas atípicas de significado incierto)

**CIN:** Cervical intraepithelial neoplasia (neoplasia intraepitelial cervical)

**CIS:** Carcinoma in situ

**CCU:** Cáncer de cuello uterino

**CNE:** Centro Nacional de Epidemiología

**DIU:** Dispositivo intrauterino

**FDA:** Food and Drug Administration

**HC2:** Hybrid Capture 2 (Captura Híbrida 2)

**HE:** Hematoxilina-Eosina

**HSIL:** High grade squamous intraepithelial lesion (lesión escamosa intraepitelial de alto grado)

**HUVVM:** Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga

**IARC:** International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)

**IFCPC:** International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy

**LEC:** Legrado endocervical

**LEEP:** Loop electrosurgical excision procedure (gran escisión con asa de la zona de transformación)

**LLETZ:** Large loop excision of the transformation zone (gran escisión con asa de la zona de transformación)

**LSIL:** Low grade squamous intraepithelial lesion (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado)

**NS:** No significación estadística

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

**pRB o pRb:** Proteína del retinoblastoma

**SEAP:** Sociedad Española de Anatomía Patológica

**SEC:** Sociedad Española de Citología

**SEE:** Sociedad Española de Epidemiología

**SEGO:** Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

**SIL:** Squamous intraepithelial lesión (lesión intraepitelial escamosa)

**SIL-AG:** lesión intraepitelial escamosa de alto grado

**SIL-BG:** lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

**TGI:** Tracto Genital Inferior

**UEC:** Unión escamocolumnar

**VHS:** Virus del Herpes Simple

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VPH:** Virus del Papiloma Humano

**VPH-AR:** VPH de Alto Riesgo

**VPH-BR:** VPH de Bajo Riesgo

**VPN:** Valor predictivo negativo

**VPP:** Valor predictivo positivo

**WHO:** World Health Organization (OMS: Organización Mundial de la Salud)

**ZT:** Zona de transformación

# ÍNDICES

---

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. CÁNCER DE CUELLO UTERINO .....	2
1.1.Epidemiología .....	2
1.2.Mortalidad.....	5
2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	7
2.1.Estructura genómica del virus.....	7
2.2.Clasificación de los VPH.....	10
2.3.Prevalencia de la infección por el VPH .....	14
2.4.Transmisión de la infección por el VPH. Mecanismo de regulación del ciclo celular.....	17
2.5.Inmunidad de la infección VPH: interacción virus-huésped.....	21
2.6.Historia natural de la infección por VPH y carcinogénesis.....	24
2.7.Oncogénesis por VPH .....	31
3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN VIRAL.....	34
3.1.Métodos de prevención secundaria: cribado poblacional .....	34
3.1.1. Citología.....	34
3.1.2. Colposcopia.....	41
3.1.3. Estudio histológico.....	43
3.2.Métodos de detección del VPH.....	44
3.2.1. Métodos en los que no se realiza amplificación.....	46
-Captura de Híbridos.....	46
-Cervista® .....	46
3.2.2. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).47	
-Cobas® 4800.....	48
3.2.3. Métodos de detección de ARN-VPH.....	48

## ÍNDICES

-Aptima® .....	48
3.3. Marcadores moleculares de proteínas del ciclo celular.....	48
3.3.1. p16 <sup>INK4a</sup> (p16).....	49
3.3.2. Ki-67.....	50
3.3.3. Tinción dual p16/Ki-67.....	51
4. TRATAMIENTO DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL .....	54
4.1. Conización .....	55
4.2. Seguimiento postratamiento de la lesión escamosa de alto grado .....	56
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	61
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	61
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
1. ÁMBITO DE TRABAJO: POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	63
2. METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	65
2.1. Criterios de inclusión.....	65
2.2. Criterios de exclusión .....	65
3. RECOGIDA DE MUESTRAS .....	66
4. ESTUDIO CITO-HISTOLÓGICO CONVENCIONAL.....	67
5. DETECCIÓN DEL ADN DEL VPH POR TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	69
6. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: TINCIÓN DUAL p16 <sup>INK4a</sup> /Ki-67 (CINtec® PLUS)....	70
7. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS.....	73
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	80
8.1. Estadística Descriptiva.....	80
8.2. Estadística Analítica o Inferencial.....	81
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICES

1. DESCRIPCIÓN DE LOS DATOS DEMOGRÁFICOS Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA.....	83
1.1.Edad.....	83
1.2.Nacionalidad de las pacientes.....	86
1.3.Menopausia.....	87
2. DESCRIPCIÓN DE LOS COFACTORES Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA.....	88
2.1.COFACTORES DE ADQUISICIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH.....	88
2.2.COFACTORES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL.....	93
3. DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA.....	101
3.1.Diagnóstico citológico.....	101
3.2.Punch biopsia cervical dirigida por colposcopia.....	101
3.3.Diagnóstico molecular del VPH.....	103
3.4.Diagnóstico colposcópico.....	110
3.5.Diagnóstico anatomopatológico del cono.....	117
4. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE SEGUIMIENTO Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA.....	123
4.1.Tratamiento de la afectación de márgenes quirúrgicos.....	123
4.2.Persistencia de la infección por VPH postratamiento.....	124
4.3.Tiempo de seguimiento.....	129
5. DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p16/Ki-67 Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA, Y LA PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN VIRAL.....	130
5.1.Tinción dual y márgenes afectos.....	130
5.2.Tinción dual y márgenes indemnes.....	132
5.3.Tinción dual y persistencia del VPH-AR postcono.....	133
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>136</b>
1. CONSIDERACIONES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO ....	137
1.1.Edad.....	137

## ÍNDICES

1.2.Menopausia.....	137
2. CONSIDERACIONES SOBRE LOS COFACTORES DE ADQUISICIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH.....	138
2.1.Edad de inicio de las relaciones sexuales .....	138
2.2.Número de parejas sexuales .....	139
3. CONSIDERACIONES SOBRE LOS COFACTORES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENÉISIS CERVICAL.....	139
3.1.Hábito tabáquico .....	139
3.2.Paridad .....	140
3.3.Anticonceptivos hormonales.....	140
3.4.Inmunosupresión .....	141
4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS .....	141
4.1.Biopsia cervical .....	141
4.2.Infección por VPH y genotipo viral .....	141
4.3.Colposcopia .....	144
4.4.Diagnóstico anatomopatológico del cono.....	145
5. CONSIDERACIONES SOBRE LA PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN POR VPH POSTRATAMIENTO .....	147
6. CONSIDERACIONES SOBRE LA EXPRESIÓN DE p16/Ki-67 .....	148
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>150</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>152</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino estandarizadas por edad por 100.000 mujeres. (Fuente: GLOBOCAN 2008)<sup>4</sup> ..... 3

Figura 2. Estimación de tasas estandarizadas por edad de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix en España<sup>10</sup> ..... 4

Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix estandarizada por edad (x100.000) (según la población mundial)<sup>13</sup> ..... 5

Figura 4. Estructura genómica del VPH..... 7

Figura 5. Funciones de E6-E7. .... 9

Figura 6. Clasificación taxonómica de los papilomavirus<sup>26</sup> ..... 11

Figura 7. Prevalencia de la infección por VPH en distintas áreas geográficas en mujeres con citología normal<sup>39</sup> ..... 15

Figura 8. Distribución de los tipos de VPH en mujeres con citología normal, LSIL, HSIL y cáncer de cérvix en España<sup>45</sup> ..... 16

Figura 9. Ciclo vital de los VPH-AR en el epitelio cervical<sup>49</sup> ..... 18

Figura 10. Historia natural del cáncer cervical..... 24

Figura 11. Expresión de los oncogenes virales..... 31

Figura 12. Citología cervical..... 35

Figura 13. Sistema de Clasificación Bethesda<sup>120</sup> ..... 36

Figura 14. Recomendaciones de la SEGO 2010 para el cribado poblacional en mujeres no vacunadas ..... 38

Figura 15. Recomendaciones de la SEGO 2010 para el cribado poblacional en mujeres vacunadas ..... 39

Figura 16. Estrategias de cribado en función del subgrupo de edad. Guía de cribado del CCU 2014<sup>129</sup> ..... 40

Figura 17. Terminología colposcópica del cuello uterino de IFCPC 2011. .... 42

Figura 18. Terminología colposcópica del cuello uterino-apéndice de IFCPC 2011..... 43

Figura 19. Clasificación de ensayos para determinación de VPH<sup>134</sup> ..... 44

Figura 20. Mecanismo molecular de la sobreexpresión de p16. .... 50

## ÍNDICES

Figura 21. Célula positiva para tinción dual p16/Ki-67. ....	51
Figura 22. Algoritmo de actuación clínica en mujeres con prueba de detección del VPH positiva <sup>129</sup> .....	54
Figura 23. Algoritmo de seguimiento postratamiento de CIN. Oncoguía SEGO 2014 <sup>165</sup> .....	57
Figura 24. Identificación del genotipo mediante PCR seguida de hibridación en membrana. ....	69
Figura 25. Tinción dual p16/Ki-67. Principio de procedimiento. ....	70
Figura 26. Test dual p16/Ki-67. A. Negativo. B. Positivo. ....	71
Figura 27. Neoplasia Intraepitelial Cervical. ....	76
Figura 28. Distribución por edad (grupos etáreos). ....	84
Figura 29. Grupos de edad y lesión histológica cervical. ....	85
Figura 30. Distribución de la nacionalidad de las pacientes. ....	86
Figura 31. Estado menopáusico de las pacientes. ....	87
Figura 32. Histograma de la edad de inicio de las relaciones sexuales. ....	89
Figura 33. “Coitarquia” (años) y lesión histológica cervical. ....	91
Figura 34. Número de parejas sexuales. ....	92
Figura 35. Consumo de tabaco. ....	93
Figura 36. Hábito tabáquico y lesión histológica cervical. ....	94
Figura 37. Distribución del número de partos. ....	96
Figura 38. Utilización de anticoncepción hormonal .....	97
Figura 39. Estado de inmunosupresión. ....	99
Figura 40. Vacunación frente al VPH. ....	99
Figura 41. Lesión histológica y biopsia de cérvix. ....	102
Figura 42. Lesión histológica y resultados del diagnóstico molecular del VPH. ....	105
Figura 43. Genotipos del VPH preconización. ....	107
Figura 44. VPH en infecciones multigenómicas. ....	108
Figura 45. Distribución de los hallazgos colposcópicos. ....	111
Figura 46. Lesión histológica cervical y colposcopia. ....	111

## ÍNDICES

Figura 47. Localización horaria de las lesiones colposcópicas. ....	113
Figura 48. Localización por cuadrantes de las lesiones colposcópicas. ....	114
Figura 49. Lesión que alcanza endocérnix colposcópicamente.....	115
Figura 50. Lesión colposcópica que alcanza OCE y lesión histológica.....	116
Figura 51. Localización de la afectación de los bordes quirúrgicos. ....	117
Figura 52. Grado de lesión histológica y localización del margen quirúrgico afectado. ....	118
Figura 53. Lesión histológica y afectación glandular.....	120
Figura 54. Lesión histológica y legrado endocervical postconización.....	121
Figura 55. Cirujano responsable de la conización.....	122
Figura 56. Ampliación del tratamiento quirúrgico. ....	123
Figura 57. Persistencia de genotipos del VPH postconización.....	127
Figura 58. Tiempo de seguimiento.....	129
Figura 59. Tinción dual y grado de lesión histológica con márgenes afectos. ....	131
Figura 60. Tinción dual, persistencia de VPH postcono y grado de lesión histológica cervical. A: SIL-AG. B: SIL-BG.....	135

## ÍNDICES

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación epidemiológica de los papilomavirus <sup>30</sup> .....	13
Tabla 2. Cofactores de persistencia y progresión (carcinogénesis). .....	26
Tabla 3. Pruebas para la detección de VPH aprobadas por la FDA para su utilización en el cribado poblacional <sup>129</sup> .....	45
Tabla 4. Comportamiento diagnóstico de la tinción dual para CIN2+. .....	52
Tabla 5. Distribución de la muestra del test dual p16/Ki-67 en las conizaciones con bordes afectados. ....	79
Tabla 6. Parámetros descriptivos de la edad. ....	83
Tabla 7. Grupos de edad (frecuencia absoluta y relativa).....	83
Tabla 8. Descriptores de edad media de las pacientes por tipo de lesión.....	84
Tabla 9. Relación entre la edad (grupos etáreos) y lesión histológica. ....	85
Tabla 10. Nacionalidad de las pacientes. ....	86
Tabla 11. Relación entre lesión histológica y menopausia. ....	87
Tabla 12. Parámetros descriptivos de la edad del primer coito. ....	88
Tabla 13. Relación entre la edad de la primera relación sexual y lesión cervical. ....	90
Tabla 14. Parámetros descriptivos del número de parejas sexuales. ....	91
Tabla 15. Relación entre lesión histológica y número de parejas sexuales. ....	92
Tabla 16. Relación entre el grado de lesión cervical y consumo de tabaco.....	94
Tabla 17. Distribución de frecuencias del número de partos. ....	95
Tabla 18. Relación entre lesión histológica y número de partos. ....	96
Tabla 19. Relación entre el grado de lesión cervical y el uso de anticoncepción hormonal. ....	98
Tabla 20. Relación entre lesión histológica y estado inmunológico. ....	100
Tabla 21. Diagnóstico citológico.....	101
Tabla 22. Biopsia cervical dirigida por colposcopia.....	102
Tabla 23. Descriptores de infección por VPH .....	103
Tabla 24. Descriptores del tipo de infección VPH. ....	103

## ÍNDICES

Tabla 25. Relación entre el grado de lesión histológica y el resultado del riesgo del estudio molecular del VPH. ....	104
Tabla 26. Genotipos del VPH preconización (frecuencia absoluta y relativa). ....	106
Tabla 27. Lesión histológica cervical y genotipo del VPH.....	108
Tabla 28. Resultados del examen colposcópico.....	110
Tabla 29. Relación entre el grado de lesión histológica y los hallazgos colposcópicos. ....	112
Tabla 30. Tamaño de la lesión colposcópica.....	114
Tabla 31. Relación entre lesión colposcópica que alcanza endocérnix y grado de lesión histológica. ....	116
Tabla 32. Relación entre la lesión histológica y la localización de la afectación de los márgenes quirúrgicos.....	118
Tabla 33. Relación entre el grado de lesión histológica cervical y afectación glandular. ....	119
Tabla 34. Relación entre el grado de lesión histológica y legrado endocervical postconización. ....	121
Tabla 35. Descriptores de infección por VPH postconización.....	124
Tabla 36. Relación entre el grado de lesión histológica y el estudio molecular del VPH postconización.....	125
Tabla 37. Relación entre la persistencia del VPH postcono y grado de lesión histológica de cérvix. ....	126
Tabla 38. Genotipos del VPH postconización (frecuencia absoluta y relativa).....	127
Tabla 39. Lesión histológica cervical y persistencia de genotipos del VPH postratamiento.....	128
Tabla 40. Relación entre la tinción dual y el grado de lesión histológica con márgenes afectos. ....	130
Tabla 41. Relación entre la tinción dual y la localización de la afectación de los márgenes quirúrgicos.....	131
Tabla 42. Relación entre la tinción dual y el grado de lesión histológica con márgenes indemnes.....	132
Tabla 43. Relación entre tinción dual y persistencia de VPH postcono.....	133

## ÍNDICES

Tabla 44. Relación entre la tinción dual y el resultado del riesgo del estudio molecular del VPH postconización.....	134
Tabla 45. Distribución de la expresión de p16/Ki-67 con el grado de lesión histológica cervical y la persistencia del VPH postconización.....	135

# INTRODUCCIÓN

---

### 1. CÁNCER DE CUELLO UTERINO

Uno de los descubrimientos más importantes en la investigación etiológica del cáncer de los últimos 25 años ha sido la demostración de la relación causal entre la infección persistente por ciertos genotipos del VPH y el posterior desarrollo de cáncer de cuello uterino (CCU).

La evidencia científica acumulada a partir de estudios virológicos, moleculares, clínicos y epidemiológicos ha permitido demostrar y describir de forma inequívoca que el CCU es en realidad una secuela a largo plazo de una infección de transmisión sexual no resuelta, por genotipos oncogénicos del VPH<sup>1</sup>.

#### 1.1. Epidemiología

Los programas de screening del cáncer de cérvix han reducido la incidencia y la mortalidad del CCU en aquellos países en los que se han implantado<sup>2</sup>.

A pesar de ello, el cáncer de cérvix representa a nivel mundial el segundo cáncer más frecuente (tras el de mama) en mujeres entre 15 y 44 años, y la tercera causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres<sup>3</sup>.

Los casos de incidencia en la población femenina en el año 2010 han sido 585.278 y como causa de muerte se ha asociado a 327.899 mujeres<sup>4</sup>.

Cerca del 83% de los casos se producen en países en vías de desarrollo<sup>5</sup>, principalmente en Asia, África y Sudamérica, donde el cáncer cervical constituye el 15% del total de los cánceres femeninos.

Sin embargo, en los países industrializados el CCU supone alrededor del 3,6% de los nuevos casos de cáncer<sup>6</sup>.

Las tasas de incidencia de CCU varían entre las regiones del mundo (Figura 1)<sup>4</sup>: las tasas más altas están en las regiones del Este Africano, específicamente en Zimbabwe y Uganda con tasas de incidencia estandarizada por edad (TEE) de 47.3 y 45.8 casos por 100.000 mujeres respectivamente; y en América Latina, donde la ciudad de Trujillo en Perú reporta el nivel más alto en el continente (43.9 por 100.000); mientras que las tasas de incidencia más baja se han encontrado en Israel y en Egipto (2.4 y 2.1 por 100.000)<sup>7, 8</sup>.

## INTRODUCCIÓN

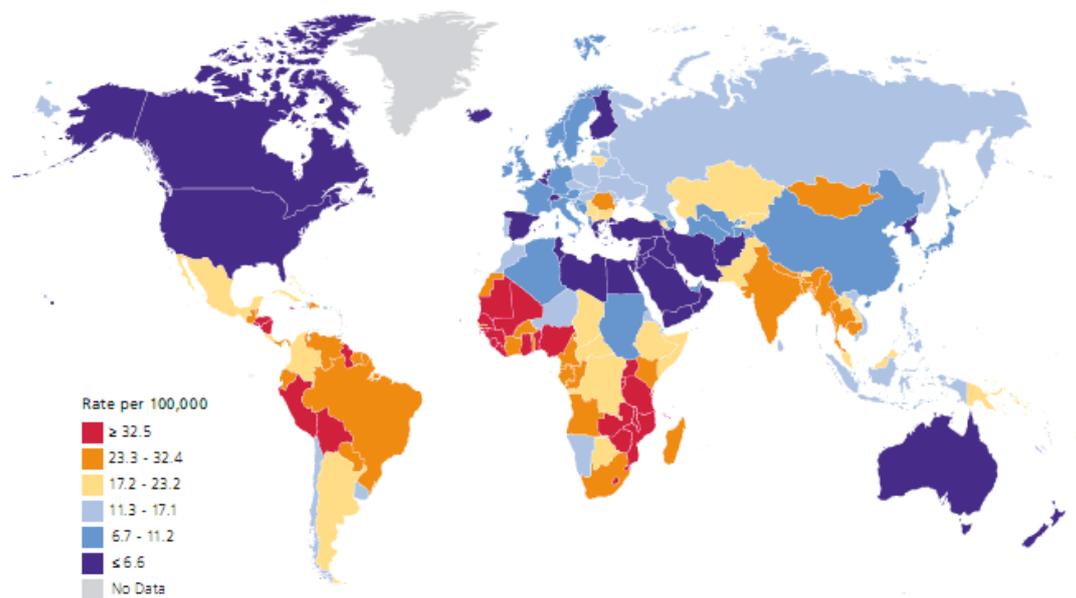


Figura 1. Tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino estandarizadas por edad por 100.000 mujeres. (Fuente: GLOBOCAN 2008)<sup>4</sup>.

Las tasas de incidencia son muy variables entre los distintos países de Europa, así pueden oscilar desde los 4.7 casos/100.000 mujeres en Finlandia y los 27.4 casos por 100.000 mujeres en Serbia y Montenegro<sup>3,9</sup>.

En general las tasas más bajas se encuentran en los países del Norte de Europa, mientras que las más altas se observan en los países del Sur y Este de Europa, Serbia y Montenegro, Bosnia, Albania, Rumania y Bulgaria.

En España la tasa de incidencia estimada es de unos 8.2 casos por 100.000 mujeres, siendo una de las menores dentro de la Unión Europea, después de Finlandia, Malta, Grecia, Holanda e Irlanda.

En España los tumores genitales representan alrededor del 16% de los cánceres de la mujer. Y dentro de los mismos, el orden de frecuencia coloca en primer lugar al cáncer de endometrio (6,7%), en series actuales es seguido del cáncer de ovario (4.7%) y del cáncer de cérvix (4.5%).

La incidencia de CCU en España se halla en el segmento bajo europeo, con una tasa poblacional media de 7,6 por 100.000/año (Figura 2)<sup>10</sup>, según los datos comunicados por los registros de cáncer españoles a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) dependiente de la Organización Mundial de la Salud

## INTRODUCCIÓN

(OMS)<sup>11, 12</sup>. La tasa más alta ha sido comunicada por el registro de Asturias (11.5 por 100.000 mujeres/año; tasa ajustada por edad: 7,1 por 100.000 mujeres/año) y la más baja por el de Zaragoza (6.5 por 100.00 mujeres/año; tasa ajustada por edad: 4.1 por 100.000 mujeres/año).

En Andalucía, sólo se dispone del registro de Granada, que ha comunicado a partir de datos obtenidos en el periodo comprendido entre 1998 y 2002 una incidencia de 8.1 por 100.000 mujeres/año (tasa ajustada por edad: 6.0 por 100.000 mujeres/año).

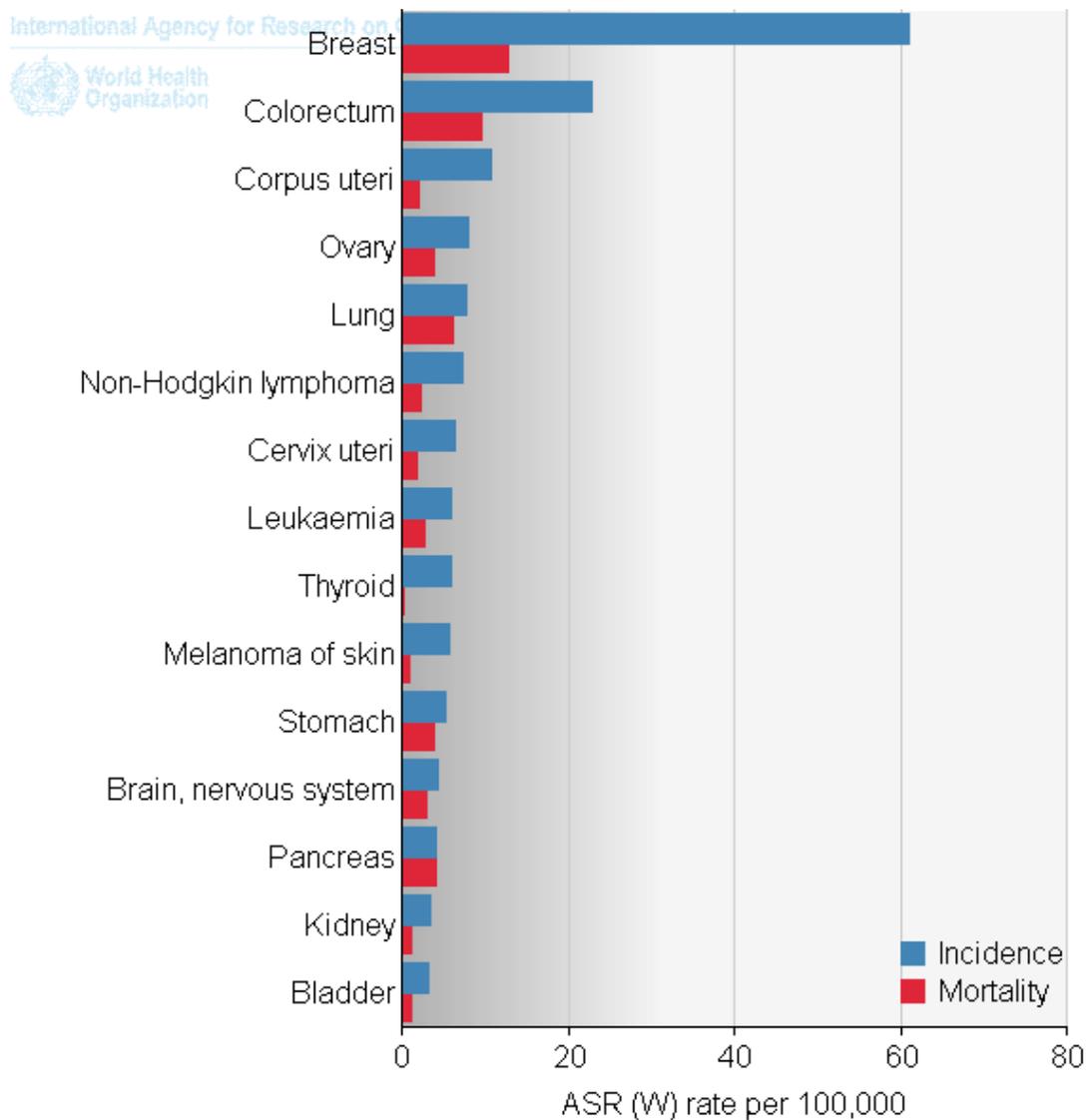


Figura 2. Estimación de tasas estandarizadas por edad de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix en España<sup>10</sup>.

## 1.2. Mortalidad

Las tasas de mortalidad son sustancialmente inferiores a la incidencia. En todo el mundo, la relación entre mortalidad e incidencia es del 52% (Figura 3)<sup>13</sup>. El CCU es responsable de unas 280.000 muertes en el mundo y un 85% de ellas ocurren en países en vías de desarrollo.

El cáncer de cérvix en Europa es la séptima causa de mortalidad por cáncer, pero en las mujeres de 18 a 45 años, es la segunda causa.

En la Unión Europea se estima que este tumor fue responsable de unas 16.000 muertes en el año 2004<sup>14</sup>.

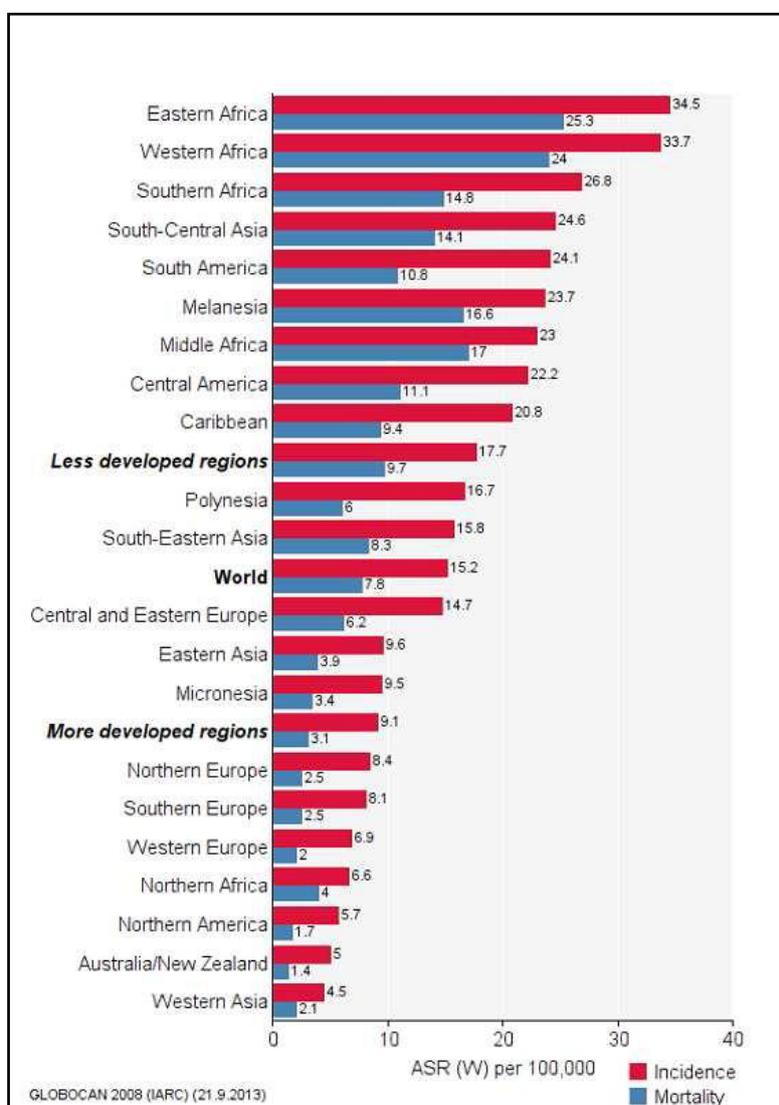


Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix estandarizada por edad (x100.000) (según la población mundial)<sup>13</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En España las tasas de mortalidad por cáncer ajustadas a población europea han sido publicadas por el Centro Nacional de Epidemiología (C.N.E.) en el proyecto Ariadna<sup>15</sup>. La media española de mortalidad por CCU en el año 2007 fue de 2.1 por 100.000 mujeres.

Dentro de España la tasa de mortalidad varía según las Comunidades Autónomas. Melilla tiene una de las mayores tasas (7.11 muertes/100.000 mujeres), seguida de Canarias, Asturias, Baleares y Galicia (3 muertes/100.000 habitantes entre los años 1996 y 2000).

La mortalidad por CCU ajustada a la población europea en las provincias andaluzas es la siguiente: Granada (0.97/100.000 mujeres), Córdoba (1.13/100.000 mujeres), Cádiz (1.70/100.000 mujeres), Sevilla (1.70/100.000 mujeres), Málaga (1.76/100.000 mujeres), Almería (2.04/100.000 mujeres), Jaén (2.71/100.000 mujeres) y Huelva (4.49/100.000 mujeres)<sup>16</sup>.

Las tasas de supervivencia son muy variables a nivel mundial. Así en Estados Unidos la tasa de supervivencia a los 5 años se sitúa en torno al 72%<sup>2</sup>, en Europa en el 63%<sup>17</sup> y en África la supervivencia a los 5 años supone sólo el 30.5%<sup>18</sup>.

En Europa la supervivencia es variable entre los diferentes países, siendo significativamente mayor en los países del Norte y por el contrario sensiblemente menor en países como Polonia, Portugal o España<sup>17</sup>.

La revisión de los datos aportados por casi 50 registros, europeos entre los años 1988 y 1999 ha permitido analizar la evolución de la supervivencia a este tumor. Globalmente la supervivencia ha mejorado en toda Europa pasando del 64.8% hasta el 66.1%. Aún así, cabe destacar que en los últimos años se ha producido una ligera disminución debida al incremento del riesgo observado entre las mujeres mayores<sup>19</sup>.

## 2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

### 2.1. Estructura genómica del virus

Los papilomavirus humanos (VPH), miembros de la familia Papovaviridae, son pequeños virus de 55-60 nm de diámetro. Presentan una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros. Su ADN es circular, de doble cadena, de 8.000 pares de bases (Figura 4). Su estructura genómica es compartida por los más de 100 tipos secuenciados. Consta de varios genes u ORF (“Open Reading Frames”) de dos tipos diferentes: hasta ocho genes de expresión temprana (E1-E8) (“Early”), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral; y dos genes de expresión tardía (L1, L2) (“Late”) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside. Una región de control, denominada LCR (“Long Control Region”) o URR (“Upper Regulatory Region”), será la encargada de controlar la expresión de los genes E6 y E7<sup>20</sup>.

### VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO HPV

#### Estructura genómica y función de las proteínas virales

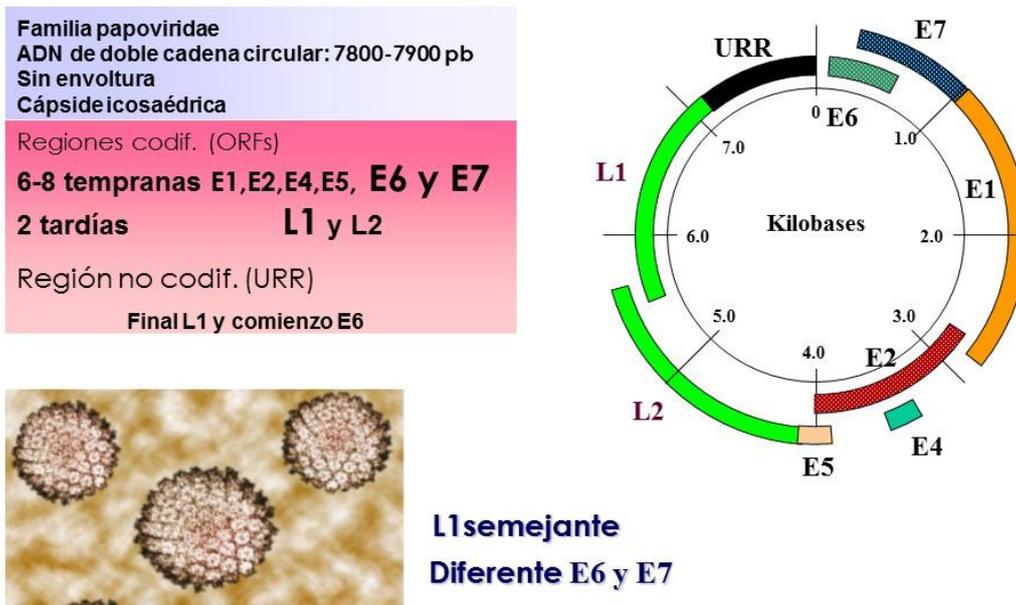


Figura 4. Estructura genómica del VPH.

### CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL VPH

#### Elementos genómicos no codificadores:

- Región larga de control (**LCR**) o región reguladora no codificante (**URR**): constituye el 15% del genoma viral. No codifica proteínas pero contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales.

**Región temprana:** representa el 45% del genoma. Tiene hasta ocho regiones de lectura abierta (E1-E8) que codifican las proteínas no estructurales, cuya función es controlar la replicación del ADN viral.

- **E1:** es una proteína con actividad ATPasa y ADN helicasa. Es necesaria para la replicación del ADN viral y el control de la transcripción.
- **E2:** es el principal regulador de la transcripción de los genes virales, se une al promotor transcripcional como un dímero. Además E2 reprime a los promotores p97 (VPH 16) y p105 (VPH 18), encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7 (oncogenes virales), reduciendo la síntesis de las mismas. Interfiere en la síntesis de la proteína p53, lo que produciría finalmente la detención del ciclo celular en G1 y la apoptosis.
- **E3:** es una proteína cuya función no se conoce, solo está presente en algunos tipos de VPH.
- **E4:** se fusiona con regiones de E1 formando la proteína mixta E1-E4. Interviene en el ciclo celular en G2, a través de la unión a ciclinas y quinasas dependientes, alterando el soporte estructural del citoesqueleto.
- **E5:** se localiza principalmente en la membrana citoplasmática de la célula huésped, interactuando con algunos factores de proliferación celular.
- **E6:** interfiere con la función de numerosas proteínas celulares. La unión de E6 del VPH de alto riesgo a p53 conduce a la degradación de esta última; en ausencia de p53 los reguladores negativos del ciclo celular no se expresan y la proliferación celular sigue incluso en condiciones inadecuadas, lo que conduce a mutaciones y anomalías cromosómicas.
- **E7:** induce la proliferación celular no programada; activa los reguladores positivos del ciclo celular e inhibe reguladores negativos y supresores de



## INTRODUCCIÓN

**Región tardía:** corresponde al 40% del genoma. Consta de dos genes (L1-L2).

- **L1:** es la proteína mayor de la cápside viral, se autoensambla en capsómeros y cápside. Interactúa con L2 y con receptores de la célula.
- **L2:** es la proteína menor de la cápside viral, interactúa con el ADN. Se cree que facilita el ensamblaje del virión y puede interactuar con receptores de las células.

Mientras que los genes de expresión temprana, (E), difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de VPHs, los genes de expresión tardía, (L), 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 de “consenso” al contrario de la detección “tipo específica” que utilizará genes con alta variabilidad entre tipos como E6 y E7<sup>24</sup>.

### 2.2. Clasificación de los VPH

La familia de los VPH cuenta con más de 118 tipos diferentes (aislados y secuenciados) de los cuáles, aproximadamente 40, se asocian a infecciones del tracto genital y 12 son clasificados como carcinogénicos<sup>25</sup>.

Dado el rápido incremento en el número de VPH aislados que se han demostrado de forma clara, se ha necesitado una clasificación taxonómica dentro de la familia *Papillomaviridae* la cual fue realizada por de Villiers en el año 2004<sup>26</sup>. Esta clasificación intenta cubrir tres objetivos:

- ✓ Establecer una relación entre los distintos tipos de virus del papiloma.
- ✓ Poder comparar el término de tipo de papiloma virus contra el término taxonómico “especies” y “genero”, los cuáles se usan de forma sistemática por todos los organismos biológicos y frecuentemente se aplica en virología.
- ✓ Poder investigar entre la clasificación taxonómica y biológica y las propiedades patológicas del virus.

## INTRODUCCIÓN

Es problemático correlacionar los grupos filogenéticos con la terminología taxonómica tradicional y las propiedades virales. De forma específica a veces hay coincidencia con las propiedades patológicas y biológicas, pero esto no ocurre siempre. La evolución de los tipos se ha debatido de forma extensa por varios autores<sup>27-29</sup>. Los estudios comparativos se realizan usando la proteína E6, L1 o bien combinando E6-E7-L1 ORFs.

La comparación de las secuencias entre el genoma completo de los 118 VPH revela una gran diversidad entre virus, pero se ha encontrado una distribución similar comparando las secuencias L1 y ORF, lo que ha dado tres niveles de clasificación taxonómica nombrándolos como género, especies y tipos. Este grupo de trabajo utilizó la clasificación estándar del *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) que le condujo a una interpretación oficial de grupos filogenéticos como tipos de VP, “géneros” y “especies” respectivamente. Taxonómicamente se denominan géneros Alfa, Beta, Gamma, Delta, Épsilon, que corresponden a genotipos humanos del VPH (Figura 6).

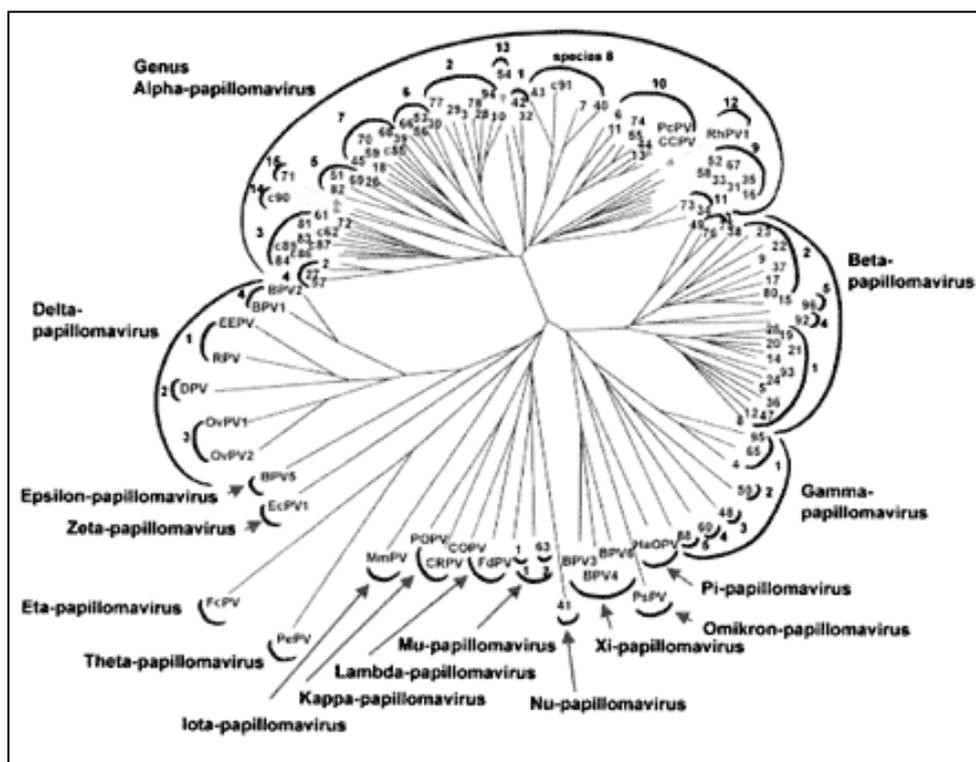


Figura 6. Clasificación taxonómica de los papillomavirus<sup>26</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Los tipos de papilomavirus, tanto humanos como animales, que se conocen hasta el momento, forman 16 géneros distintos, 5 de ellos están compuestos exclusivamente por VPH y papilomavirus identificados en monos, y los otros géneros contienen tipos encontrados en varios mamíferos.

El género clínicamente más importante es el conocido como Alfa-papilomavirus, el cual contiene todos los VPH asociados con lesiones mucosas y genitales que emergen de grupos originalmente llamados VPH “genitales” o “mucosos”. Los Beta-papilomavirus incluyen todos los tipos de VPH asociados con epidermoplastia verruciforme cutánea.

Filogenéticamente existe un nivel por debajo del género y por encima del tipo de VPH que es la **especie**. El término no es usado por los investigadores. Todos los VPHs del género Alfa-papilomavirus forman 15 especies.

Un ejemplo de especie es el número 9 que se agrupa con los tipos VPH 16, 31, 33, 35, 52, 58 y 67; de todos ellos el más estudiado es el 31 que comparte similitud biológica y propiedades clínicas con el VPH 16. En la especie 7 se ubica el VPH 18.

La clasificación epidemiológica realizada por Muñoz<sup>30</sup> en el año 2003 está basada en un trabajo sobre once estudios en el que participan 9 países, donde se analiza la prevalencia del VPH mediante la presencia de ADN viral por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y comparando los genotipos entre casos-contróles y pacientes. El resultado fue la identificación de 15 genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82 y 73). Hay 3 genotipos (26, 53 y 66) que son considerados como probables alto riesgo. Doce genotipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) son considerados como bajo riesgo y 3 genotipos (34, 57 y 83) se asocian a riesgo indeterminado.

Cuando se compara con el grupo filogenético se observa una discrepancia entre dos genotipos de VPH: el VPH 70, clasificado filogenéticamente como alto riesgo, pero calificado en la clasificación epidemiológica como bajo riesgo; y el genotipo VPH 73, el cual fue clasificado como un bajo riesgo filogenéticamente pero genotipo de alto riesgo epidemiológicamente.

## INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Clasificación epidemiológica de los papilomavirus<sup>30</sup>  
(en función de su riesgo de transformación neoplásica).

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

\*Probable Alto riesgo.

Esta clasificación epidemiológica tiene una importante implicación para la puesta en marcha de estrategias de cribado, mediante detección de ADN de VPH sobre todo para los genotipos de alto riesgo.

En función de su tropismo se clasifican en cutáneos y mucosos. Los primeros se detectan en lesiones como verrugas cutáneas, en enfermos con epidermoplastia verruciforme y en algunos cánceres de piel no melanoma. En relación con su potencial oncogénico, los mucosos se clasifican de alto (VPH-AR) y de bajo riesgo (VPH-BR).

Datos procedentes de 11 estudios de casos y controles realizados en diferentes países han identificado genotipos virales de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82); y de bajo riesgo (6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 70, 72, 81 y 84)<sup>31, 32</sup>. El 6 y 11 son responsables de verrugas genitales o condilomas acuminados. De los VPH-AR los más comunes son el 16, detectable en el 60% de todos los cánceres, siendo también el más persistente. De otro 10% son responsables el 18, 31 y 45, éste último principalmente responsable de los carcinomas invasivos de presentación temprana, sobre todo en mujeres jóvenes, y otros presentes en lesiones invasivas como son el 33, 35, 52 y 58<sup>25</sup>.

### 2.3. Prevalencia de la infección por el VPH

El VPH representa la infección de transmisión sexual más frecuente. Su prevalencia es muy elevada en varones y en mujeres jóvenes sexualmente activos. En la segunda década de la vida se estima una prevalencia del 20-25%, pero en algunos grupos de adolescentes o de mujeres jóvenes la infección llega a afectar hasta un 70% de individuos<sup>33</sup>. En la tercera década la prevalencia disminuye, y a partir de los 35 años se mantiene estable en unos valores próximos al 5%<sup>34</sup>.

La detección de los tipos de VPH mediante técnicas de PCR presenta una gran variabilidad en la población general, según la edad y la situación geográfica, tal y como se ha puesto de manifiesto en un análisis combinado llevado a cabo por la IARC<sup>35</sup>, y en un meta-análisis de estudios publicados<sup>36</sup>.

En mujeres asintomáticas de la población general, la prevalencia de infección por VPH oscila entre un 2% y un 44%<sup>37</sup>.

Un meta-análisis reciente ha estimado la prevalencia del VPH en mujeres con resultados normales en la citología de Papanicolaou a partir de datos procedentes de 78 estudios publicados<sup>36</sup>. La prevalencia total ajustada es del 10.41%, con una variabilidad regional considerable que varía desde un 8.08% en Europa hasta un 22.12% en África. Se estima que alrededor de 105 millones de estas infecciones serán debidas a los tipos 16 o 18.

El análisis combinado de la IARC<sup>35</sup> utilizó el mismo método de PCR para evaluar muestras recogidas sistemáticamente en todo el mundo y sus resultados corroboran, en general, estas observaciones.

Los resultados de otro meta-análisis también ponen de manifiesto que la prevalencia es máxima en mujeres jóvenes y disminuye en los grupos de mediana edad<sup>38</sup>.

Un estudio de prevalencia de infección por VPH en mujeres con resultados citológicos normales, realizado en 5 continentes<sup>39</sup>, destaca una prevalencia global estimada del 11.7% (Figura 7).

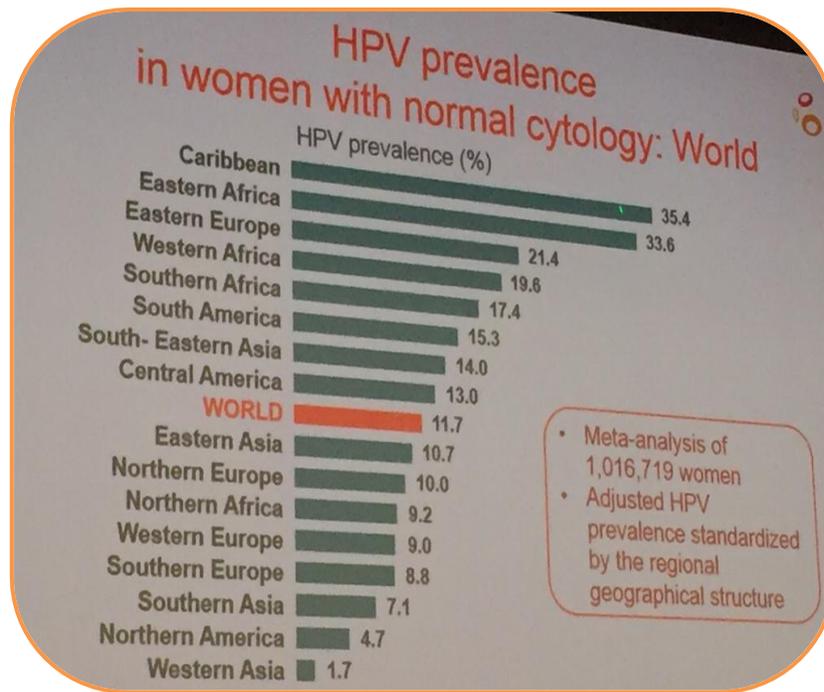


Figura 7. Prevalencia de la infección por VPH en distintas áreas geográficas en mujeres con citología normal<sup>39</sup>.

Se estima que los tipos 16 y 18 son responsables del 70% de casos de CCU en todo el mundo. La prevalencia relativa del VPH 18 es más importante en el adenocarcinoma que en el carcinoma escamoso de cérvix<sup>40</sup>.

En el estudio CLEOPATRE<sup>41</sup>, diseñado para medir la prevalencia de la infección por VPH, con una muestra de 3.200 mujeres españolas entre 18 y 65 años, se obtuvo una prevalencia global en este grupo de edad del 14%.

Si se calcula este porcentaje para el grupo de edad entre 19 y 25 años el valor aumenta a un 25-30%.

En Málaga, la prevalencia del VPH en mujeres climatéricas de más de 50 años con citología normal es del 11.43%<sup>42-44</sup>. El genotipo más frecuente fue el VPH 16 seguido del VPH 58, 51 y 18. Este pico de infección en mujeres alrededor de la menopausia puede ser debido a una reactivación de infecciones latentes, causadas por una pérdida gradual de la inmunidad o por infecciones nuevas que ocurren en el período perimenopáusico.

## INTRODUCCIÓN

La Figura 8 muestra la distribución de los tipos de VPH en mujeres con citología normal, LSIL, HSIL y cáncer de cérvix en España, según el estudio publicado por el ICO *HPV Information Centre*<sup>45</sup> en Marzo de 2015.

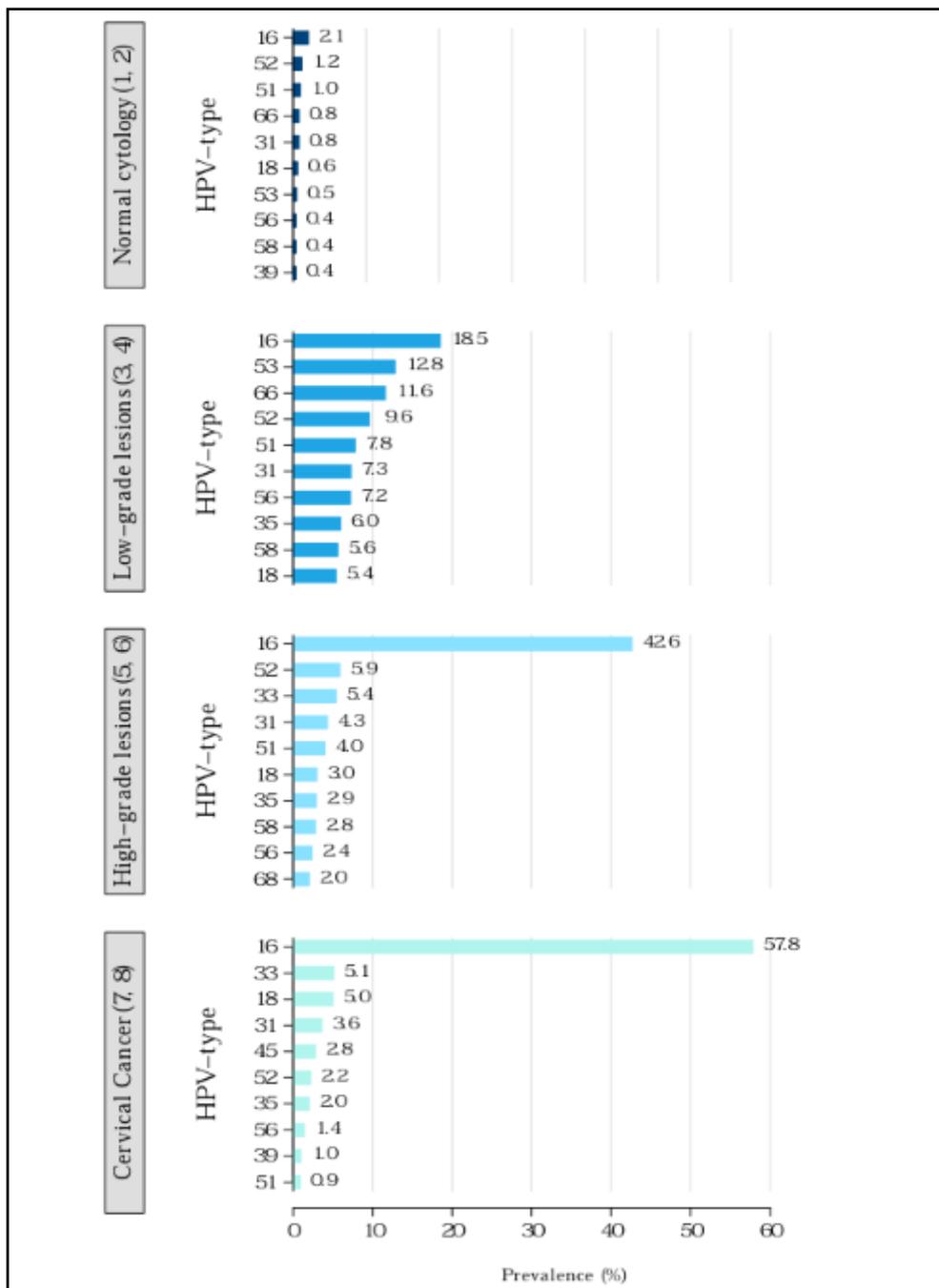


Figura 8. Distribución de los tipos de VPH en mujeres con citología normal, LSIL, HSIL y cáncer de cérvix en España<sup>45</sup>.

Datos actualizados al 12 Diciembre 2014.

High-grade lesions: CIN-2, CIN-3, CIS o HSIL; Low-grade lesions: LSIL o CIN-1.

### **2.4. Transmisión de la infección por el VPH. Mecanismo de regulación del ciclo celular**

El virus se transmite con facilidad por contacto sexual, probablemente a través de erosiones mínimas o imperceptibles de la piel o las mucosas. Aunque la transmisión coital sea probablemente la vía más frecuente de contagio del cuello de útero, en las mujeres con relaciones homosexuales<sup>46</sup> se han presentado infecciones del área anogenital y una extensión a partir de ésta, por autoinoculación, a otra localización del epitelio del tracto genital, como el cuello uterino.

Es probable que el contacto sexual explique las vías de exposición a una infección por el VPH por contacto y entrada a la zona de transformación<sup>47</sup>.

Por razones desconocidas, se suele iniciar el proceso oncogénico en estas áreas denominadas “zonas de transformación” que corresponden a la zona de transición del epitelio escamoso del exocérnix a epitelio glandular endocervical. La situación anatómica de esta región es dinámica, según la edad, respecto de la posición que ocupa en el canal endocervical. Estas son áreas de epitelio glandular, expuestas a un medio (región exocervical) que no es el habitual, en las que un tipo de epitelio entra en contacto con otro y lo sustituye progresivamente, realizando esta adaptación mediante un proceso de transformación denominado metaplasia. El cuello uterino, el ano y las amígdalas son ejemplos de zonas de transformación susceptibles de carcinogénesis. El virus se introduce en el epitelio a través de varios mecanismos: micro-trauma durante la relación sexual o mediante contacto directo con piel u objetos infectados. En el embarazo y en el período perinatal es posible el paso del VPH de forma ascendente y vertical.

El virus infecta a células del estrato basal, algunos virus tienen un estado latente, donde hay poca replicación viral, manteniendo el genoma en estado silente o con poca expresión génica, aprovechando la maduración del epitelio donde el virus se replica de manera masiva (de 50 a100 copias)<sup>48</sup>.

El ciclo vital de los VPHs se encuentra estrechamente ligado al programa de diferenciación de su célula huésped. El epitelio escamoso está formado por 20 o 30 capas de células, de las cuales solamente la capa basal más interna se divide de forma activa.

## INTRODUCCIÓN

Los VPHs al igual que otros virus, aprovechan la dinámica celular para replicarse, y en el cérvix se benefician de la maduración del epitelio metaplásico para poder expresar sus genes de forma secuencial; en primer lugar en las capas basales son los genes tempranos (E1...E7) y después en las capas superficiales más diferenciadas se expresan sus proteínas tardías (L1 y L2), que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que se liberan y repiten el ciclo infeccioso. En las capas intermedias, tanto células como virus se replican en tándem, sin haber amplificación de las copias del virus y con poca expresión de los genes anteriores.

Tras la infección, el virus se establece en las células basales, en forma de episomas (DNA no integrado), con algunas decenas de copias de genoma viral por célula que se replican coordinadamente con la replicación celular. Cuando las células emigran hacia estratos superiores y se diferencian, la replicación celular cesa, pero en algunas formas de infección, el genoma viral se amplifica en las células escamosas superficiales hasta llegar a varios miles de copias por célula. Además, al llegar a estos estratos altos, y sólo en ellos, se activan los genes tardíos, dando lugar a la producción de proteína de la cápside con aparición de viriones completos (Figura 9)<sup>49</sup>.

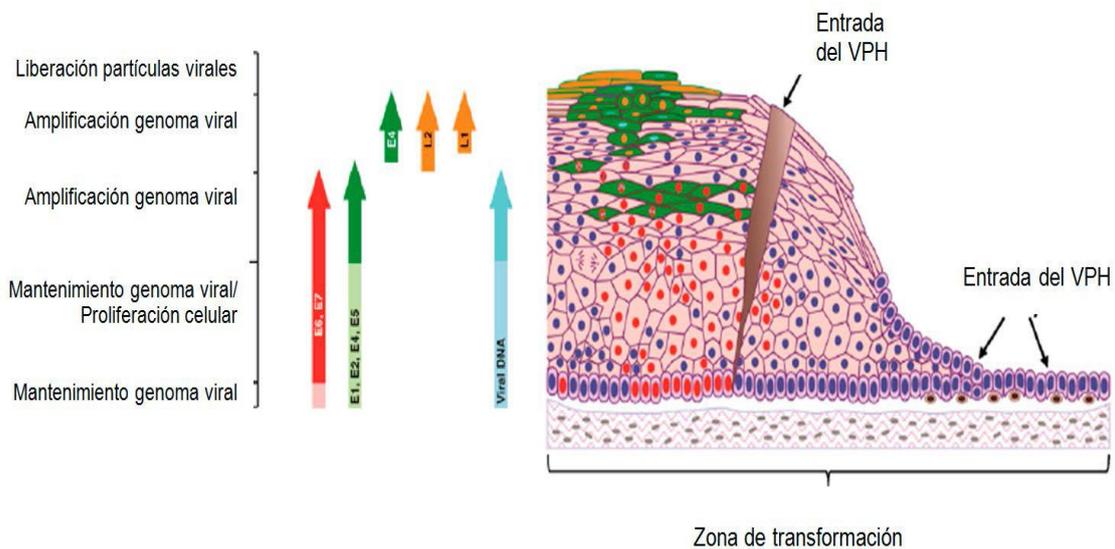


Figura 9. Ciclo vital de los VPH-AR en el epitelio cervical<sup>49</sup>.

En las capas superiores, donde el epitelio es diferenciado, el virus se amplifica sin replicación celular, llegando a alcanzar 1.000 copias de genoma viral por célula. En este momento, comienzan a expresarse los genes de las proteínas estructurales (L1 y L2), así como el de la proteína E4, produciéndose el ensamblaje de la cápside del virus.

## INTRODUCCIÓN

Las células superficiales en las que se acumulan numerosos viriones completos muestran características morfológicas peculiares y reciben el nombre de coilocitos.

También se admite que el virus puede permanecer latente en las células basales del epitelio<sup>50</sup>. El virus infecta la célula, produciendo lesiones en un período de tiempo que puede durar de semanas a meses, induciendo una replicación viral sin viremia detectable, ya que las células dianas finales son los queratinocitos diferenciados<sup>51</sup>. Estas células están destinadas a descamarse en el estrato superficial del epitelio, donde no se producen señales de peligro obvias que alerten al sistema inmune, por lo que las lesiones no van acompañadas de inflamación. Tras la infección, se pueden detectar anticuerpos circulantes contra la proteína viral de la cápside L1, con tendencia decreciente en las 2-3 semanas siguientes, manteniéndose niveles bajos de anticuerpos estables y detectables a lo largo del tiempo. La seroconversión confiere inmunidad tipo-específica frente a futuras infecciones, habiéndose descrito cierto grado de inmunidad cruzada entre distintos genotipos virales<sup>52</sup>.

En el tracto genital, el VPH se transmite por contacto piel con piel, o mucosa con mucosa, teniendo ciertos genotipos especial tropismo tanto en mujeres como en hombres. Ello da lugar a infecciones subclínicas de la piel en la región genital, las cuales pueden ser detectadas por técnicas que identifiquen la presencia/ausencia de ADN del virus.

Una pequeña proporción de estas infecciones pueden manifestarse como enfermedad benigna o maligna. En el tracto genital femenino, puede causar condilomas acuminados, lesiones precancerosas o lesiones cancerosas. El VPH se implica también en la etiología del cáncer anal, vulvar, vaginal, y carcinomas de cabeza y cuello. De los más de 100 genotipos de VPH asociado a infecciones, aproximadamente 40 se asocian a infecciones del tracto genital femenino<sup>26, 53</sup>.

La inmunidad celular contra la infección viral es crítica en el control y aclaramiento del VPH y por tanto, en el desarrollo, persistencia y/o progresión de las lesiones displásicas<sup>54</sup>. Las células de Langerhans son las encargadas de presentar los antígenos virales a los queratinocitos, produciéndose una respuesta inmune contra la infección<sup>55</sup>.

### COFACTORES DE ADQUISICIÓN

El riesgo de infectarse por el VPH está relacionado con el comportamiento sexual: edad del primer coito, número de compañeros sexuales y relaciones sexuales con compañeros que tienen o han tenido múltiples parejas sexuales.

- **EDAD DEL PRIMER COITO:** las características histológicas de la zona de transformación escamoso-cilíndrica en el exocérvix de las mujeres jóvenes, pueden explicar el mayor riesgo de infección entre las mujeres que inician tempranamente la actividad sexual<sup>56</sup>.

La inmadurez cervical, las deficiencias de flujo cervical protector y la ectopia cervical aumentada pueden conducir a una mayor susceptibilidad para la adquisición de una infección por el VPH en mujeres adolescentes y adultas jóvenes.

- **NÚMERO DE COMPAÑEROS SEXUALES:** la asociación entre el número de parejas sexuales y la probabilidad de detectar ADN del VPH en el tracto genital inferior es consistente. El tiempo que transcurre entre una pareja y otra, es otro factor influyente, ya que existe más riesgo de infección si el lapso de tiempo entre una pareja y otra es corto<sup>57</sup>.
- **OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL** como Chlamydias, herpes, VIH actúan como cofactores en el desarrollo de lesiones preneoplásicas y CCU. El VIH se asocia tanto a la prevalencia, como a la progresión de infecciones por VPH a lesiones neoplásicas del tracto genital inferior (TGI) y del canal anal. Las pacientes portadoras de VIH tienen más riesgo de infección por el VPH (RR: 17) y 9 veces más riesgo de desarrollar cáncer de cérvix. Es debido a las modificaciones que se producen en la inmunidad general y local de estas pacientes.
- La **CIRCUNCISIÓN MASCULINA** actúa como factor protector frente a la infección, se asocia con un menor riesgo de infección por VPH y con menor riesgo de transmisión y progresión a cáncer de cérvix en sus compañeras sexuales<sup>58</sup>.

## INTRODUCCIÓN

- El uso del **PRESERVATIVO** durante el contacto sexual es una barrera que disminuye la posibilidad de contagio, pero no se previene por completo la transmisión del VPH<sup>59</sup>.
- **CONTACTO SEXUAL CON INDIVIDUOS DE RIESGO:** prostitutas, parejas que tienen a su vez múltiples compañeras/os sexuales.

### 2.5. Inmunidad de la infección VPH: interacción virus-huésped

La presencia de partículas virales en la superficie del epitelio cervical o del TGI procede del contacto sexual con una pareja infectada. En la mayoría de las ocasiones, estas partículas virales son eliminadas de forma mecánica al ser arrastradas durante la descamación propia del epitelio estratificado, o bien por los agentes de la inmunidad inespecífica como los macrófagos. En ambos casos las partículas virales pasan desapercibidas a los agentes de la vigilancia inmune específica y no provocan efecto citopático ni respuesta inmunológica alguna.

El VPH, por ser un patógeno intracelular estricto, requiere internalizarse en la célula huésped para que se considere una infección verdadera.

La interrelación entre VPH y huésped es compleja y variada. En el caso del VPH no se ha encontrado un receptor celular específico que permita atajar la infección por bloqueo del mismo. Además, diferentes estudios han demostrado que la molécula de superficie que sirve de unión a los VPH está muy conservada y parece tener otra serie de funciones celulares vitales que hace imposible su utilización como diana para el bloqueo de la infección. Al contrario de lo que ocurre en otras especies virales, no parece que los receptores de superficie estén implicados en la especificidad de tejido y especie ni en el tropismo de los VPHs.

Tanto el reconocimiento de la infección viral por la célula huésped como el tropismo específico de cada subtipo viral van a determinar los efectos citopáticos en los tejidos específicos.

### INMUNIDAD CELULAR E INMUNIDAD HUMORAL

La inmunidad celular está representada principalmente por los linfocitos T que actúan a nivel del tejido local mediante íntimo contacto célula a célula. La respuesta humoral, por el contrario, viene mediada por las células B bajo la inducción de las células T *helper*. Los productos biológicamente activos de las células B son los anticuerpos (Ac), quienes serán los efectores de la respuesta inmune. Tanto las células T como los Ac tienen en común su actividad frente a los focos donde un antígeno extraño está presente, las diferencias radican en que, mientras las células T reconocen ese antígeno asociado a moléculas de la superficie celular, HLA (*human leukocyte antigen*), los Ac lo hacen tanto frente a antígenos presentados en superficie como frente a antígenos en forma soluble, en este último caso con mayor especificidad. A nivel molecular, los receptores de las células T, TCR (*T-Cell Receptor*) reconocen secuencias específicas de pequeños péptidos asociados o presentados por el propio complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), mientras que los Ac no reconocen secuencias peptídicas sino estructuras estéricas, tridimensionales, con una conformación determinada<sup>60</sup>.

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

En el epitelio cervical existen células específicas con capacidad de actuar como presentadoras de antígenos, son las células dendríticas de Langerhans, aunque algunos queratinocitos también desarrollan esta capacidad. Estas células fagocitan las partículas virales para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con HLA de clase II, CD40 y B7, así como la migración a los ganglios linfáticos locales.

Estas células activadas serán reconocidas por linfocitos T CD4+, que serán activados, únicamente, si existe reconocimiento de todas y cada una de las moléculas de superficie implicadas: HLA de clase II a través del propio CD4, el polipéptido viral mediante el TCR, CD40 a través de CD40-ligando y B7 mediante CD28.

## INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T CD4+ activados, evolucionarán hacia linfocitos *helper* (Th) en el contexto local de expresión de ciertas interleuquinas (IL), de modo que, si predomina la de tipo IL-12, se promoverá la diferenciación hacia una vía Th1 que inducirá la activación y proliferación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos (CTL+8) y la producción de IL-2 e Interferón- $\gamma$  fundamentalmente; por el contrario si en el contexto local no se expresa IL-12, se promoverá la vía Th2 que inducirá la activación y expansión de linfocitos B, los cuales evolucionarán, diferenciándose, hacia células plasmáticas productoras de Ac frente a las proteínas virales; por otra parte, se inducirá expresión de interleuquinas del tipo IL4, IL5, IL6, IL10...

Una vez activados, los linfocitos T citotóxicos deberán reconocer a las células infectadas, esta vez en el contexto del HLA de clase I, de lo contrario no se producirá el proceso de expansión clonal necesario para la elaboración de una respuesta inmunológica eficaz.

Los CTL+8 tendrán la capacidad de actuar frente a la infección viral establecida mientras que las células B plasmáticas producirán anticuerpos que actuarán frente a los antígenos virales de origen externo que sean expuestos durante ésta y las sucesivas infecciones por VPH<sup>61, 62</sup>.

La infección y el crecimiento viral vegetativo son completamente dependientes del ciclo de diferenciación del queratinocito. Evidencias clínicas han demostrado que la expresión génica viral está confinada al queratinocito o a células con potencial para la maduración escamosa. El tiempo para desarrollar una infección por el virus suele ser de tres semanas, tiempo requerido para que los queratinocitos basales completen la diferenciación y descamación. El periodo entre infección y aparición de lesiones es altamente variable y puede desarrollarse desde semanas a meses. En estas infecciones no suele producirse muerte citopática o citolisis como consecuencia de la replicación viral, ensamblaje o liberación de partículas virales porque los queratinocitos son células destinadas a morir y descamarse lejos de los lugares de vigilancia inmune. Los queratinocitos cargados de virus tienden a morir por “causas naturales”, por ello estas infecciones no se acompañan de inflamación y no hay señales obvias de daño celular o alerta del sistema inmune por la presencia del virus<sup>63, 64</sup>.

## 2.6. Historia natural de la infección por VPH y carcinogénesis

El curso habitual de la infección por el VPH tiende hacia la curación espontánea. Si la infección inicial no se resuelve y se hace persistente puede iniciarse un proceso de oncogénesis que puede inducir lesiones escamosas intraepiteliales (CIN) de varios grados (CIN1, CIN2, CIN3/carcinoma “in situ” (CIS)), muchas de ellas reversibles, y a más largo plazo la aparición del carcinoma invasor de cuello uterino (Figura 10).

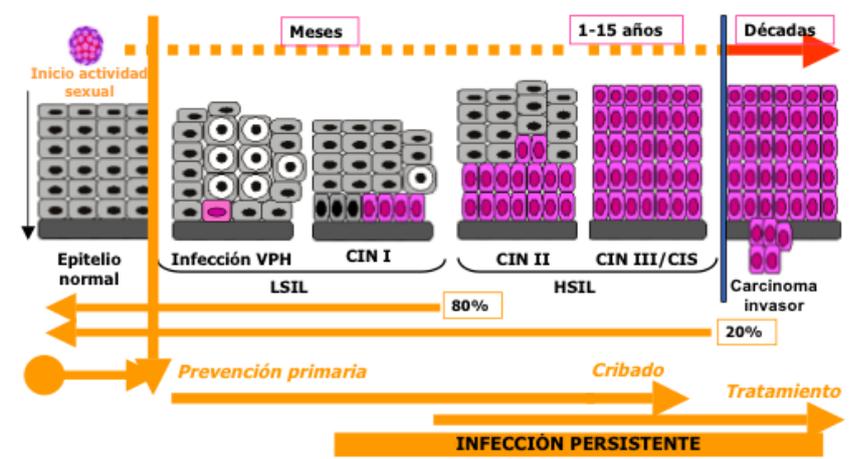


Figura 10. Historia natural del cáncer cervical.

Es importante destacar que las tasas de regresión de las lesiones CIN son muy elevadas; así, el 80% de las mujeres en estadios iniciales (LSIL, CIN1) durante el primer año y hasta el 90% de forma acumulada al final del segundo año, consiguen eliminar la infección y normalizar el epitelio cervical. Sólo el 20% de las lesiones CIN2/3 y CIS regresan a la normalidad.

Un 25% de las mujeres con infecciones transitorias por el VPH muestran cambios citopáticos propios de las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL, cambios por VPH, CIN1) detectables en la citología<sup>65</sup>.

Se ha observado que la CIN1 remite con particular frecuencia, en especial en adolescentes y mujeres jóvenes, en las que a los 12 meses han remitido el 61% de las lesiones y a los 36 meses la remisión es del 91%<sup>66</sup>. La probabilidad de remisión es menor en edades más avanzadas<sup>67</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En una revisión de la literatura médica sobre la historia natural de la CIN se muestra que las lesiones de CIN1 remiten espontáneamente en el 60% de los casos, persisten en el 30%, progresan a CIN3 en el 10%, y a invasión en el 1%<sup>68</sup>.

Los análisis virológicos parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por el VPH precede a la remisión de los cambios citológicos<sup>69</sup>. Al año, la tasa acumulada de aclaramiento de la infección por el VPH-AR en las mujeres con CIN1 fue del 29%, lo que permitió predecir la regresión de los cambios morfológicos a la normalidad en la citología convencional. Todas las mujeres que aclararon la infección por el VPH-AR lo hicieron a los 40 meses de seguimiento. La tasa de aclaramiento disminuye con la mayor gravedad de la lesión intraepitelial. Estos datos indican que puede evitarse el sobretratamiento de las mujeres con citología de LSIL mediante un período de seguimiento que permita el aclaramiento de la infección por el VPH-AR y la remisión de la lesión.

La duración media de la infección por el VPH varía según los distintos estudios entre 6-12 meses<sup>70</sup> y 2 años<sup>71</sup>. La duración es mayor en los VPH-AR que en los de bajo riesgo<sup>72</sup>. La duración de la infección es difícil de determinar ya que puede variar si es de adquisición reciente (infección incidente) o bien si no se conoce el momento de la adquisición (infección prevalente), añadiendo además posibles reinfecciones.

La persistencia de la infección es mucho menos frecuente que su aclaramiento. No hay acuerdo sobre el tiempo necesario para considerar una infección como persistente. En la práctica, la persistencia se define como la detección del mismo genotipo viral en dos o más determinaciones durante un período de uno a dos años. La persistencia de la infección durante seis meses suele ocurrir en el 50% aproximadamente de las mujeres infectadas con citología normal, y tras 5 años de seguimiento solo persisten un 7%<sup>70</sup>. El factor de riesgo más significativo para predecir la persistencia de la infección es la presencia del ADN del VPH en las células del epitelio cérvico-vaginal<sup>51</sup>.

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han evidenciado que la persistencia de la infección por tipos de VPH-AR es imprescindible para el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado con fenotipo neoplásico (HSIL: CIN2 y CIN3) y cáncer invasivo<sup>1, 73, 74</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La transformación tumoral requiere la evasión de la respuesta inmune, lo que conduce a la persistencia de la infección. La incapacidad del sistema inmune para resolver la infección en un plazo de tiempo corto o medio, generalmente menor de dos años, aumenta las posibilidades de que exista un daño celular continuado y como consecuencia un proceso de susceptibilidad a la neoplasia. La persistencia de la infección por encima de este plazo constituye un factor de riesgo demostrado y necesario para la transformación celular<sup>50, 75</sup>. La persistencia de infección cervical por un VPH oncogénico durante un año multiplica por 3 el riesgo relativo de desarrollar una lesión de alto grado.

La infección por el VPH-AR se considera una causa necesaria, pero no suficiente, del cáncer cervical. Aunque la infección por VPH es muy frecuente en la población, la mayoría la aclaran y no progresan a cáncer de cérvix. Por lo tanto, es necesario que otros cofactores intervengan en el proceso de carcinogénesis cervical, que modulan el riesgo de progresión de la infección por VPH a cáncer<sup>57</sup>.

Las características de la actividad sexual se vinculan con la probabilidad de contraer la infección por el VPH, pero no se consideran relacionadas con la progresión a cáncer.

Los **COFACTORES DE PROGRESIÓN**, favorecedores de la persistencia de la infección por el VPH se clasifican en medioambientales, virales y del huésped (Tabla 2).

Tabla 2. Cofactores de persistencia y progresión (carcinogénesis).

<b>EXÓGENOS O MEDIOAMBIENTALES</b>	<b>VIRALES</b>	<b>HUÉSPED</b>
Hábito tabáquico	Genotipo	Inmunosupresión
Anticonceptivos hormonales	Variantes del VPH	Hormonas endógenas
Alta paridad	Carga viral	Factores genéticos
Otras ITS	Integridad viral	
Factores nutricionales	Coinfección	

- **COFACTORES MEDIOAMBIENTALES O EXÓGENOS:**

- **HÁBITO TABÁQUICO:** en mujeres infectadas por el VPH, el tabaco es el cofactor más importante de progresión, con un aumento del riesgo de 2-4 veces de padecer lesiones precancerosas y cáncer cervical<sup>76-79</sup>, frente a las no fumadoras. Este aumento de riesgo se ha identificado también en las fumadoras pasivas<sup>80</sup>. Éste hecho puede deberse al aumento de sustancias carcinogénicas derivadas de la nicotina en el moco cervical que se ha encontrado en mujeres fumadoras<sup>81</sup>, y a la alteración en la inmunidad local del cuello uterino. Se ha descrito una disminución de las células de Langerhans, de CD8 y de linfocitos totales en las mujeres que reducen el número de cigarrillos/día<sup>82</sup>. Además, se ha observado que en las fumadoras hay mayor expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-C)<sup>83</sup>, lo que se traduce en una mayor persistencia de la infección por el VPH.
- **ANTICONCEPTIVOS HORMONALES:** hay evidencias importantes indicando que las mujeres VPH positivas que toman anticonceptivos durante 5 años o más, tienen un aumento significativo del riesgo de padecer CIN3 y cáncer de cérvix. El riesgo aumenta casi 3 veces en aquellas que lo han tomado entre 5 y 9 años, y más de 4 veces en aquellas que lo tomaron más de 10 años<sup>84</sup>. El riesgo disminuye 8 años después de haberlos suspendido. Se postula que las hormonas podrían influenciar en la progresión de las lesiones promoviendo la integración del ADN del VPH en el genoma del huésped, lo que provocaría la desregulación de la expresión de E6 y E7. En un meta-análisis<sup>85</sup> con más de 20.000 mujeres de diversos países, se ha concluido que el uso del **DIU** se asocia con un riesgo significativamente menor de CCU, reduciendo la probabilidad de desarrollar carcinoma de células escamosas en un 44% y adenocarcinoma o carcinoma adenoescamoso en un 54%. Entre las posibles explicaciones de este efecto protector del DIU, los autores señalan que el proceso de inserción o de retirada del dispositivo destruye las lesiones precancerosas, o que el dispositivo induce una inflamación crónica de la mucosa y una respuesta inmune de larga duración, reduciendo así la probabilidad de progresión del VPH.

## INTRODUCCIÓN

- **ALTA PARIDAD:** estudios caso-control relacionan la alta paridad con CIN3 y carcinoma de cérvix. Las mujeres con 3 o 4 embarazos tienen un riesgo 2.6 veces más alto de presentar cáncer que las nulíparas, y las mujeres con 7 o más partos tienen un riesgo 3.8 veces mayor<sup>86</sup>.  
Los factores hormonales asociados con el embarazo, el traumatismo cervical en el parto y la mayor persistencia de la zona de transformación exocervical podrían explicar esta asociación.
- **OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL:** los agentes de transmisión sexual más estudiados y para los que se ha demostrado alguna asociación con el cáncer de cérvix son Chlamydia trachomatis<sup>87-90</sup>, virus de Herpes simple tipo 2 (VHS-2)<sup>91</sup> y VIH. Es probable que el aumento del riesgo de cáncer asociado al VHS-2 y a Chlamydia se deba, al menos en parte, a la respuesta inflamatoria asociada a la generación de radicales libres y el desarrollo de inestabilidad genética. En el AIS o adenocarcinoma invasor de cérvix no se ha encontrado coinfección de VPH y Chlamydia, por lo que posiblemente solo sea un cofactor en las células escamosas<sup>92</sup>. En el caso del VIH, el estado de inmunodeficiencia asociado, confirman la importancia de los cofactores inmunológicos del huésped en la carcinogénesis por el VPH.
- **FACTORES NUTRICIONALES:** aunque la evidencia es muy limitada para establecer conclusiones firmes, se considera que la ingestión de alimentos antioxidantes, como frutas y vegetales se relacionan con la disminución del riesgo de padecer CCU. La asociación es más consistente sobre todo con la ingestión de vitaminas C, E, A y carotenos. La ingestión en la dieta de folatos, vitamina B6 y B12 puede estar también implicada en la carcinogénesis cervical. No obstante no existen conclusiones definitivas que relacionen dieta, VPH y riesgo de cáncer de cérvix<sup>93,94</sup>.
- **COFACTORES VIRALES:**
  - **GENOTIPO VIRAL:** es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preneoplásica, siendo los genotipos 16 y 18 los que presentan un mayor riesgo de progresión<sup>95</sup>. Las infecciones por

## INTRODUCCIÓN

VPH 16 progresan a CIN3 en el 17.2% y los VPH 18 lo hacen en el 13.6%, mientras que las infecciones por otros VPH-AR progresan en el 3% y las VPH negativas desarrollan CIN3 en el 0,8%<sup>96</sup>. Los genotipos 16, 18 y 45, tienen una integración más efectiva en el genoma celular, por lo que pueden desarrollar de forma más rápida una progresión a lesiones de alto grado<sup>97</sup>.

- **VARIANTES DEL VPH:** las variantes del VPH 16 muestran diferencias geográficas que se han relacionado con distintos riesgos de cáncer, y las variantes no europeas están asociadas con un mayor riesgo<sup>98</sup>. Se sugiere que las variantes pueden influir en la historia natural de la infección por dos mecanismos: diferencias en su capacidad funcional o evasión del sistema inmunitario del huésped. Dadas las diferencias geográficas, es posible que su papel en la persistencia y progresión esté relacionado con polimorfismos inmunogenéticos<sup>99</sup>.
- **CARGA VIRAL:** la carga viral es un marcador de infección persistente. Se ha sugerido que una carga viral elevada indica una mayor posibilidad de integración del ADN viral en el genoma del huésped. Sin embargo, es discutible la utilidad de medir la carga viral para pronosticar la progresión a cáncer. En mujeres con infección por el VPH 16 o 18 y citología normal, una carga viral elevada, determinada por PCR en tiempo real, se asocia con mayor riesgo de progresión a CIN y cáncer<sup>100,101</sup>. La carga viral medida mediante HC2 muestra un incremento progresivo paralelo a la gravedad de la lesión<sup>102</sup>. La presencia de cifras superiores a 100 URL se asocia con una lesión cervical en más del 90% de los casos, y esta asociación es prácticamente constante para cifras superiores a 1.000 URL. Por el contrario, un elevado porcentaje de casos con determinaciones inferiores a 10 URL no presentan lesión cervical. Sin embargo, la presencia de una baja carga viral no debe ser excluyente de una lesión grave<sup>103</sup>.
- **INTEGRACIÓN VIRAL:** la integración del ADN viral en el ADN del huésped parece ser crucial en la transformación maligna. El riesgo de que ocurra aumenta con una elevada carga viral. Sin embargo, algunos autores apoyan la idea de que el VPH 16 es capaz de inducir la transformación maligna sin que haya integración, lo que indica que seguramente intervienen

## INTRODUCCIÓN

otros factores para que ocurra la transformación<sup>104</sup>.

- **COINFECCIÓN:** es discutible si la coinfección con varios tipos virales aumenta el riesgo de progresión<sup>69</sup>. Algunos autores han evidenciado que la tasa de aclaramiento es independiente de la coinfección con otros tipos virales, al menos en mujeres inmunocompetentes<sup>72</sup>. La evidencia más reciente apunta a que los genotipos que coinfectan el cérvix actúan de forma independiente en el desarrollo de las lesiones cervicales.
- **COFACTORES DEL HUÉSPED:**
  - **INMUNOSUPRESIÓN:** las mujeres con inmunosupresión secundaria a la infección por VIH o trasplantadas con tratamiento inmunosupresor, tienen mayor riesgo de desarrollar carcinomas anogenitales asociados a VPH<sup>105-109</sup>. En estas pacientes se ha comprobado a nivel cervical una disminución de linfocitos CD4, así como de células *natural killer*, que facilitaría la integración de ADN viral del VPH<sup>63</sup>.
  - **HORMONAS ENDÓGENAS**
  - **FACTORES GENÉTICOS:** las variaciones genéticas individuales de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata, humoral y celular pueden influir en la persistencia de la infección por el VPH y su progresión a cáncer. Algunos estudios sugieren un efecto protector para HLA DRB1\*1301<sup>98</sup>.

Con respecto a los **COFACTORES DE INVASIÓN**, la progresión de la neoplasia intraepitelial a cáncer invasivo requiere la expresión de factores angiogénicos que estimulan la proliferación de nuevos vasos. La angiogénesis, inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y otras proteínas, como la angiogenina (ANG), es fundamental para el crecimiento del tumor, la invasión del estroma y las metástasis<sup>110</sup>.

## 2.7. Oncogénesis por VPH

La transformación tumoral de la célula tiene como base biológica la incapacidad de reparar los errores en la replicación del ADN mediante el bloqueo de proteínas del ciclo celular por los VPH de alto riesgo.

La oncogénesis es un proceso de múltiples fases en las que se producen sucesivas alteraciones genéticas, desencadenadas por la desregulación del ciclo celular derivada de la infección por VPH-AR.

Una célula no infectada y competente en sus funciones tiene un estricto mecanismo de control que se encarga de iniciar el ciclo celular y reparar el ADN previamente a cada división celular, evitando que los errores genéticos se acumulen en el genoma celular durante el proceso de replicación. Dichos errores son favorecidos por determinados cofactores, como el tabaco. Cada cambio genético es reparado con la mediación de proteínas como p53 y Rb.

La presencia de secuencias genómicas de los VPHs de alto riesgo en el ADN de la célula es considerado por el sistema de control del ciclo celular como un evento irreparable y la célula infectada es conducida a la muerte celular por apoptosis. Las proteínas E6 y E7 de los VPH-AR bloquean y degradan a la proteínas del ciclo celular p53 y Rb, respectivamente (Figura 11).

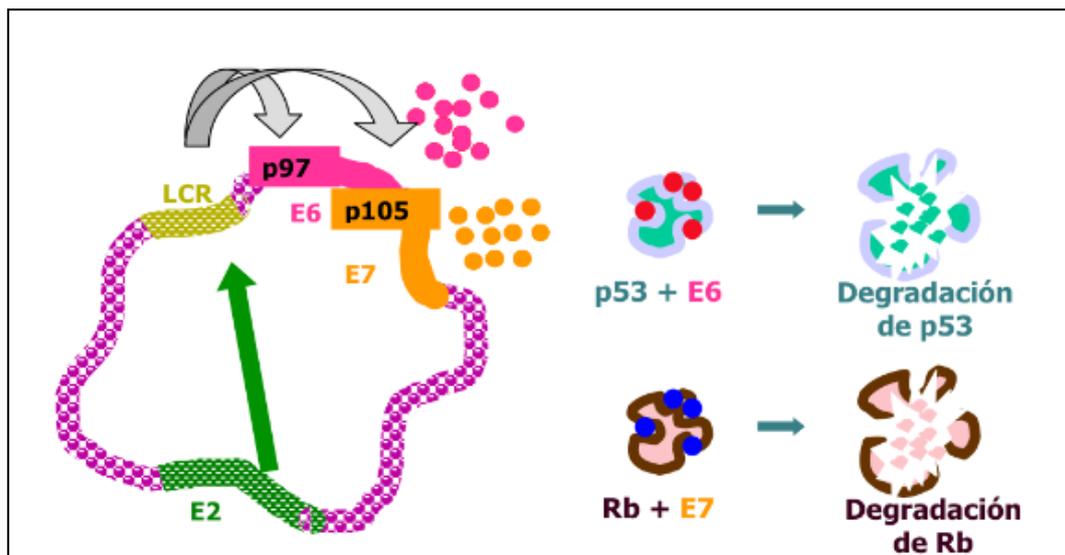


Figura 11. Expresión de los oncogenes virales.

## INTRODUCCIÓN

Con estas proteínas degradadas, la célula es incapaz de reparar los errores genéticos derivados de su replicación o de conducir a la célula a la muerte por apoptosis, como consecuencia se produce un estado celular de susceptibilidad a la transformación neoplásica.

De la capacidad de expresión de proteínas degradantes E6 y E7 de los VPHs dependerá su capacidad de bloqueo de p53 y Rb, y esta expresión se verá modificada por factores como la carga viral, la integración del genoma viral en el genoma celular o cofactores medioambientales.

Algunos experimentos han demostrado que la expresión basal de E6 y E7 en los VPH es muy baja comparado con la proteína E2, debido a la acción reguladora negativa de la región LCR, la cual mantiene prácticamente silenciada la expresión de estos genes. Por ello, en principio el VPH no sería capaz de producir suficiente cantidad de E6 y E7 como para provocar el proceso de defensa o reparación celular.

Analizando la biología de la infección por VPH se ha podido demostrar que en ciertos casos y tras un proceso de integración viral en el genoma celular, generalmente por disrupción de la región E2, la región reguladora LCR, se ve afectada e impide la represión de la transcripción de E6 y E7, con la consiguiente sobreexpresión de sus proteínas oncogénicas.

Así, una pequeña cantidad de virus podría producir grandes cantidades de proteínas E6 y E7, que bloquearían a p53 y Rb y se establecería el proceso de transformación neoplásica<sup>111, 112</sup>.

Se ha demostrado que la integración de secuencias genómicas del VPH en el ADN huésped, no es un factor necesario para la inducción de la transformación celular, ya que en ausencia de esta integración es posible la transformación por mecanismos distintos de desregulación de la expresión de E6 y E7, e incluso la expresión basal de estas proteínas, en casos de elevadas cargas virales, puede ser suficiente para desencadenar el proceso de transformación neoplásica<sup>113</sup>.

De este modo, sea por procesos de integración o por la intervención de rutas biológicas diferentes, la pérdida de E2, represor de la transcripción viral, da lugar a la expresión de los genes VPH E6 y E7, cuyas proteínas virales se expresan constantemente en los carcinomas cervicales<sup>114</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En los cánceres asociados a VPH-AR, los oncogenes E6 y E7 actúan sobre reguladores críticos de procesos celulares, y por tanto la expresión de estas oncoproteínas ocasiona múltiples cambios celulares oncogénicos<sup>115</sup>. Las oncoproteínas E6 y E7 contribuyen al desarrollo inicial y progresión del tumor.

La E7 bloquea la frenación del ciclo celular G1/S al degradar la proteína supresora retinoblastoma Rb y liberar el factor de transcripción E2F. Esto motiva un inicio aberrante del ciclo que, en condiciones normales, motivaría la activación de la proteína supresora p53 y causaría la muerte celular.

Contrariamente, a su vez la E6 degrada la p53 permitiendo que las células experimenten una persistencia de la proliferación aberrante. Para evitar la erosión de la telomerasa, que resultaría de la división celular continuada, la E6 activa asimismo la transcripción de hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) que causa la inmortalización de las células.

Las oncoproteínas E6 y E7 actúan, además, como modificadores de las mitosis, aumentando la probabilidad de adquirir mutaciones celulares adicionales que contribuyen a la progresión carcinogénica durante la división celular. Estas proteínas también se han implicado en la desregulación de otros eventos asociados con la progresión maligna, como la transición del epitelio al estroma y la angiogénesis<sup>115</sup>.

### 3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN VIRAL

#### 3.1. Métodos de prevención secundaria: cribado poblacional

La medicina preventiva establece la prevención secundaria de una enfermedad como su detección precoz o cribado (en inglés: screening), dirigida a identificarla en una fase subclínica y tratarla para evitar su progresión.

En Europa se han unificado los criterios para el cribado del cáncer, que se recopilaron en unas Recomendaciones del Consejo de la Unión Europea<sup>116</sup>. Sólo tres neoplasias reúnen los criterios aceptados: cáncer de cérvix (citología), cáncer de mama (mamografía) y cáncer colo-rectal (sangre oculta en heces-colonoscopía).

El test de cribado no está diseñado para realizar un diagnóstico, sino para clasificar a una población asintomática como “probable” o no de tener o poder desarrollar un cáncer. El test ideal debe reunir las siguientes características: sencillo, inocuo, fácil de usar, económico y validado clínicamente.

##### 3.1.1. Citología

La prevención secundaria del CCU mediante la citología de Papanicolaou se inició a mediados del siglo pasado con la implementación del cribado citológico periódico. El cribado tiene como objetivo detectar lesiones precursoras en el epitelio cervical que serían el antecedente del cáncer invasor. La larga duración de las lesiones que lo preceden y el hecho de que puedan detectarse mediante la citología y ser tratadas de forma adecuada permiten la prevención del carcinoma invasor.

La **citología de Papanicolaou** consiste en la toma, observación e interpretación de una muestra de células del cérvix (Figura 12). Es fundamental que la toma sea correcta, obteniendo el material directamente del endocérvix y del exocérvix. Esta prueba detecta cambios inflamatorios, infecciosos o la presencia de células anormales y neoplásicas. De la citología cervical no debe esperarse un diagnóstico sino un resultado, normal o anormal. Las citologías anormales detectan mujeres potencialmente afectas de lesiones cervicales.

## INTRODUCCIÓN

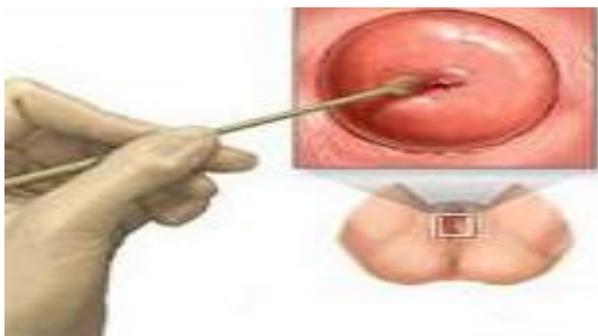


Figura 12. Citología cervical.

Los programas organizados de cribado poblacional mediante la citología han demostrado su efectividad al disminuir la incidencia y mortalidad por CCU en los países donde se han aplicado de forma masiva. En los últimos 50 años el cribado citológico ha reducido la morbi-mortalidad por cáncer cervical en un 75-80%, en los países donde se ha aplicado con una estrategia poblacional con cobertura suficiente y continuada<sup>117</sup>.

La Unión Europea, la *American Cancer Society (ACS)*<sup>118</sup> y el *American College of Obstetrician and Gynecologist (ACOG)*<sup>119</sup> recomiendan la citología como técnica de cribado para el carcinoma de cérvix, siendo su principal limitación su baja sensibilidad.

Las citologías deben ser interpretadas y por lo tanto están sujetas a error. Para hacer más homogénea la lectura, se han propuesto varios sistemas de clasificación. En la actualidad el más usado es la clasificación de Bethesda<sup>120</sup> (Figura 13), elaborado en el año 2001 “The Bethesda System-2001” en la que no sólo se clasifican los hallazgos sino que se requiere la valoración de la muestra, es decir, si es o no adecuada.

La verdadera innovación de esta clasificación consiste en considerar a las alteraciones celulares por VPH como lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), displasia leve o CIN1, además de unificar bajo el término de lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) a las displasias moderadas y severas, CIN2 y CIN3 o carcinoma in situ.

## INTRODUCCIÓN

### SISTEMA BETHESDA 2001 (modificado)

<p><b>IDONEIDAD DE LA MUESTRA</b></p> <p><b>Satisfactorio para la evaluación</b> (se agrega un indicador de calidad: elementos de la ZT, flora, etc.)</p> <p><b>Parcialmente satisfactorio para evaluación por</b> (se especifica la causa: artefactos, ausencia elementos epiteliales de la ZT...).</p> <p><b>Insatisfactoria para evaluación</b> (se especifica la causa).</p> <p><b>RESULTADO/INTERPRETACIÓN</b></p> <p><b>Negativa para lesiones intraepiteliales o malignidad</b></p> <p><b>MICROORGANISMOS</b>          Trichomonas vaginalis          Organismos fúngicos compatibles morfológicamente con Cándida.          Cambios en la flora sugestiva de vaginosis bacteriana.          Bacterias morfológicamente compatibles con Actinomyces.          Cambios celulares asociados con el virus herpes simple.</p> <p><b>OTROS CAMBIOS NO NEOPLÁSICOS:</b>          Cambios reactivos asociados con:          Inflamación (incluye reparación típica).          Radiación.          Dispositivo intrauterino (DIU).          Células glandulares post-histerectomía.          Atrofia.</p>	<p><b>RESULTADO/INTERPRETACIÓN (CONT)</b></p> <p><b>Anomalías celulares epiteliales</b></p> <p><b>- CÉLULAS ESCAMOSAS</b></p> <p>*Células escamosas atípicas:          de significado incierto (ASC-US),          no es posible excluir HSIL (ASC-H).</p> <p>*Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (LSIL):          VPH y displasia leve / CIN 1.</p> <p>*Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado (HSIL):          displasia moderada, severa, CIS / CIN 2 y CIN 3</p> <p>*Carcinoma de células escamosas.</p> <p><b>- CÉLULAS GLANDULARES</b></p> <p>*Células glandulares atípicas:          endometriales, endocervicales, NOS.</p> <p>*Células glandulares atípicas probablemente neoplásicas:          Endocervical, NOS.          Adenocarcinoma endocervical in situ.          Adenocarcinoma</p> <p><b>Otros</b></p> <p>-Células endometriales en mujer ≥ 40 años.</p> <p>TÉCNICAS AUXILIARES: (p.ej. HPV).</p> <p>RECOMENDACIONES: (opcional).</p> <p>NOTAS Y SUGERENCIAS (opcional)</p>
--	---

Figura 13. Sistema de Clasificación Bethesda<sup>120</sup>.

Sabemos que la sensibilidad de la citología para la detección de CIN2+ se sitúa alrededor del 50%, no superando el 80% en las mejores condiciones de calidad. Esta sensibilidad es alrededor de un 40% inferior a la de las pruebas clínicamente validadas para la detección del VPH<sup>121</sup>. Esta sensibilidad relativamente baja se debe a la variabilidad del material obtenido en la toma, a la calidad de la extensión citológica y a la preservación de la muestra, así como a la distinta capacidad de detección e interpretación de las características microscópicas por parte de los profesionales.

La baja sensibilidad de una única citología ha sido compensada en muchos programas con el aumento de frecuencia de realización de la prueba, facilitado por el relativo bajo coste de la misma. Por otra parte, la especificidad de la citología es elevada, dado que el diagnóstico citológico es un diagnóstico morfológico de la lesión y no de una infección subclínica que puede no comportar alteraciones celulares a la larga. Sin embargo, esta especificidad puede verse afectada en función de la cantidad de diagnósticos indefinidos (atipias de significado indeterminado/ASC-US) que emita cada laboratorio<sup>122</sup>.

- **Citología en medio líquido**

Recientemente se han desarrollado técnicas que permiten obtener preparaciones en una sola capa celular (**citología en monocapa, capa fina o en medio líquido**). El material obtenido es conservado en un medio líquido, normalmente de base alcohólica, que permite su almacenaje y transporte, y la extensión se realiza en el laboratorio. Su principal ventaja es que el material remanente conservado permite realizar técnicas adicionales, como la determinación de VPH o de inmunocitoquímica<sup>123</sup>.

Se ha descrito un discreto incremento de la sensibilidad con este tipo de citología, pero especialmente disminuye los casos inadecuados para diagnóstico. La citología en medio líquido supone un incremento del tiempo de procesamiento técnico, pero una disminución del tiempo de estudio microscópico ya que la interpretación de la morfología celular es más sencilla (menos artefactos como sangre, inflamación, defecto de fijación)<sup>124</sup>. La mejor calidad de extensión ha permitido la aplicación de nuevos métodos de lectura automatizada de la citología mediante el uso de sistemas basados en análisis de imagen.

En definitiva, la mayoría de países industrializados han incorporado la citología en medio líquido en sus laboratorios<sup>125</sup> basándose en que: disminuye el número de muestras insatisfactorias, requiere menor tiempo de estudio microscópico, permite realizar pruebas complementarias y permite la lectura automatizada.

- **Citología con sistemas de lectura automatizada**

Aplica el análisis de imagen y la morfometría para la medición de la densidad óptica de los núcleos o la relación núcleo/citoplasma, con tal de agilizar y estandarizar el primer cribado de las preparaciones citológicas que realizan los citotécnicos. Actualmente, existen dos sistemas de lectura aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) estadounidense, el BD Focal Point® de Becton Dickinson y el ThinPrep Imager® de Hologic.

Estos sistemas localizan las células atípicas durante el proceso de cribado lo que permite centrar la atención en un número limitado de campos microscópicos a estudiar. Se ha destacado una mejor eficiencia pero no hay acuerdo sobre una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de lesiones precursoras<sup>126, 127</sup>.

GUÍA DE CRIBADO DEL CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO EN ESPAÑA

En España, en el año 2006, se alcanzó el consenso para el cribado del cáncer cervical, en el que participaron las Sociedades Españolas de Ginecología y Obstetricia (SEGO), de Citología (SEC), de Anatomía Patológica (SEAP), y la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC)<sup>95</sup>. No obstante, en el año 2010 este protocolo fue modificado<sup>87</sup> (Figuras 14 y 15).

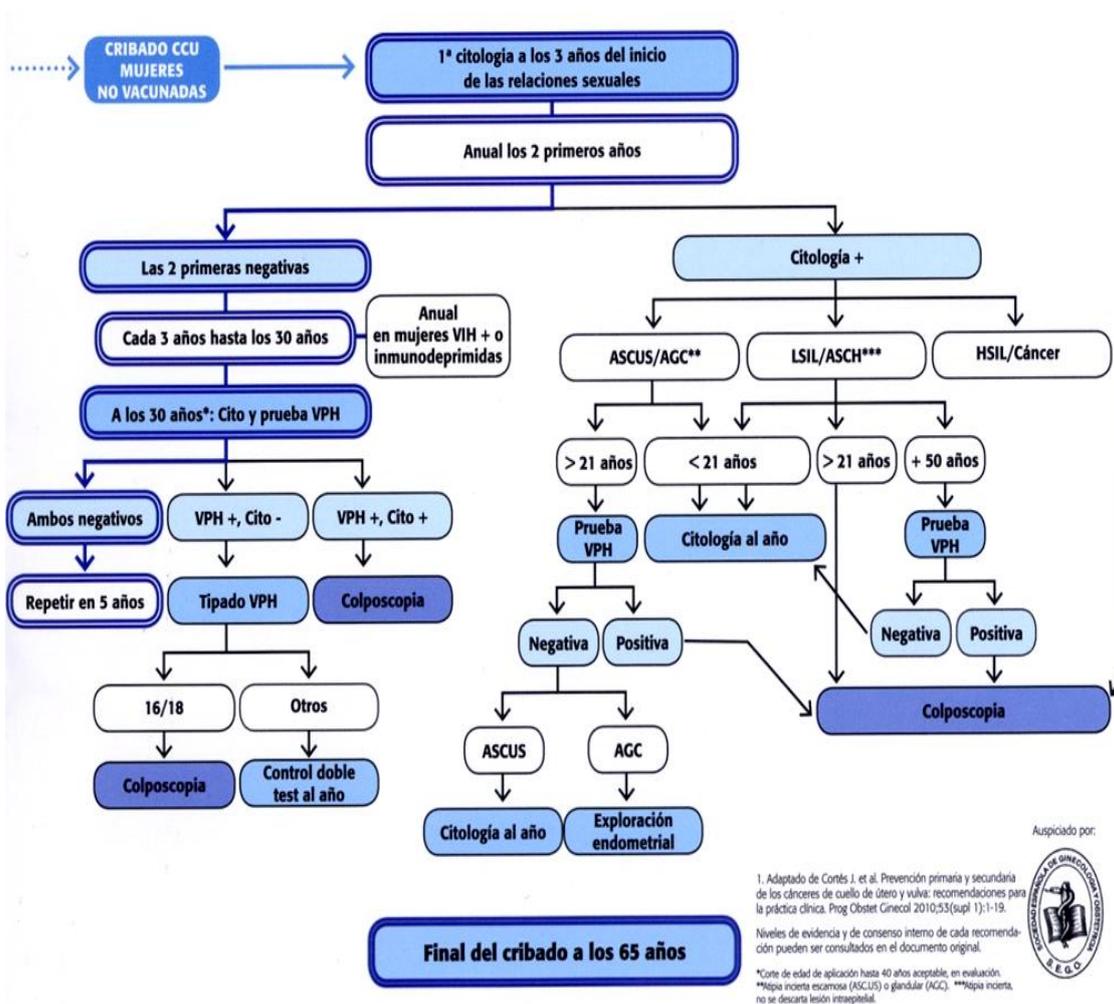


Figura 14. Recomendaciones de la SEGO 2010 para el cribado poblacional en mujeres no vacunadas.

## INTRODUCCIÓN

Estas modificaciones en el cribado se basan fundamentalmente en:

- ✓ A partir de los 30 años de edad el cribado del cáncer de cérvix se realiza con la citología y con el test VPH. Debido a la baja especificidad del test VPH para CIN2+ en las mujeres jóvenes no debe hacerse antes de los 30 años. Sin embargo a partir de dicha edad, el test VPH se ha mostrado más específico y esto permite disminuir el número de colposcopias y el seguimiento clínico<sup>128</sup>.
- ✓ En pacientes menores de 21 años con diagnóstico citológico de ASC-US, ASC-H o LSIL se repite la citología al año, dada la alta prevalencia de infección transitoria por VPH en los primeros años de vida sexual.

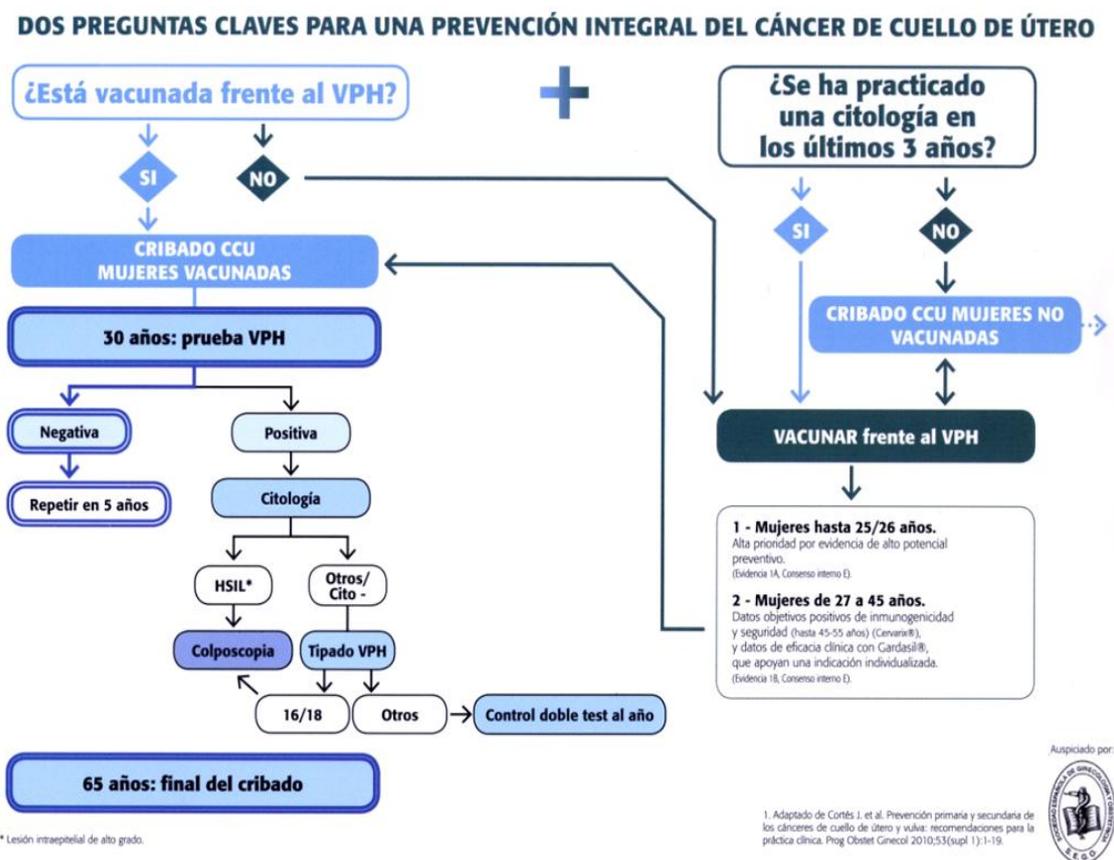


Figura 15. Recomendaciones de la SEGO 2010 para el cribado poblacional en mujeres vacunadas.

## INTRODUCCIÓN

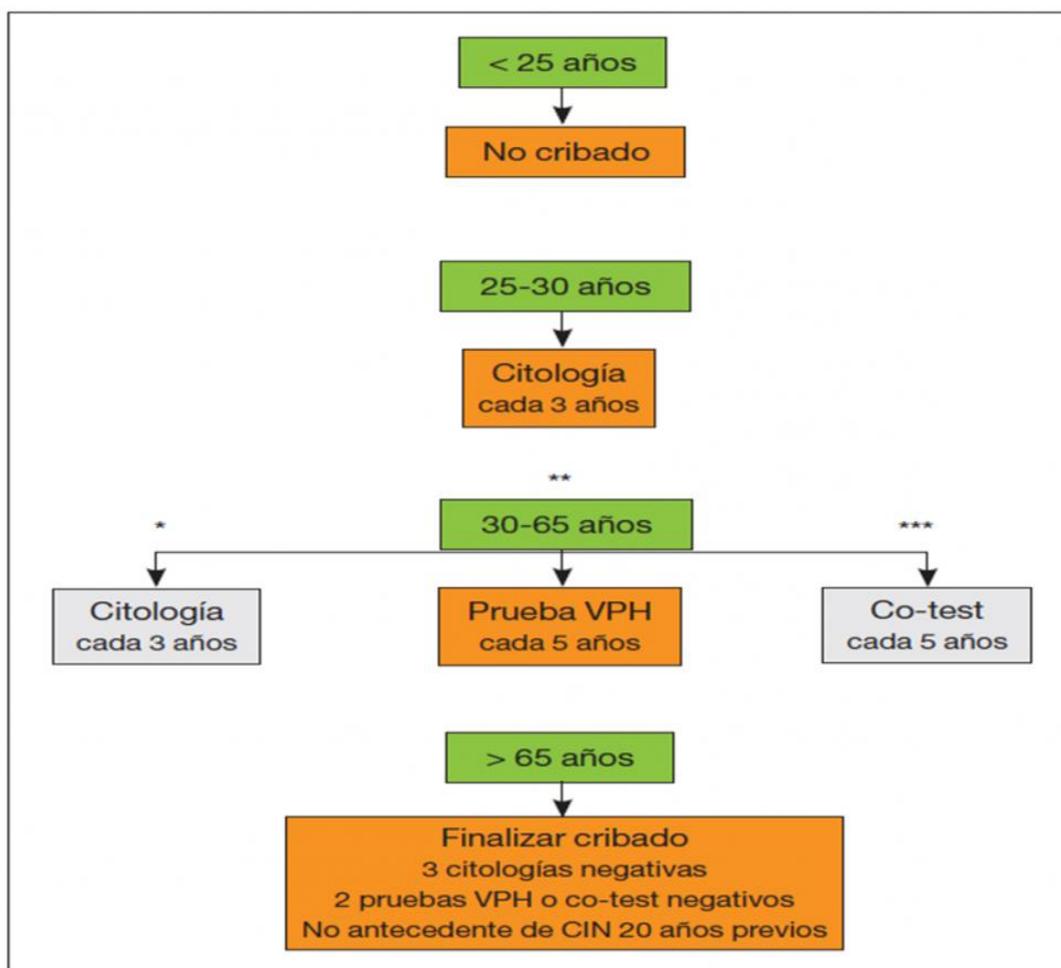


Figura 16. Estrategias de cribado en función del subgrupo de edad. Guía de cribado del CCU 2014<sup>129</sup>.

Estas mismas sociedades, después de la última publicación de la **GUÍA DE CRIBADO DEL CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO 2014**<sup>129</sup> y tras la implementación del programa de vacunación contra el VPH, recomiendan las siguientes actitudes (Figura 16):

- ✓ \*Aunque la citología cervical exclusiva en el cribado primario continúa vigente, siempre que se cumplan los controles de calidad preceptivos, la transición a cribado con prueba VPH debería ser un objetivo alcanzable en el plazo de 3-5 años para todos los ámbitos del cribado primario de CCU. Esta recomendación se justifica en base a la ganancia en calidad y validez del cribado.
- ✓ \*\*La Sociedad Española de Epidemiología (SEE) considera aceptable comenzar la prueba VPH en el intervalo entre 30 y 35 años.

## INTRODUCCIÓN

- ✓ \*\*\*Globalmente, el co-test no añade mayor rendimiento y eficacia a la prueba de VPH-AR como método único y conlleva un mayor gasto de recursos. La elección del co-test debe tener una finalidad transitoria mientras se incorpora e implementa la tecnología para la detección del VPH. La SEE no favorece el co-test como opción aceptable de cribado.

### 3.1.2. Colposcopia

La colposcopia es una técnica basada en la visualización del cérvix, la vagina y la vulva mediante un microscopio binocular con una potente fuente de luz centrada sobre el campo de exploración. El colposcopio fue introducido por Hinselman en 1925.

La observación magnificada del epitelio se realiza tras la aplicación de solución salina, de ácido acético diluido al 3-5% y la solución yodoyodurada de lugol (test de Schiller) en pasos sucesivos.

Permite identificar la topografía y extensión de las lesiones precancerosas, localizar las áreas más sospechosas donde practicar la toma de biopsia y planificar un tratamiento efectivo. Requiere una buena formación y experiencia del especialista.

Es un prueba muy sensible para la detección de lesiones precursoras del cáncer de cérvix, sin embargo es poco específica, ya que las imágenes colposcópicas anormales no siempre corresponden a lesiones intraepiteliales. La sensibilidad de la colposcopia para diferenciar el epitelio normal de aquel que presenta cualquier lesión es del 96% y la especificidad del 48%<sup>130</sup>. La colposcopia no tiene utilidad como test de cribado primario ni como sustituto del estudio histológico<sup>131</sup>.

Los hallazgos colposcópicos se clasifican según la nomenclatura de la *International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy* (IFCPC) aceptada en el Congreso de Río de Janeiro en Julio de 2011<sup>132</sup> (Figuras 17 y 18).

## INTRODUCCIÓN

### Nomenclatura IFCCP 2011<sup>1</sup> Aceptada en el Congreso Mundial de Río, 5 de Julio, 2011

Terminología colposcópica del <b>cuello uterino</b> de IFCCP 2011 <sup>1</sup>			
<b>Evaluación General</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adecuada/inadecuada a causa de ... (por ej.: cuello uterino no claro por inflamación, sangrado, cicatriz)</li> <li>• Visibilidad de la unión escamocolumnar: completamente visible, parcialmente visible, no visible.</li> </ul> Tipos de zona de transformación 1,2,3	
<b>Hallazgos colposcópicos normales</b>		Epitelio escamoso original: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maduro</li> <li>• Atrófico</li> </ul> Epitelio columnar <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ectopía</li> </ul> Epitelio escamoso metaplásico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quistes de Naboth</li> <li>• Aberturas glandulares y/o criptas glandulares</li> </ul> Deciduosis en el embarazo	
<b>Hallazgos colposcópicos anormales</b>	<b>Principios generales</b>	<b>Ubicación de la lesión:</b> dentro o fuera de la zona de Transformación, ubicación de la lesión según las agujas del reloj. <b>Tamaño de la lesión</b> Número de cuadrantes del cuello uterino que cubre la lesión, tamaño de la lesión en porcentajes del cuello uterino.	
	<b>Grado 1 (Menor)</b>	Epitelio acetoblanco delgado. Borde irregular	Mosaico fino, Puntillado fino
	<b>Grado 2 (Mayor)</b>	Epitelio acetoblanco denso, Aparición rápida de epitelio acetoblanco. Orificios glandulares abiertos con bordes engrosados.	Mosaico grueso, Puntillado grueso. Bordes delimitados, Signo del límite del borde interno, Signo de cresta o sobreelevado.
	<b>No específicos</b>	Leucoplasia (queratosis, hiperqueratosis), Erosión Solución de Lugol (Test de Schiller): positivo/negativo	
<b>Sospecha de invasión</b>		Vasos atípicos <b>Signos adicionales:</b> Vasos delgados, superficie irregular, lesión exofítica, necrosis, ulceración (necrótica), tumoración nodular.	
<b>Hallazgos varios</b>		Zona de transformación congénita, Condiloma, Pólipo (exocervical /endocervical) Inflamación,	Estenosis, Anomalía congénita, Anomalías post tratamiento, Endometriosis

Figura 17. Terminología colposcópica del cuello uterino de IFCCP 2011.

<b>Terminología colposcópica del <b>cuello uterino – apéndice de</b> IFCCP 2011<sup>1</sup></b>	
<b>Tipos de tratamiento de escisión</b>	<b>Tipo de escisión 1,2,3</b>
<b>Medidas de la muestra de escisión</b>	<b>Largo</b> – distancia del margen distal/externo al margen proximal/interno <b>Grosor</b> – distancia del margen estromal a la superficie de la muestra extirpada <b>Circunferencia</b> (Opcional)- el perímetro de la muestra extirpada.

Figura 18. Terminología colposcópica del cuello uterino-apéndice de IFCCP 2011.

### 3.1.3. Estudio histológico

- **Biopsia**

La combinación de la biopsia del exocérnix con una pinza sacabocados, dirigida por colposcopia, se considera el “gold standard” para el diagnóstico de la neoplasia intraepitelial y el CCU<sup>133</sup>.

- **Estudio del endocérnix**

El estudio endocervical se realiza mediante microlegrado o mediante un cepillo endocervical para hacer un frotis citológico. La localización exclusivamente endocervical de las lesiones intraepiteliales, fuera del alcance de la visión, es la causa más frecuente de falsos negativos de la colposcopia o de las discordancias diagnósticas entre las diversas técnicas.

- **Conización**

La conización es una técnica diagnóstica que puede ser terapéutica. El empleo del asa diatérmica ha facilitado su uso ambulatorio generalizado.

### 3.2. Métodos de detección del VPH

La presencia de VPH se puede deducir de hallazgos morfológicos, serológicos y clínicos. Sin embargo, el diagnóstico de VPH se basa en técnicas de biología molecular que permiten su detección y tipificación. La detección de VPH tiene una elevada sensibilidad en la detección de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado y un elevado valor predictivo negativo (VPN)<sup>134</sup>.

Existe una gran variedad de ensayos que permiten la detección del VPH<sup>135</sup>. En función de la metodología en la que se basan, estos pueden clasificarse en 3 grupos (Figura 19):

- ensayos basados en hibridación de ácidos nucleicos
- ensayos basados en amplificación de la señal, y
- ensayos basados en amplificación de ácidos nucleicos

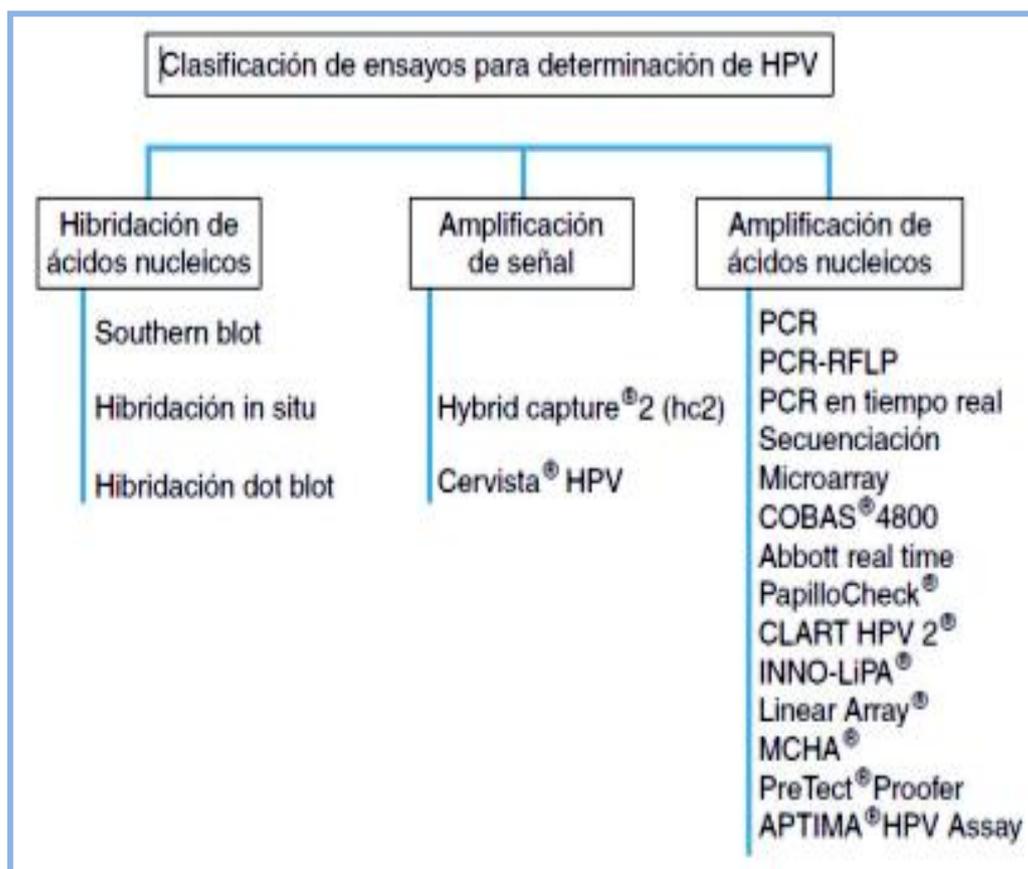


Figura 19. Clasificación de ensayos para determinación de VPH<sup>134</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La variabilidad observada en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad de la citología ha dado lugar a que en los últimos años se haya analizado el papel de la prueba VPH en la prevención secundaria del cáncer de cérvix<sup>136,137</sup>, ya sea asociado a la citología<sup>138</sup> (co-test) o como técnica inicial de cribado. Múltiples ensayos randomizados demuestran que la prueba VPH es más sensible para la detección de CIN3, si bien la especificidad y por tanto el valor predictivo positivo (VPP) demostrado son menores, sobre todo en mujeres jóvenes menores de 30 años, donde la prevalencia de infección transitoria es alta.

Una revisión sistemática llevada a cabo recientemente en la que se actualizan los datos disponibles<sup>139</sup>, objetiva cómo combinando citología y prueba VPH (co-test) como técnica de cribado se incrementa ligeramente la sensibilidad a expensas de una pérdida en especificidad cuando cualquier prueba es positiva y se remite a la paciente a colposcopia, comparado con la realización única de la prueba VPH. La diferencia en el riesgo acumulado de CIN3+ o cáncer utilizando co-test versus prueba VPH sola es baja.

Por tanto, la evidencia disponible pone de manifiesto como, en caso de ser realizado con una técnica clínicamente validada, la prueba VPH-AR es más eficaz que la citología en el cribado primario en mujeres mayores de 30 años, y que en los casos en los que la prueba es negativa el intervalo de cribado se puede extender con seguridad a 5 años. En los casos en los que la prueba es positiva se puede utilizar para la selección bien la citología o bien el genotipado para VPH16/18.

A continuación se describen más detalladamente los métodos de detección de VPH aprobados por la FDA (Tabla 3) como métodos de cribado del CCU junto con la citología<sup>140-142</sup>.

Tabla 3. Pruebas para la detección de VPH aprobadas por la FDA para su utilización en el cribado poblacional<sup>129</sup>.

Hybrid Capture® 2 (HC2) HPV DNA Test (QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD; USA) US FDA (2003)
---

Cervista® HPV HR Test (Hologic, Madison, WI, USA) US FDA (2009)
---

Cobas® 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, USA) US FDA (2011)
---

APTIMA® HPV Test (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA) US FDA (2011)
---

### 3.2.1. Métodos en los que no se realiza amplificación

- **CAPTURA DE HÍBRIDOS**

La Captura de Híbridos (Hibryd Capture® 2 o HC2) es una técnica de hibridación que utiliza una secuencia complementaria de ARN, en lugar de ADN, lo que le confiere una alta sensibilidad. Este método sólo se aplica sobre células en suspensión no permitiendo su uso en muestras tisulares.

Se trata de un método no automatizado que permite detectar la presencia de 5 tipos de VPH-BR (6, 11, 42, 43, 44) y 13 tipos de VPH-AR (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) sin indicar el genotipo específico.

El marcaje de los híbridos se realiza mediante un producto luminiscente, por lo que para la lectura se utiliza un luminómetro. El resultado es por tanto cualitativo (positividad o negatividad para VPH-AR) y también semicuantivo (intensidad de la reacción medida en unidades relativas de luz o URL) lo que significa una estimación de la carga viral o cantidad de virus presente en una muestra determinada<sup>102</sup>.

Este método es muy adecuado para el cribado por su alta sensibilidad clínica. Debido a que es la técnica más contrastada, muchos autores recomiendan utilizar el HC2 como estándar de oro para realizar estudios comparativos de los nuevos métodos de cribado<sup>140</sup>. Sin embargo es un método relativamente poco reproducible en la llamada “zona gris”, que afecta a los resultados alrededor del punto de corte (positivo/negativo). Parece que esto se debe, al menos en parte, a un número no despreciable de reacciones cruzadas con VPH-BR<sup>143</sup> que dan lugar a un pequeño número de falsos positivos. Sin embargo este aspecto parece ser poco importante desde la perspectiva del cribado poblacional<sup>143, 144</sup>.

- **CERVISTA®**

Es una técnica automatizada de detección del VPH basada en la hibridación, que únicamente permite analizar muestras de citología líquida, de modo que no puede utilizarse en muestras tisulares. Detecta la presencia de 14 tipos de VPH-AR en tres grupos diferentes (Mix 1: 51, 56, 66; Mix 2: 18, 39, 45, 59, 68, y Mix 3: 16, 31, 33, 35, 52, 58).

## INTRODUCCIÓN

Tras la extracción del ADN se aplica el test de Cervista®, que realiza la lectura mediante un método denominado *invader*, basado en una reacción luminiscente. El resultado informa de la positividad o negatividad para VPH-AR pero no informa de la carga viral. Es muy sensible y adecuado para el cribado. No existe experiencia en lo referente a la llamada zona gris, pero no se conocen reacciones cruzadas con VPH-BR. Para tipificar los VPH presentes debe procederse a una segunda prueba<sup>143</sup>.

### 3.2.2. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Estos métodos se basan en la amplificación del ADN del virus<sup>145</sup> mediante la aplicación de unos cebadores (*primers* en inglés) complementarios de secuencias del ADN vírico que, en ciclos de altas y bajas temperaturas y gracias a la acción de polimerasas del ADN, permiten obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Estas técnicas pueden utilizarse en cualquier tipo de muestra, células en suspensión, células sobre portaobjetos o cortes de muestras histológicas<sup>146</sup>.

Estos métodos son extraordinariamente sensibles, pero pueden tener problemas de especificidad, dado que ocasionalmente se detectan secuencias similares pero no exactas al ADN problema (falsos positivos). 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<sup>146</sup>. El amplificado generado es de aproximadamente 450 pares de bases. Después se han diseñado variantes como PGMY09/11, GP5/GP6 o su variante GP5+/GP6+, y SPF10. A menor región para amplificar, mayor es la sensibilidad para detectar la presencia del VPH.

Un método no reconocido por la FDA para screening es el **sistema CLART HPV2**<sup>147</sup>, que consiste en un método semiautomatizado de genotipado viral basado en la amplificación de oligonucleótidos (*primers*) por acción de la polimerasa, detectando 35 genotipos (20 de alto riesgo y 15 de bajo riesgo).

- **COBAS® 4800**

Se trata de un método comercializado de detección del VPH basado en la **PCR en tiempo real** y disponible para material conservado para citología en medio líquido, no pudiendo utilizarse material histológico procesado en parafina. Es un método automatizado que informa si la muestra es positiva o negativa para VPH-AR y, en casos positivos, indica si está presente el VPH16, el VPH18 u otro de los siguientes VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). La técnica proporciona información sobre carga viral. En los resultados positivos no se han observado reacciones cruzadas con VPH-BR<sup>148</sup>. Muestra una elevada sensibilidad clínica, por lo que es adecuada para su utilización en el cribado poblacional.

### 3.2.3. Métodos de detección de ARN-VPH

- **APTIMA®**

Aptima® es un sistema automatizado que permite la detección de 14 tipos de VPH-AR mediante análisis del ARN mensajero viral de las oncoproteínas E6 y E7 en citología en medio líquido. En los estudios publicados el método ha demostrado ser tan sensible como HC2, Cervista® y Cobas® 4800, pero algo más específico. Está aprobado por la FDA y validado en la plataforma Panther como co-test y para la selección de las citologías ASC-US<sup>121</sup>.

### 3.3. Marcadores moleculares de proteínas del ciclo celular

Actualmente se están investigando y desarrollando otras estrategias que permitan identificar a aquellas pacientes que realmente presentan un alto riesgo de sufrir transformaciones carcinogénicas y desarrollar un cáncer invasivo. Uno de los mejores indicadores de esa capacidad de transformación neoplásica en las muestras cervicales sería la detección de los niveles de proteínas oncogénicas producidas por el VPH. Por eso, se están evaluando biomarcadores que intervengan en las vías moleculares de la carcinogénesis<sup>149-152</sup>.

## INTRODUCCIÓN

- Marcadores de regulación del ciclo celular: p53, p21, bax, pRb, p16<sup>INK4a</sup>, p27, MCM2 y TOP II $\alpha$  (ProEx<sup>TM</sup> C)<sup>153</sup>, ciclina D1, ciclina A, ciclina E.
- Marcadores de proliferación celular: PCNA, c-myc, Ki-67 (MIB-1).
- Marcadores de apoptosis: telomerasa, survivina.
- Marcadores de transcripción: Skn-1, Oct-1, AP-2, NFkappaB.
- Marcadores de vías celulares de señalización.
- Marcadores de infección VPH: proteína L1 de la cápside.

Recientemente se ha evidenciado que algunos biomarcadores pueden ser detectados por métodos inmunohistoquímicos<sup>154</sup> y, por tanto, pueden ser evaluados en un examen cito-histológico:

### 3.3.1. p16<sup>INK4a</sup> (p16)

Es una proteína codificada por el gen supresor CDKN2 (MSTK, INK4) situado en el cromosoma 9p21, inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk). La proteína del retinoblastoma (pRb) en condiciones normales se une al factor de transcripción E2F, bloqueando la transcripción de los genes que estimulan la progresión del ciclo celular y su proliferación (Figura 20).

Tanto en el cáncer de cérvix como en sus lesiones precursoras, la pRb está funcionalmente inactivada desde las fases iniciales de la carcinogénesis cervical como consecuencia de la expresión del gen E7 del VPH que la bloquea. Existe, entonces, una relación inversa entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y la presencia de pRb activa. La p16<sup>INK4a</sup> se detecta cuando la pRb está alterada (mutada, delecionada o inactivada) y, se reduce o está ausente en células que contienen pRb con actividad normal. Es independiente de la edad de la paciente y del tipo de VPH.

La sobreexpresión de p16 es fácilmente detectable en muestras histológicas y citológicas por tinción inmunohistoquímica, siendo un marcador de progresión neoplásica que mejora la especificidad diagnóstica<sup>155-158</sup> y soluciona los problemas existentes de variabilidad interobservador.

## INTRODUCCIÓN

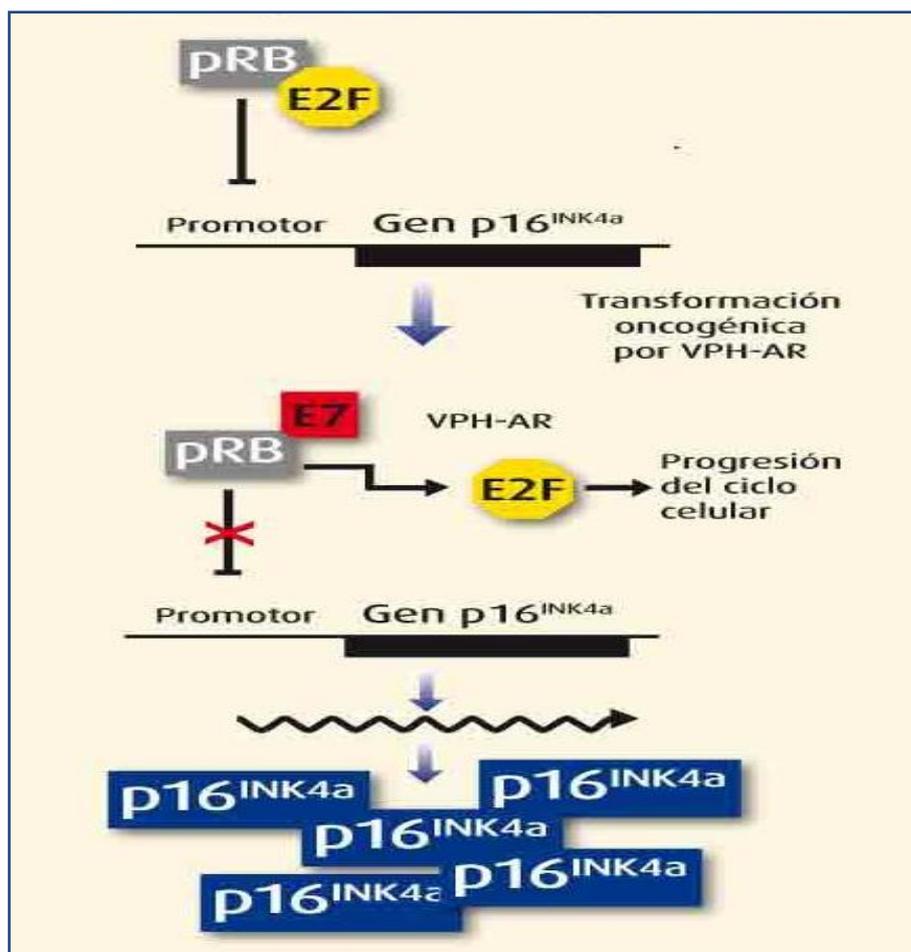


Figura 20. Mecanismo molecular de la sobreexpresión de p16.

### 3.3.2. Ki-67

Ki-67, también conocida como MIB-1, es una proteína que puede ser detectada en el núcleo de células en proliferación, en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), pero no en células inactivas ya que está ausente en fase G0. La expresión de Ki-67 sería mayor en las alteraciones de la maduración epitelial que en los epitelios normales.

En condiciones normales Ki-67 se expresa en la capa suprabasal del epitelio cervical, aparece en las capas superiores y es más intensa a medida que se incrementa el grado de displasia. Diversos estudios han comprobado que la progresión tumoral se asocia a un aumento de proliferación celular y que la expresión de Ki-67 constituye un potencial indicador pronóstico en las lesiones premalignas del cérvix<sup>151, 159</sup>.

### 3.3.3. Tinción dual p16/Ki-67

La unión de los dos biomarcadores antes mencionados en una misma técnica ha dado lugar a la denominada **tinción dual p16/Ki-67**, comercializada por Laboratorios Roche como CINtec® PLUS kit, que consiste en un método inmunohistoquímico para determinar cualitativamente y de manera simultánea las proteínas p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en estudios cito-histológicos cervicales, y puede ser aplicada tanto en citología convencional como líquida.

Se ha propuesto que la detección simultánea de la proteína p16<sup>INK4a</sup>, marcador de antiproliferación, y la proteína Ki-67, marcador de proliferación, en una misma célula se deberían excluir mutuamente en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, la detección de células cervicales epiteliales individuales coexpresando ambos marcadores puede representar un signo independiente de desregulación del ciclo celular secundaria a la infección transformante por VPH.

La principal ventaja de esta tinción dual p16/Ki-67 es que no precisa de interpretación morfológica de las características nucleares, y se considera como positiva para el test cualquier muestra con al menos una célula con positividad dual (tinción marrón citoplasmática para p16 y tinción roja nuclear para Ki-67) (Figura 21).

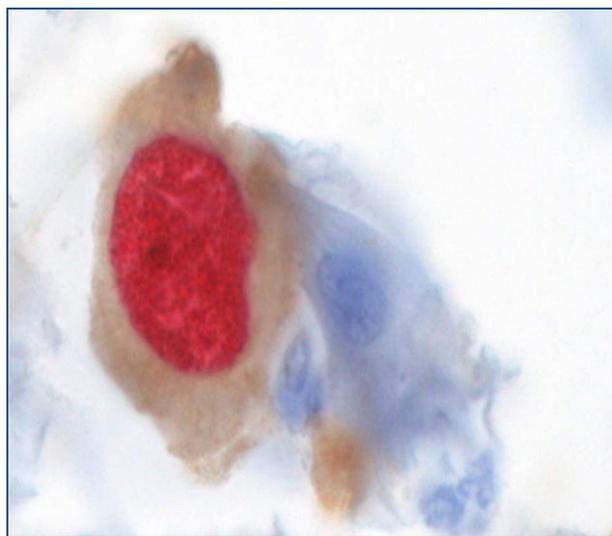


Figura 21. Célula positiva para tinción dual p16/Ki-67.

Se han realizado tres ensayos clínicos controlados en Europa con esta técnica:

## INTRODUCCIÓN

- **Estudio PALMS<sup>160</sup>: Primary, ASC-US, LSIL Marker Study**
  - Estudio multinacional, multicéntrico, prospectivo y diagnóstico en más de 27.000 mujeres.
- **Estudio EEMAPS<sup>161</sup>: European Equivocal or Mildly Abnormal Pap Cytology Study**
  - Unos 200 casos de CIN 2+ confirmadas por biopsia, provenientes de 776 casos de ASC-US y LSIL.
- **Estudio Wolfsburg<sup>162</sup>: Subestudio del Wolfsburg Pap/HPV Co-Testing Study**
  - Estudio retrospectivo con más de 4400 mujeres mayores de 30 años.
  - Estudio retrospectivo con 427 mujeres con citologías negativas y VPH positivo.

Los resultados de estos estudios sobre el comportamiento diagnóstico de la tinción dual para CIN2+ se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Comportamiento diagnóstico de la tinción dual para CIN2+.  
Resultados de los estudios PALMS<sup>160</sup>, EEMAPS<sup>161</sup> y WOLFSBURG<sup>162</sup>.

CINtec® PLUS	Sensibilidad	Especificidad
<b>Cribado<sup>160,162</sup></b>	<b>90 - 93%</b>	<b>95 - 97.5%</b>
<b>Triaje LSIL<sup>160,161</sup></b>	<b>85 - 94%</b>	<b>54 - 68%</b>
<b>Triaje ASC-US<sup>160,161</sup></b>	<b>92 - 94%</b>	<b>78 - 81%</b>
<b>Triaje Citología negativa /VPH-AR positivo<sup>162</sup></b>	<b>92%</b>	<b>85%</b>

## INTRODUCCIÓN

La tinción dual p16/Ki-67 en citología constituye, por tanto, una de las pruebas más prometedoras para identificar lesiones cervicales premalignas. En los estudios publicados, a pesar de las notables diferencias en los criterios de inclusión, se observa una sensibilidad y especificidad muy altas (aproximadamente del 90 y del 80%, respectivamente). La sensibilidad es significativamente mejor en las muestras preparadas con ThinPrep® que en extensiones convencionales o preparadas con SurePath®<sup>160</sup>.

Actúa como herramienta de seguridad en el diagnóstico histológico rutinario. Pone de manifiesto focos lesionales de pequeño tamaño, lesiones artefactadas u ocultas que pueden pasar desapercibidas con las técnicas de rutina.

Facilita el diagnóstico diferencial entre los simuladores de lesión cervical (metaplasia escamosa inmadura, cambios celulares asociados a atrofia e inflamación) y las verdaderas lesiones intraepiteliales de alto grado.

La tinción dual p16/Ki-67 ha demostrado ser particularmente útil en la selección de las pacientes con citología de ASC-US y LSIL, y en casos con prueba de VPH positiva y citología negativa<sup>129, 162</sup>.

La alta sensibilidad y especificidad se observa especialmente en mujeres mayores de 30 años, pero también por debajo de esta edad (a pesar de la elevada frecuencia de infecciones VPH transitorias en este colectivo). Un estudio destaca que la valoración de criterios morfológicos e inmunohistoquímicos incrementa de forma notable la especificidad de la técnica, lo que puede ser especialmente útil en mujeres jóvenes<sup>163</sup>.

En la Guía de cribado del CCU de 2014 se describen las estrategias de actuación clínica en mujeres con prueba de detección del VPH positiva y citología negativa, que incluye la tinción dual (Figura 22)<sup>129</sup>.

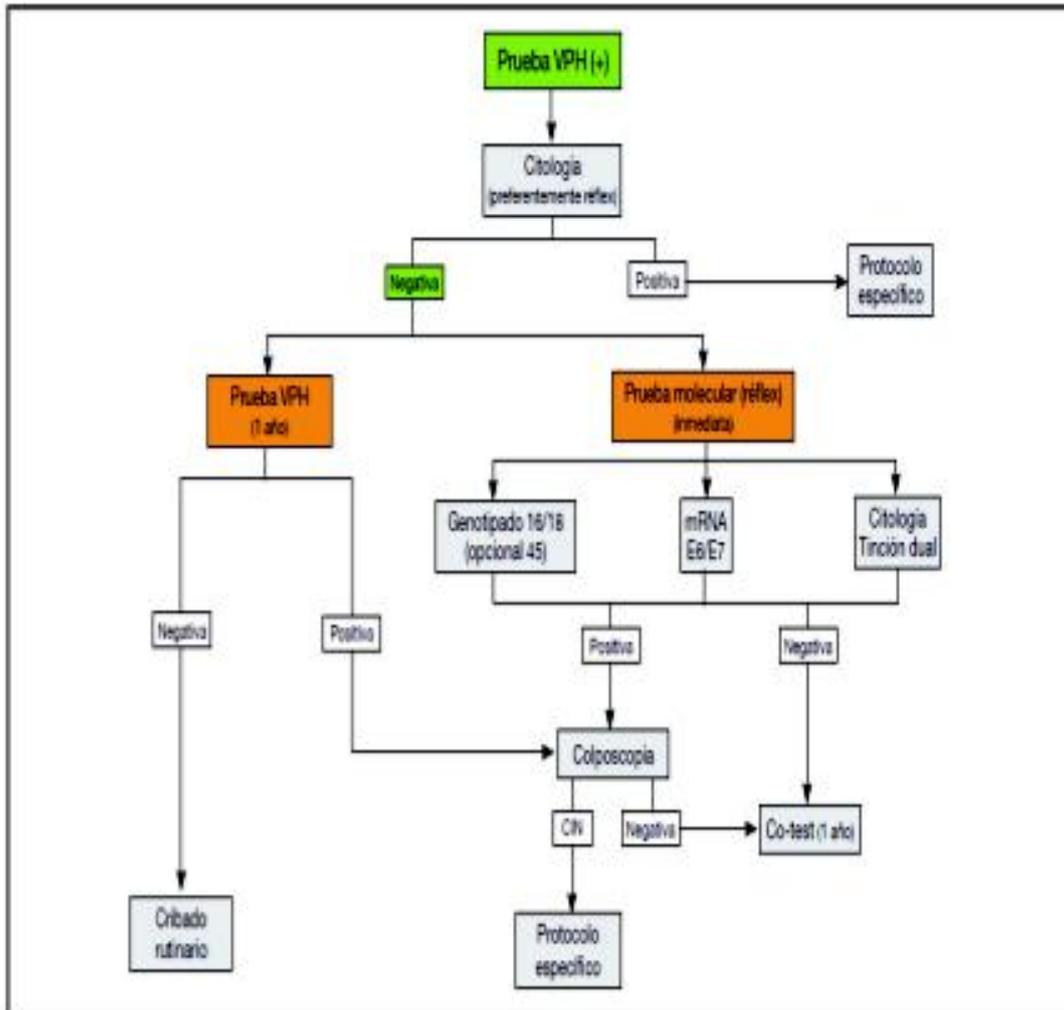


Figura 22. Algoritmo de actuación clínica en mujeres con prueba de detección del VPH positiva<sup>129</sup>.

#### 4. TRATAMIENTO DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Existen diversos tipos de tratamiento, los cuales se dividen en:

- **Destructivos:** producen una destrucción física de la lesión y, por tanto, no obtienen tejido para estudio histológico. Son la termocoagulación, electrocoagulación, criocoagulación y vaporización con láser de CO2.
- **Escisionales:** extirpan la lesión, por ello puede realizarse el estudio histológico, que permitirá descartar la presencia de microinvasión o invasión, que está presente en un 6-12% y un 2% respectivamente. Son la conización y la histerectomía.

### 4.1. Conización

La técnica consiste en la exéresis de toda la zona de transformación (ZT), incluyendo la lesión. Dicha exéresis puede realizarse con bisturí frío o láser CO<sub>2</sub>, aunque la técnica más extendida en la actualidad es la exéresis con asa de diatermia, la cual se considera un método seguro y eficaz.

La escisión con asa diatérmica fue introducida por Cartier en 1984 para la toma de biopsias con fines diagnósticos. En 1989 Prendiville<sup>164</sup> propuso la técnica con finalidad terapéutica al incorporar asas de mayor tamaño que permiten la exéresis de toda la zona de transformación. En Europa la técnica se conoce como LLETZ (*Large Loop Excision of the Transformation Zone*) y en Estados Unidos se emplean las siglas LEEP (*Loop Electrical Excision Procedure*).

En general, la escisión debe adaptarse al tamaño y características lesionales. Se distinguen 3 tipos de escisión<sup>132, 165</sup> según la presencia de componente endocervical de la lesión:

- Escisión tipo 1: aplicable en casos con ZT tipo 1, en los que el asa diatérmica no debe incluir canal endocervical ni superar los 8 mm de profundidad.
- Escisión tipo 2: indicada en ZT tipo 2, implica reseca una pequeña parte de canal endocervical visible mediante colposcopia.
- Escisión tipo 3: indicada en ZT tipo 3, incluye parte de epitelio endocervical.

Un estudio reciente<sup>166</sup> compara la efectividad de la conización en lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado mediante electroescisión quirúrgica con Asa de Trucone y con asa diatérmica. Concluyen que ambas asas fueron efectivas, aunque se encontraron diferencias significativas a favor del asa de Trucone, en cuanto a menor tiempo quirúrgico, menor compromiso de los bordes y menor frecuencia de recidivas.

### 4.2. Seguimiento postratamiento de la lesión escamosa de alto grado

Aunque los porcentajes de éxito de los tratamientos actuales son superiores al 95%, el seguimiento postratamiento es necesario. Las mujeres tratadas por CIN presentan un riesgo de desarrollar un cáncer invasor 5 veces mayor que el de la población general, y éste puede aparecer en un periodo de 10 a 20 años después del tratamiento<sup>167</sup>.

El riesgo de recurrencia es aproximadamente un 15% (5-25%), y la mayoría de las recurrencias se dan en los dos primeros años postratamiento, aunque el riesgo está incrementado en las dos siguientes décadas<sup>168</sup>.

La enfermedad **residual** es aquella lesión que se pone de manifiesto en cualquiera de los controles realizados en el curso de los 12 primeros meses después del tratamiento. La enfermedad **recurrente** es la que se presenta después del primer año de seguimiento, durante el cual tanto la citología como la colposcopia han sido negativas.

Se han propuesto diferentes protocolos de seguimiento postratamiento<sup>169, 170</sup>. Se recomienda citología y colposcopia cada 6 meses y determinación del test de VPH a los 6-12 meses. Si dos citologías consecutivas son negativas o el test viral es negativo la paciente puede volver al cribado normal durante un mínimo de 20 años<sup>171</sup>.

La sensibilidad del test de VPH para detectar lesión persistente o recurrente<sup>172-176</sup> alcanza el 90% a los 6 meses del tratamiento y se mantiene así hasta los 24 meses<sup>172</sup>.

Los factores que se han asociado a un mayor riesgo de persistencia o recurrencia son:

- Tamaño lesional.
- Estado inmunológico
- Edad de la paciente (50 años)
- Persistencia de infección por VPH postratamiento
- Afectación de los márgenes quirúrgicos.

Las pacientes con persistencia del VPH (especialmente el VPH 16) después de la conización tienen un riesgo del 40% de CIN 2+ en los dos años siguientes<sup>173</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La afectación de los márgenes quirúrgicos no es sinónimo de enfermedad residual, ya que la mayoría de las pacientes con márgenes positivos no presentan fallos del tratamiento, y los márgenes libres de enfermedad no garantizan el éxito del tratamiento tampoco. Los márgenes afectos pueden ser consecuencia de la respuesta inflamatoria de la herida o por el efecto de la temperatura durante el procedimiento escisional del asa de diatermia<sup>174</sup>.

La conducta ante márgenes afectos, normalmente, es el seguimiento con controles citológicos, colposcópicos y test de VPH. En caso de persistencia o de recidiva está indicada una segunda conización. En mujeres mayores de 50 años con afectación del margen endocervical, se acepta un tratamiento inmediato, la re-conización o la histerectomía, ya que son un grupo de alto riesgo de recurrencia<sup>174</sup>.

Las pautas para el seguimiento postratamiento de la CIN descritas en la Oncoguía SEGO<sup>165</sup> de 2014 se muestran en la Figura 23.

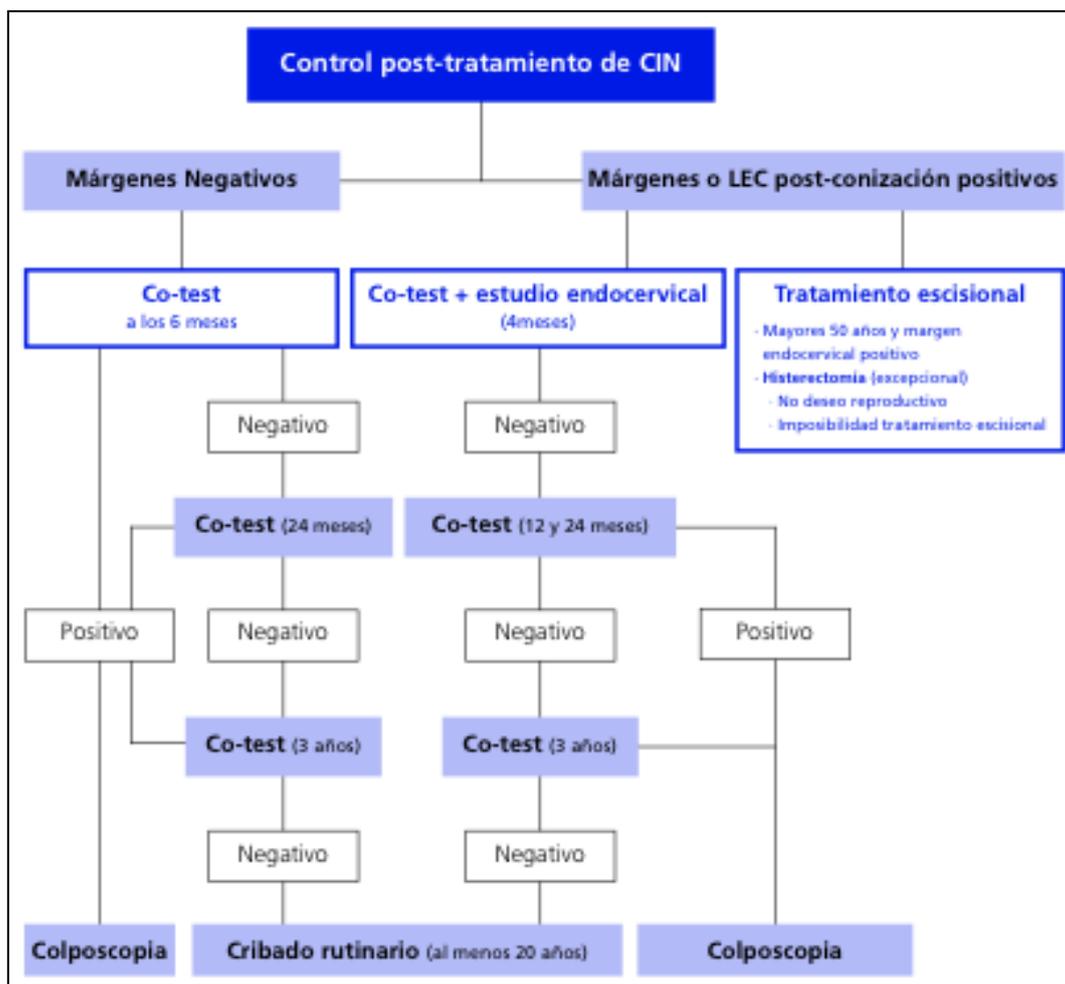


Figura 23. Algoritmo de seguimiento postratamiento de CIN. Oncoguía SEGO 2014<sup>165</sup>.

# **PLANTEAMIENTO DEL TEMA, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

La afectación de los márgenes quirúrgicos en la conización ha sido descrita como la causa principal de enfermedad residual. Ha demostrado ser un factor predictor independiente de recurrencia, con presencia de lesión residual tras reconización/histerectomía en el 51,8% de los casos<sup>177</sup>.

La tasa de enfermedad residual después de una conización independientemente de la modalidad terapéutica, según Martin-Hirsch<sup>178</sup>, es del 3-10%.

El porcentaje de afectación de márgenes publicado en la literatura es muy variable. Se ha descrito una incidencia de márgenes afectados hasta en el 48% de los casos en los que se realiza un tratamiento escisional<sup>179-181</sup>.

La afectación de los márgenes de resección es un factor asociado a la persistencia lesional. La afectación del margen endocervical supone mayor riesgo de lesión residual que la afectación del margen exocervical. La afectación de 2 o 3 márgenes (exocervical, endocervical y profundo o lateral) presenta una elevada probabilidad de lesión residual<sup>182</sup>.

Un margen afectado no es sinónimo de lesión residual, puesto que aproximadamente un 60% de las pacientes con márgenes positivos no presentan CIN en el seguimiento posterior<sup>183</sup>.

La persistencia de infección por VPH-AR se considera un factor estadísticamente significativo de recurrencia y un marcador temprano de fallo terapéutico. Las mujeres con elevado riesgo de persistencia del VPH (mayores de 50 años con lesiones extensas y/o márgenes afectos o inmunosuprimidas) presentan un alto riesgo de recurrencia.

Existe en la actualidad evidencia concluyente de que la infección por alguno de los tipos de VPH-AR, no es solo necesaria para el desarrollo de lesiones de alto grado, sino también para el desarrollo de las segundas lesiones tras el tratamiento. Son numerosas además las evidencias de que un tratamiento efectivo elimina tanto la lesión pre-maligna como el VPH-AR causante. Por el contrario, en las mujeres que desarrollan lesión persistente/recurrente la infección por VPH-AR también persiste tras el tratamiento<sup>184</sup>.

## OBJETIVOS

Diversos estudios han evaluado el rendimiento clínico de la combinación de biomarcadores virales en el cáncer cervicouterino. En general, la mayoría de los métodos disponibles tienen una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de CIN2, como la tinción dual p16/Ki-67<sup>150</sup>.

En este trabajo de investigación nos planteamos la necesidad de dar respuesta a un problema clínico-asistencial que se observa en la práctica clínica diaria en las Unidades de Patología del TGI, y es la alta incidencia de conizaciones por lesiones escamosas de alto grado junto a un elevado número de casos con afectación de los bordes quirúrgicos de resección.

Por todo lo anteriormente expuesto planteamos la siguiente **hipótesis de trabajo**: la realización del test dual p16/Ki-67 en estos conos con márgenes afectos de enfermedad podría ser un factor determinante en el seguimiento clínico de estas pacientes. Expresado de otra forma, si la positividad en los márgenes endocervicales del cono nos obligaría a ampliar el tratamiento quirúrgico, y su negatividad nos permitiría un seguimiento clínico, en la Unidad del TGI, de forma menos estricta.

Para contrastar esta hipótesis diseñamos nuestra memoria de forma retrospectiva, sobre todas las conizaciones llevadas a cabo en la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, durante 5 años y nos planteamos los siguientes objetivos :

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO PRINCIPAL

-Comprobar si la tinción dual p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67, método de diagnóstico inmunohistoquímico, se expresa en los márgenes de los conos afectos de SIL-AG, asociándose con lesiones CIN2+ subyacentes.

### 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

**2.1.** Analizar la influencia de los cofactores de riesgo de cáncer de cérvix en nuestras mujeres conizadas por SIL-AG y con afectación de lesión escamosa en sus bordes.

**2.2.** Establecer si existe relación entre los márgenes afectos por SIL alto grado y la persistencia del VPH-AR tras la conización.

**2.3.** Investigar la relación entre la tinción dual p16/Ki-67 y la persistencia de VPH-AR en las conizaciones, con márgenes afectos, por SIL-AG confirmados histológicamente.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 1. ÁMBITO DE TRABAJO: POBLACIÓN DE ESTUDIO

Nuestro estudio abarca la población femenina de Málaga, que según el Servicio Andaluz de Salud corresponde al Hospital Universitario Virgen de la Victoria y su Centro de Especialidades San José Obrero incluyendo los distritos sanitarios de Málaga Centro-Área metropolitana de Málaga, Málaga Oeste, Torremolinos-Churriana y Coín-Valle del Guadalhorce. También somos unidad de referencia para patología del TGI del municipio de Benalmádena. Dicha población está integrada por 7 Zonas Básicas, con 33 Centros de Salud y 16 Consultorios Rurales.

En cifras absolutas de población vienen a significar aproximadamente 155.877 mujeres con edades comprendidas entre los 20 y los 65 años<sup>185</sup>, a las que se les ha practicado un cribado mixto (poblacional y oportunista) mediante citología convencional (triple toma de Wied) desde el 1 de Julio del 2008 hasta el 1 de Julio de 2013 (cinco años completos e ininterrumpidos).

En nuestra Comunidad Autónoma de Andalucía se está aplicando la siguiente estrategia de cribado: Proceso Asistencial Integrado (PAI) de Cáncer de cérvix-Cáncer de útero de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, aprobado en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga (HUVVM) en noviembre del 2006 e implantado desde enero del 2008, y del cual se ha efectuado una revisión en diciembre del año 2010<sup>16</sup>.

-Programa de cribado: oportunista, aunque existen iniciativas para mejorar la captación y adherencia al cribado por parte de los médicos de Atención Primaria.

-Población diana: mujeres no hysterectomizadas a partir de los 3 años de inicio de las relaciones sexuales y hasta los 65 años.

-Prueba e intervalo de cribado: citología trienal después de dos citologías realizadas con intervalo de 1 año, con resultado valorable y negativo.

-Aquellas mujeres con 65 años que no se han realizado ninguna citología en los últimos 5 años requieren 2 citologías normales, de intervalo anual, para finalizar el programa de cribado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro estudio se analizan las citologías de cribado tanto del área de salud asignada a la Unidad de Patología del TGI hospitalaria como de las consultas ginecológicas hospitalarias, y también del Centro de Especialidades San José Obrero. La población femenina asignada es fundamentalmente urbana, ya que la mitad corresponde al municipio de Málaga y la mitad del resto está constituida por zona periurbana o municipios de la Costa de Sol.

Del total de la población, nuestro estudio lo centramos en las mujeres que fueron diagnosticadas de anomalías citológicas, compatibles con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL), y que tras el estudio en la Consulta de Patología del TGI fueron sometidas a una conización, y en el análisis anatomopatológico posterior se vio que resultaron con márgenes afectados de enfermedad, y a los que posteriormente se les aplicó el test dual p16<sup>Ki-67</sup>.

De las 480 conizaciones realizadas en los 5 años del periodo de estudio, nuestra muestra está constituida por 95 mujeres conizadas con el diagnóstico de afectación de los márgenes quirúrgicos (19,8%), que incluye 80 lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (SIL-AG) y 15 de bajo grado (SIL-BG).

Al total de esta muestra de mujeres conizadas, que previamente fueron diagnosticadas de alteraciones citológicas (HSIL, ASC-H, AGUS,...), además se les practicó una colposcopia, un estudio molecular para la determinación de ADN-VPH y una biopsia dirigida bajo control colposcópico en la Consulta de Patología del TGI de dicho Centro hospitalario.

Todos los casos fueron diagnosticados por el mismo equipo de profesionales que integran la Sección de Citodiagnóstico de la UGC de Anatomía Patológica, y la Unidad de Patología del TGI de la UGC de Obstetricia y Ginecología, del mismo Centro hospitalario.

## 2. METODOLOGÍA DE TRABAJO

Se ha realizado un estudio poblacional, de corte transversal, de tipo observacional y descriptivo (retrospectivo).

### 2.1. Criterios de inclusión

Se incluyeron en esta memoria todas las pacientes que reunían los siguientes requisitos:

- Mujeres sometidas a una conización cervical, y con resultado histológico de afectación de los bordes del mismo, durante los cinco años que abarca el estudio (1 julio 2008 a 1 julio 2013).
- Diagnosticadas previamente con citología de HSIL, ASC-H, AGUS,...; que además se les hubiera practicado una colposcopia, una determinación de ADN-VPH, así como una biopsia dirigida.

### 2.2. Criterios de exclusión

- Mujeres conizadas en las que el estudio de los márgenes de resección resultó dudoso o no valorable, por los patólogos, debido fundamentalmente a artefactos de los mismos.
- Aquellos casos con sospecha histológica de microinvasión del estroma.
- Pacientes en las que el estudio histológico definitivo del cono fue negativo (cono “en blanco”).

### 3. RECOGIDA DE MUESTRAS

La recogida de muestras fue centralizada en la UGC de Anatomía Patológica del HUVVM. A partir de las historias clínicas de las pacientes se obtuvo el número de biopsia correspondiente. Con estos números, se recuperaron las muestras histológicas de las conizaciones, teñidas con Hematoxilina y Eosina (HE), de cada paciente del archivo de Anatomía Patológica. A cada pieza de conización con margen afecto se le asignó un número, de forma correlativa, desde el inicio del período de tiempo comprendido en el estudio hasta el último, en julio del 2013.

El estudio se adaptó estrictamente y en todo momento a las leyes de protección de datos y de protección de los derechos de las pacientes.

Todos los datos que pudieran afectar a la intimidad de las pacientes se recogieron en una base de datos protegida. No se hizo referencia alguna a sus nombres ni se les identificó en ningún informe o publicación. El análisis de la información se hizo siempre de forma agregada y nunca individual. Los datos personales se desvincularon permanentemente de los datos clínicos con el fin de proteger la identidad de las participantes (método de “anonomización” de datos). La base de datos del estudio se encontraba protegida electrónicamente con una clave para limitar el acceso únicamente a los investigadores.

La técnica inmunohistoquímica p16/Ki-67, en las muestras seleccionadas, fue aplicada en la Unidad de Apoyo a la Investigación Oncopatológica, ubicada en la Unidad Docente de Anatomía Patológica, en Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

### 4. ESTUDIO CITO-HISTOLÓGICO CONVENCIONAL

El diagnóstico se realizó mediante la aplicación consecutiva de tres pruebas básicas:

- La primera es la **citología cervicovaginal**, mediante la triple toma de Wied: exocérvix, fondo de saco vaginal y endocérvix, ésta última con cepillo de Stormby endocervical. En el caso de que la paciente presente ya una citología anormal, sólo se repetirá la citología si el intervalo es de tres meses como mínimo (lo contrario, pensamos, solo hace aumentar el número de falsos negativos).
- En segundo lugar, la **colposcopia** permite la localización de la lesión, su extensión tanto en el exocérvix como en la vagina, y si se introduce por el canal endocervical.
- La tercera prueba diagnóstica es la **biopsia dirigida por colposcopia**. Si la zona de transformación no es visible, está situada en el canal cervical, algunas veces, optamos por realizar una cervico-histeroscopia que permite su visualización, o bien en su defecto, realizamos un legrado endocervical, teniendo en cuenta que el material aquí obtenido suele ser escaso y sin relación con el estroma, por lo que el resultado, en muchos casos, será valorado con reservas<sup>186</sup>.

#### *Estudio cito-histológico convencional*

Las extensiones cervico-vaginales remitidas en portas fijados, desde las consultas de Atención Primaria y de Atención Especializada, fueron registradas en la UGC de Anatomía Patológica según datos de filiación (nombre y apellidos, edad, Nº de Seguridad Social, NUSSA,...). Tras ello se inició el procedimiento de tinción clásica de Papanicolaou en equipo automatizado Leica® y tras el montaje se realizó el screening por dos citotécnicos, con confirmación posterior por el patólogo.

El informe anatomopatológico de la citología cervicovaginal se realizó siguiendo la clasificación Bethesda para interpretación de citología cervicovaginal<sup>120</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las piezas de biopsia y conización cervical fueron manejadas de la forma convencional para su estudio histopatológico. Se recibieron fijadas en formol marcadas las conizaciones con un hilo de sutura a las 12 horas y tras ser seccionadas por dicho punto en sentido cráneo-caudal, se realizaron cortes seriados en sentido horario y fueron divididas en cuadrantes, comprendidos entre las 0 y 3 horas, entre las 3 y 6, entre las 6 y las 9, y finalmente entre las 9 y las 12 horas.

Cada cuadrante fue seccionado en cortes convencionales de un grosor de 2 a 3 mm. Obteniéndose de 3 a 4 cortes de tejido por cada cuadrante, en total de 12 a 16 cortes por cada cono. Los cortes de tejido fueron procesados y teñidos con Hematoxilina y Eosina (HE) para su estudio histopatológico rutinario.

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

## 5. DETECCIÓN DEL ADN DEL VPH POR TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### *Extracción de ADN genómico*

- A partir de tomas citológicas. Se coloca la torunda en 1,5 ml de solución salina (PBS). Se agita la torunda dentro del tubo para que las células pasen al líquido. Se centrifuga a media potencia durante 5 min para que las células decanten al fondo del tubo. Se retira el sobrenadante.
- Se realizaron de 1-4 cortes de 10 micras de cada muestra tumoral (según la cantidad de material presente en cada sección).

La extracción del ADN se realiza en ambos casos de manera automatizada y siguiendo las instrucciones del Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification kit (Promega®).

### *Reacción de amplificación e identificación del genotipo*

El ADN extraído y purificado se utilizó como molde para detectar la presencia de ADN del VPH mediante amplificación por PCR usando cebadores Gp5-6 específicos de la región consenso L1.

Para la identificación del tipo de virus se empleó el kit VPH-GenoArray, Master Diagnostica® S.L. Granada, que permite la detección de 17 tipos específicos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66/68, 73, 82) y 16 de bajo riesgo (6, 11, 40/61, 42, 43/44, 54/55, 70, 57/71, 72, 81, 84/26). Esta identificación se realiza mediante amplificación por PCR de un fragmento de 450 pb de la región consenso L1 e hibridación reversa con sondas específicas para cada tipo (Figura 24).

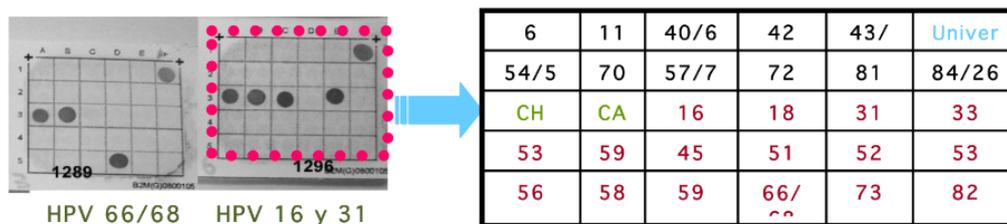


Figura 24. Identificación del genotipo mediante PCR seguida de hibridación en membrana.

## 6. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA: TINCIÓN DUAL p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 (CINtec® PLUS)

El estudio inmunohistoquímico se ha realizado en muestras histológicas obtenidas a partir de las conizaciones, previamente teñidas con HE. A todas las muestras se les retiró, inicialmente, el cubreobjetos sumergiéndolas en xilol. Tras aproximadamente una semana fueron sometidas a un proceso de doble inmunotinción para la determinación de la inmunoexpresión de las proteínas p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 con el CINtec® PLUS Kit (Roche-mtm Laboratories, Heidelberg, Germany), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Figura 25).

El anticuerpo utilizado para la determinación de la proteína p16 fue el anticuerpo primario monoclonal de ratón, clon E6H4<sup>TM</sup>, y un anticuerpo primario monoclonal de conejo, clon 274-11 AC3, frente a la proteína humana Ki-67.

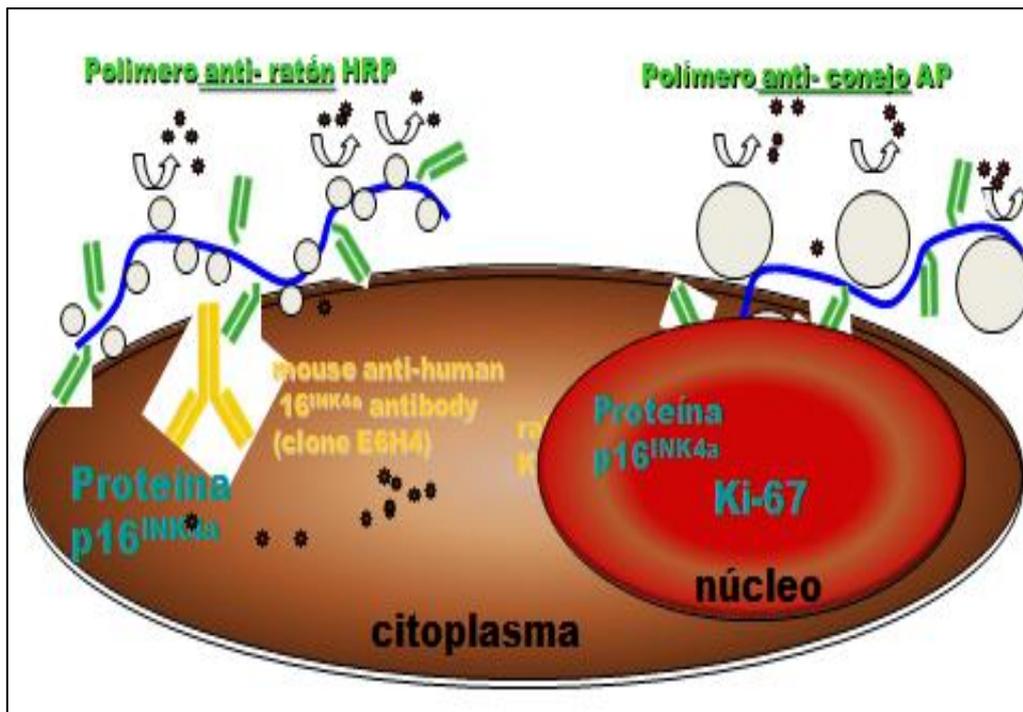


Figura 25. Tinción dual p16/Ki-67. Principio del procedimiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La inmunotinción se llevó a cabo en el inmunoteñidor automático Autostainer Plus (Dako, Copenhagen, Denmark) usando un sistema de revelado basado en dos reactivos de polímeros conjugados: con peroxidasa de rábano y otro polímero conjugado con fosfatasa alcalina. El cromógeno empleado fue diaminobencidina para la peroxidasa y Fast Red para la fosfatasa alcalina con contratinción de hematoxilina. Como control negativo se sustituyó el anticuerpo primario por un suero no inmune. El control positivo utilizado fueron muestras tumorales procedentes de neoplasias de cérvix conocidas previamente como positivas para p16.

Todas las tinciones fueron valoradas por el patólogo y se clasificaron dicotómicamente como p16/Ki-67 negativas (ausencia de tinción) (Figura 26 A) o p16/Ki-67 positivas (tinción fuerte y difusa) (Figura 26 B), conforme al atlas y guía del producto:

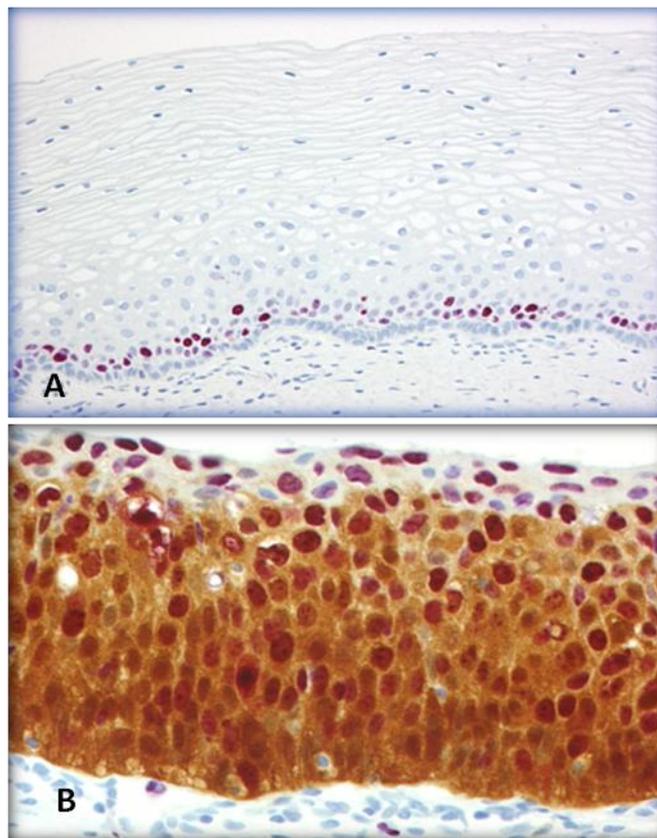


Figura 26. Test dual p16/Ki-67. A. Negativo. B. Positivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

-El procedimiento del CINtec® PLUS Kit genera dos productos de reacción de distinto color: uno marrón que se precipita en el lugar donde hay antígeno p16<sup>INK4a</sup> y otro rojo que se precipita en el lugar donde hay antígeno Ki-67. La tinción de células con color marrón (citoplasma y/o núcleo) indica la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup>. La tinción de células con color rojo (núcleo) indica la expresión de Ki-67. Las células con ambas tinciones mostrarán una tinción marrón citoplasmática con un núcleo típicamente de color rojo intenso, que son indicativos de una expresión simultánea de p16 y Ki-67.

-La presencia de una o más células cervicales epiteliales con la presencia de ambas tinciones, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo dentro de la misma célula, se interpreta como un resultado positivo del test dual.

-Si no se detectan células cervicales epiteliales con la presencia de ambas, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo, se interpreta con un resultado negativo del test dual.

-La presencia de células cervicales epiteliales que muestren inmunoreactividad a tan sólo uno de los dos marcadores (como por ejemplo sólo la tinción marrón por p16 o sólo la tinción roja por Ki-67) no se considerarán un resultado positivo del test dual; incluso si ambos tipos de células cervicales que muestran una inmunoreactividad se encuentran en la misma muestra.

-Si se detectaran células con indicación de discariosis severa que no presenten la tinción de ambos marcadores, p16 y Ki-67, los criterios morfológicos de interpretación no se deben ignorar.

## 7. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS

Las variables analizadas han sido recogidas de las historias clínicas de las pacientes depositadas en el Servicio de Documentación Clínica del HUVVM.

Atendiendo a la naturaleza de la variable, así como su posible relación con nuestra variable principal (lesión histológica), éstas pueden clasificarse en los siguientes grupos:

### A. VARIABLES DEMOGRÁFICAS

- EDAD: expresada en años, en el momento de la práctica de la conización cervical, y que aparecía registrada en la historia clínica de la paciente.
- NACIONALIDAD: haciendo distinción entre pacientes españolas, procedentes de otros países europeos, América del Sur, y del resto de continentes.
- MENOPAUSIA: sí/no. Si la paciente era menopáusica o no en el momento de la cirugía.

### B. VARIABLES RELACIONADAS CON LOS COFACTORES DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO

- EDAD DE LA PRIMERA RELACIÓN SEXUAL: expresada en años. En la expresión de los resultados se agrupó:  $\leq 15$  años, 16 - 20 años, 21-29 años y  $\geq 30$  años.
- NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES: hasta el diagnóstico de la lesión intraepitelial y según confesaba la paciente en el momento de la realización de la anamnesis.
- HÁBITO TABÁQUICO: según estuviese recogido en la historia clínica de la consulta del TGI. No fue posible determinar el número medio de cigarrillos/día, por lo que nos limitamos a recoger: fumadora sí/no; ex fumadora (más de 1 año).
- PARIDAD: número de partos y abortos que constaban en la historia obstétrica en el momento de la intervención quirúrgica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

➤ **ANTICONCEPCIÓN HORMONAL:** se han incluido anticonceptivos orales, el parche y el anillo vaginal. Se especificó el tiempo de utilización de los mismos ( $\geq$  de 3 años y  $<$  de 3 años) que constaba en la historia clínica.

➤ **ESTADO INMUNOLÓGICO:** Se han incluido los procesos intercurrentes que más menoscaban las defensas inmunológicas, como infección por VIH, paciente trasplantada en tratamiento con ciclosporina, enfermedades autoinmunes en tratamiento con corticoides, y otros.

➤ **VACUNACIÓN FRENTE AL VPH:** si la mujer estaba vacunada o no, y el tipo de vacuna, bivalente o tetravalente.

### C. VARIABLES DIAGNÓSTICAS

➤ **DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO:** basándonos en la clasificación Bethesda<sup>120</sup>.

➤ **PARÁMETROS DERIVADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR DEL VPH:** en la base de datos se incluyeron los genotipos obtenidos para cada caso positivo. Los resultados los clasificamos en:

- VPH positivo o negativo.
- Genotipo VPH-AR.
- Patrón de infección VPH:
  - Infección simple, cuando la muestra mostró infección por un único genotipo de alto riesgo.
  - Infección múltiple, en los casos en los que se observó más de un genotipo de alto riesgo.

➤ **RESULTADOS COLPOSCÓPICOS:** se evaluó, en primer lugar, si la colposcopia era adecuada o no. En los casos en los que la colposcopia fue adecuada, se estudió el tipo de zona de transformación (ZT), siguiendo la Clasificación de Río de Janeiro<sup>132</sup> de 2011. Los hallazgos colposcópicos anormales se catalogaron como Grado 1 (cambios menores) y Grado 2 (cambios mayores). También se recogieron las imágenes sugestivas de carcinoma invasor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación localizamos la lesión siguiendo su distribución horaria y describimos el tamaño de la misma (número de cuadrantes). Así como si se introducía o no por el orificio cervical externo (la lesión alcanzaba el canal endocervical).

➤ **FECHA DE LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA:** desde el 1-7-2008 hasta el 1-7-2013.

➤ **CONCORDANCIA HISTOLÓGICA ENTRE LA BIOPSIA CERVICAL Y LA CONIZACIÓN:** analizando el grado de correlación entre el diagnóstico definitivo de la pieza quirúrgica y el diagnóstico histológico previo a la intervención quirúrgica.

➤ **DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO DEFINITIVO:** de las lesiones intraepiteliales cervicales, siguiendo la Clasificación de Richart, la cual hace constar que la neoplasia cervical intraepitelial tiene tres grados, según sea la afectación del espesor del epitelio escamoso (Figura 27):

- **CIN1 (Grado 1):** representa una displasia leve y es considerada una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. La lesión se limita al tercio basal del epitelio cervical.
- **CIN2 (Grado 2):** es considerada una lesión escamosa intraepitelial de alto grado. La lesión está confinada a los 2/3 basales del epitelio cervical, antes se denominaba displasia moderada.
- **CIN3 (Grado 3):** también es una lesión escamosa de alto grado y la displasia es severa. Ocupa más de 2/3 del epitelio cervical, en algunos casos incluyendo todo el grosor del revestimiento cervical. Dicha lesión se considera como un carcinoma in situ.

Así como el diagnóstico de la estirpe del tumor: si es una lesión escamosa, glandular, o ambas; y si había o no afectación glandular. Se registraron los casos con legrado endocervical postconización positivos para lesión intraepitelial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

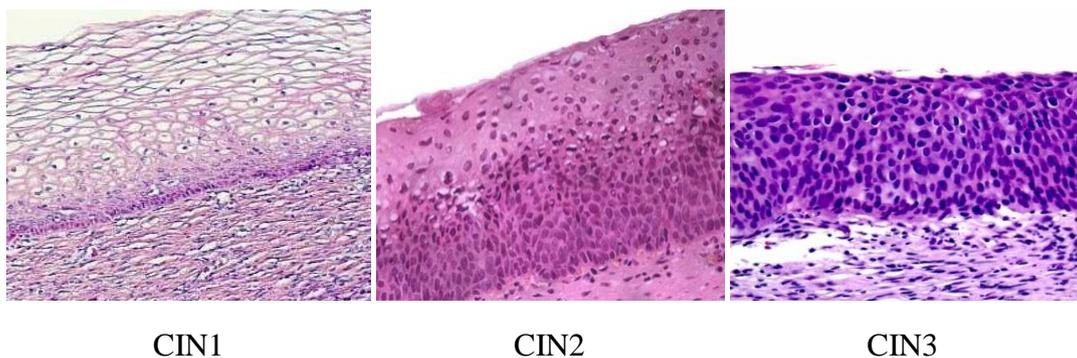


Figura 27. Neoplasia Intraepitelial Cervical.

El Colegio Americano de Patólogos (CAP) y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP) han establecido una nueva terminología histopatológica denominada “**LAST**” (Lower Anogenital Squamous Terminology), que incluye los conocimientos actuales sobre la infección VPH, incorpora el uso de biomarcadores y facilita la comunicación entre profesionales<sup>187</sup>. Esta terminología ha sido recogida en la última clasificación de la OMS para las neoplasias del tracto genital femenino publicada en 2014.

La terminología LAST clasifica las SIL histológicas asociadas al VPH en dos grados, lesiones de bajo grado (LSIL) y lesiones de alto grado (HSIL). La clasificación utiliza, por tanto, la misma terminología empleada para el resultado citológico en el sistema de Bethesda y emplea criterios semejantes. Los criterios histopatológicos que las define son:

- **LSIL:** proliferación de células escamosas o metaplásicas con características nucleares anormales (aumento de tamaño nuclear, membrana nuclear irregular y aumento de la relación núcleo/citoplásmica). Hay poca maduración del citoplasma en el tercio inferior del epitelio, pero la maduración comienza en el tercio medio y es relativamente normal en el tercio superior. Las figuras mitóticas están presentes sólo en la parte inferior del epitelio. Puede observarse coilocitosis, caracterizada por multinucleación, agrandamiento nuclear y pleomorfismo acompañado por halos perinucleares, sin las características de una lesión de alto grado. Bajo este término se incluyen las lesiones de CIN1 de la clasificación de Richart/OMS 2004.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- **HSIL:** proliferación de células escamosas o metaplásicas con características nucleares anormales (aumento de tamaño nuclear, membrana nuclear irregular y aumento de la relación núcleo/citoplásmica, acompañada de figuras de mitosis). Hay poca o nula diferenciación citoplasmática en los tercios medio y superficial del epitelio. Las figuras mitóticas no se limitan al tercio inferior del epitelio y se pueden encontrar en la parte media y/o superficial. Bajo este término se incluyen las lesiones de CIN2 y CIN3 de la clasificación de Richart/OMS 2004.

Se acepta que las LSIL/CIN1 son la expresión histológica de una infección productiva y autolimitada por VPH que comparte su misma historia natural y la mayoría de veces regresa espontáneamente. El seguimiento estricto de estas mujeres minimiza el riesgo que supone la falta de detección inicial de lesiones de alto grado. Por otro lado, las HSIL/CIN3 se consideran auténticas neoplasias intraepiteliales con elevado potencial de progresión y constituyen la lesión precursora necesaria del cáncer de cérvix. Contrariamente, el significado biológico de las lesiones de HSIL/CIN2 está mal definido ya que, en su evolución, tanto pueden regresar como progresar.

La determinación inmunohistoquímica de p16 permite una mejor categorización de las lesiones frontera entre bajo y alto grado, fundamentalmente clasificadas histológicamente hasta ahora como CIN2 mediante criterios exclusivamente morfológicos. Las lesiones CIN2 p16-positivas se incluyen en la categoría HSIL dado su mayor riesgo de progresión, y las CIN2 p16-negativas se reclasifican como LSIL dado su comportamiento benigno y su bajo riesgo de progresión. La aplicación del marcador p16 para aclarar el significado de una CIN2 se ha estimado que sería necesario aplicarlo en menos del 10% de todas las biopsias.

En nuestro estudio los posibles hallazgos encontrados en el estudio anatomopatológico han sido agrupados en dos categorías:

- **SIL-BG:** lesión intraepitelial escamosa de bajo grado que incluye las LSIL/CIN1.
- **SIL-AG:** lesión intraepitelial escamosa de alto grado que agrupa las HSIL/CIN2, CIN3 y carcinoma “in situ”.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- ESTUDIO DE LOS MÁRGENES DE LA PIEZA: según estuvieran o no afectados y su relación con la lesión histológica.
- VARIABLES RELACIONADAS CON EL OPERADOR- CIRUJANO: MIR, adjunto novel (experiencia < 10 años) o bien adjunto experto ( $\geq$  10 años).
- PARÁMETROS DERIVADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO: TEST DUAL p16/Ki-67

La tinción dual se valoró de la siguiente forma:

- Positiva cuando se observó al menos una célula con patrón de doble tinción p16/Ki-67.
- Negativa en ausencia del patrón de tinción doble.

Nuestra memoria se centró en los casos de los conos que mostraban, desde el punto de vista histológico, afectación en cualquiera de los bordes (exocervical, endocervical o ambos) y de cualquier grado de displasia (CIN1, CIN2, CIN3). A este grupo de conos histológicos son a los que posteriormente y de forma retrospectiva les hemos practicado el doble test inmunohistoquímico p16/Ki-67, según la técnica anteriormente descrita.

Para la aplicación del doble marcador a los bordes de las piezas de conización seguimos el siguiente guión:

- ✓ Al 97,9% de los casos en que el informe histológico evidenció afectación positiva de sus bordes, independientemente que fueran lesiones de alto grado (SIL-AG) o de bajo grado (SIL-BG).

En el período de estudio se realizaron 480 conizaciones, y el informe mostró afectación de los bordes en 80 SIL-AG y 15 SIL-BG. El test dual se aplicó a 78 SIL-AG y 15 SIL-BG.

- ✓ Así mismo para comparar con los casos de conizaciones con bordes no afectados (indemnes) se realizó el doble test al 10 % de la muestra (tanto si el informe histológico era de SIL-AG como de SIL-BG).

Del total de las 480 conizaciones resultaron 326 casos con bordes libres: 243 SIL-AG y 83 SIL-BG. Se aplicó el doble test a 24 SIL-AG y 10 SIL-BG.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- ✓ Además también se efectuó el doble test a un grupo control, aleatorio, compuesto por 22 cérvix amputados, que habían sido extirpados por otras causas distintas a procesos oncológicos, y con unas características demográficas y epidemiológicas similares al grupo sometido a estudio.

Las cifras absolutas y relativas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de la muestra del test dual p16/Ki-67 en las conizaciones con bordes afectos.

<b>BORDES CONIZACIÓN</b>	<b>LESIONES ALTO GRADO</b>	<b>LESIONES BAJO GRADO</b>	<b>Nº casos</b>	<b>Porcentaje %</b>	<b>MUESTRA p16/Ki-67</b>
<b>AFECTOS</b>	80	15	95	19.8	93
<b>INDEMNES</b>	243	83	326	67.9	34
<b>NO VALORABLES</b>	-	-	31	6.5	0
<b>CONOS NEGATIVOS</b>	-	-	28	5.8	0
<b>TOTAL</b>	<b>323</b>	<b>98</b>	<b>480</b>	<b>100</b>	<b>127</b>
<b>MUESTRA CONTROL</b>	-	-	100	22	22

### D. VARIABLES DE SEGUIMIENTO

➤ ANÁLISIS DE LOS TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS COMPLEMENTARIOS: si la paciente los recibió o no, en función del diagnóstico histológico definitivo del cono y de otros parámetros clínicos o los cofactores. Estos tratamientos fueron: reconización, histerectomía total, simple o ampliada. También se registró el diagnóstico de la estirpe tumoral: escamoso, glandular o ambos, o si la biopsia definitiva fue negativa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

➤ **INFECCIÓN PERSISTENTE POR VPH-AR EN EL CONTROL POSTOPERATORIO:** se estableció dicho control de ADN-VPH a los 6 meses de la conización, y a los 12 meses (si persistía positivo), mediante la técnica de PCR. Si este último PCR continúa positivo, se repite a los 24 meses de la intervención quirúrgica.

➤ **SEGUIMIENTO CLÍNICO:** expresado en meses, en nuestra Unidad de Patología del TGI, desde la realización de la conización hasta el cierre del trabajo de investigación, el 1 de Julio de 2014.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

La valoración de los resultados se ha realizado mediante pruebas estadísticas descriptivas y analíticas o inferenciales. La información se procesó mediante el programa informático para bases de datos Microsoft Excel®, y para el análisis de datos se ha empleado el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences® (SPSS, versión 22.0) para Windows.

### 8.1. Estadística Descriptiva

Dado que nuestra memoria es un estudio poblacional, de tipo observacional (de corte transversal) para evaluar en primer lugar la prevalencia de afectación de márgenes de nuestras conizaciones, y en segundo lugar, estudiar la aplicación del doble test p16/Ki-67 en dichos márgenes afectos, en mujeres que previamente fueron al médico de familia o al ginecólogo a someterse a una citología para el cribado de cáncer de cérvix, en Málaga, y que resultó patológica, lo cual obligó a la práctica de una conización, es por lo que los resultados que obtengamos del análisis estadístico de esta muestra, no serán extrapolables a la población general.

Hemos realizado, en primer lugar y con intención de obtener una valoración global de nuestra serie, un análisis descriptivo del total de variables, en el que se ha procedido de la siguiente manera:

- **Variabes cualitativas:** para este conjunto de parámetros se han calculado las tablas de frecuencia con las respectivas frecuencias absolutas y porcentajes.

- **Variables cuantitativas:** para el conjunto de naturaleza numérica se han determinado los estadísticos de tendencia central y dispersión usuales (media, desviación típica, rango, etc.).

### 8.2. Estadística Analítica o Inferencial

Para contrastar las posibles asociaciones entre dos o más variables y la intensidad de esa asociación se ha utilizado el siguiente criterio:

- Para el análisis comparativo de una variable numérica entre dos grupos independientes que siguen una distribución normal, se ha utilizado el test t-Student. En todos los casos se ha contemplado la homocedasticidad (igualdad de varianzas).
- Cuando hemos tratado de comparar más de dos grupos de una variable cuantitativa, el análisis se ha realizado utilizando el Análisis de la Varianza (ANOVA), en los casos en que la variable ha seguido una distribución normal. En las situaciones en las que las condiciones de normalidad y/u homocedasticidad (igualdad de la varianza) hayan sido violadas, se ha utilizado el test no paramétrico Kruskal-Wallis.
- Para el estudio de las relaciones entre variables cualitativas se ha utilizado las tablas de contingencia para su descripción, y el test Chi-cuadrado como test de independencia/homogeneidad.

En todos los casos se ha considerado la existencia de significación estadística a aquella con  $p \leq 0.05$ , y el intervalo de confianza se estableció en el 95%.

# RESULTADOS

---

## RESULTADOS

### 1. DESCRIPCIÓN DE LOS DATOS DEMOGRÁFICOS Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA

#### 1.1. Edad

La edad media de nuestra muestra, mujeres conizadas con márgenes afectos, fue 41,77 años, con un rango entre 20 y 71 años (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros descriptivos de la edad.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Edad (años)	95	20	71	41,77	10,44

Hemos agrupado las pacientes de nuestro estudio en grupos de edad de la siguiente forma: 20-30 años, 31-40 años, 41-50 años y >50 años, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 7):

Tabla 7. Grupos de edad (frecuencia absoluta y relativa).

Edad (años)	N	Porcentaje (%)
20-30	14	14,7
31-40	31	32,6
41-50	32	33,7
>50	18	18,9
Total	95	100,0

Analizando dichas edades de la muestra destaca el aumento de la frecuencia a partir de los 30 años. El 66% de las mujeres pertenecen al grupo de edad que comprende desde los 30 a los 50 años. Así se aprecia una disminución acusada de la misma a partir de los 50 años de edad (Figura 28).

## RESULTADOS

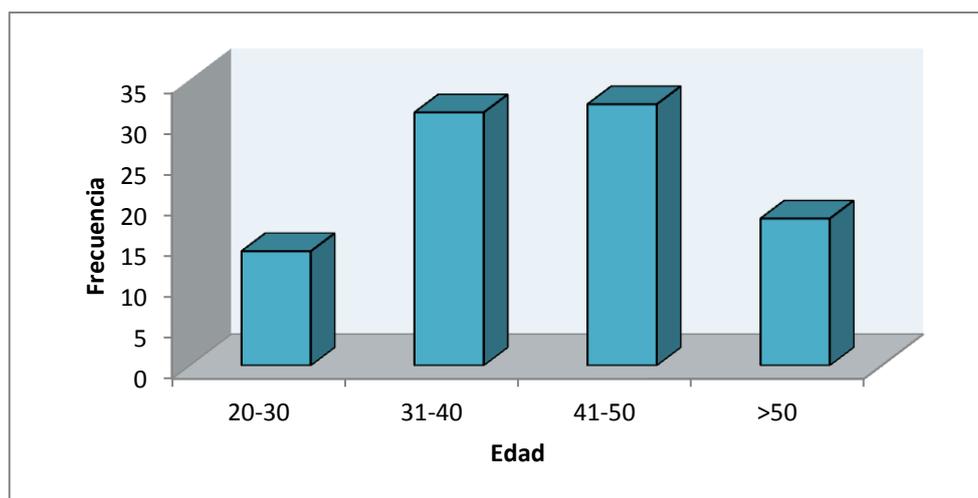


Figura 28. Distribución por edad (grupos etáreos).

### Lesión histológica y edad

En la siguiente tabla se expresan los valores medios de edad de las pacientes de nuestro estudio para cada una de las lesiones intraepiteliales escamosas: bajo grado (SIL-BG) y alto grado (SIL-AG) (Tabla 8).

Tabla 8. Descriptores de edad media de las pacientes por tipo de lesión.

Lesión	N	Media (años) p=0,054	Mínimo	Máximo	Desviación típica
<b>SIL-BG</b>	15	46,53	34	65	9,591
<b>SIL-AG</b>	80	40,87	20	71	10,407
Total	95	41,77	20	71	10,442

La Tabla 9 relaciona los distintos grupos de edad con la lesión histológica cervical.

## RESULTADOS

Tabla 9. Relación entre la edad (grupos etáreos) y lesión histológica.

p=0,07			LESIÓN		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
EDAD (años)	20-30	Nº casos	0	14	14
		% del total	0,0%	14,7%	14,7%
	31-40	Nº casos	5	26	31
		% del total	5,3%	27,4%	32,6%
	41-50	Nº casos	4	28	32
		% del total	4,2%	29,5%	33,7%
	>50	Nº casos	6	12	18
		% del total	6,3%	12,6%	18,9%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

Aunque no se observa significación estadística ( $p=0,07$ ) de aumento de la edad de las pacientes a medida que aumenta la gravedad de la lesión, ya que el diferencial de edad entre los casos de lesiones de bajo grado y alto grado es 5,6 años, sí se puede apreciar una tendencia por el mayor número de pacientes con SIL-AG entre los 30 y 50 años (Figura 29).

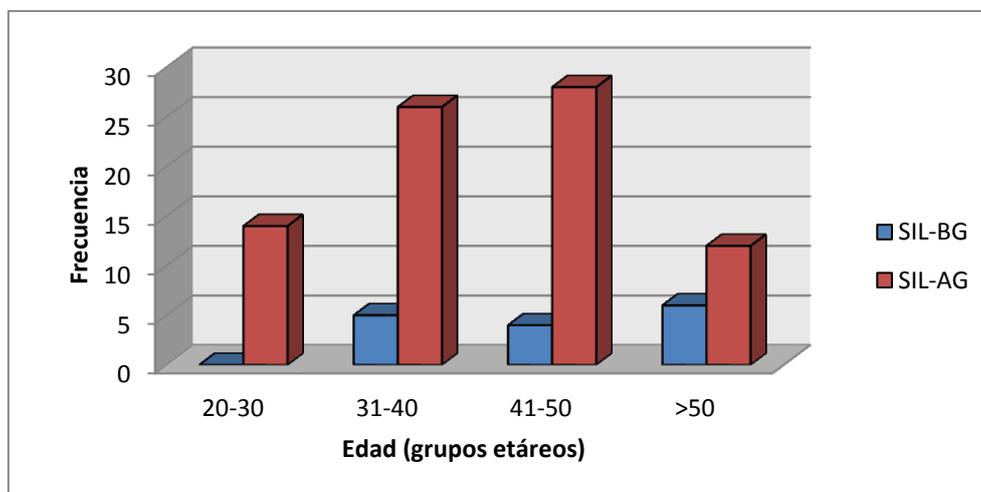


Figura 29. Grupos de edad y lesión histológica cervical.

## RESULTADOS

### 1.2. Nacionalidad de las pacientes

Analizando la procedencia de nuestras pacientes, obtenemos que la mayoría, concretamente el 76,8% (n= 73) son de nacionalidad española (Tabla 10). El segundo grupo mayoritario son las pacientes procedentes de América del Sur (9,5%).

Tabla 10. Nacionalidad de las pacientes.

NACIONALIDAD	N	Porcentaje (%)
ESPAÑOLA	73	76,8
AMÉRICA DEL SUR	9	9,5
RESTO DE EUROPA	8	8,4
RESTO DE CONTINENTES	5	5,3
Total	95	100,0

En el siguiente gráfico se puede observar la distribución de las pacientes en función de su procedencia (Figura 30):

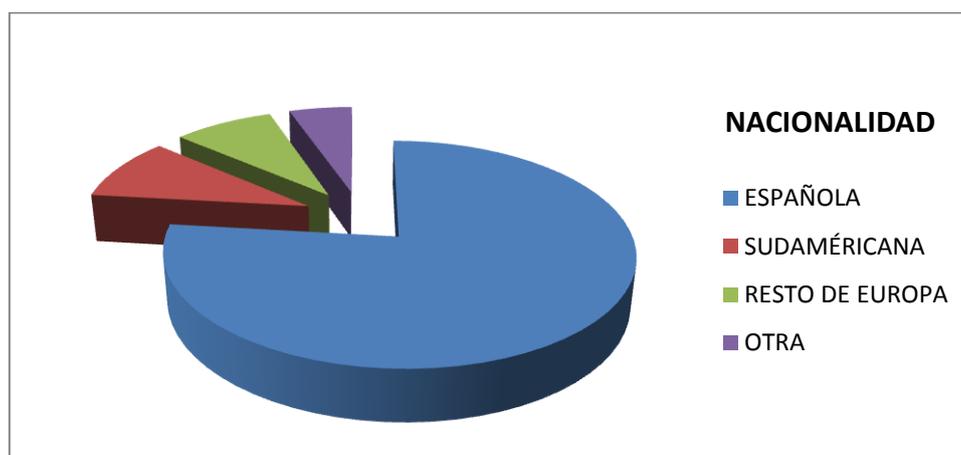


Figura 30. Distribución de la nacionalidad de las pacientes.

## RESULTADOS

### 1.3. Menopausia

Del total de las 95 mujeres, 22 pacientes (23,2 %) eran menopáusicas en el momento del diagnóstico, frente a 73 (76,8 %) que no lo eran (Figura 31).

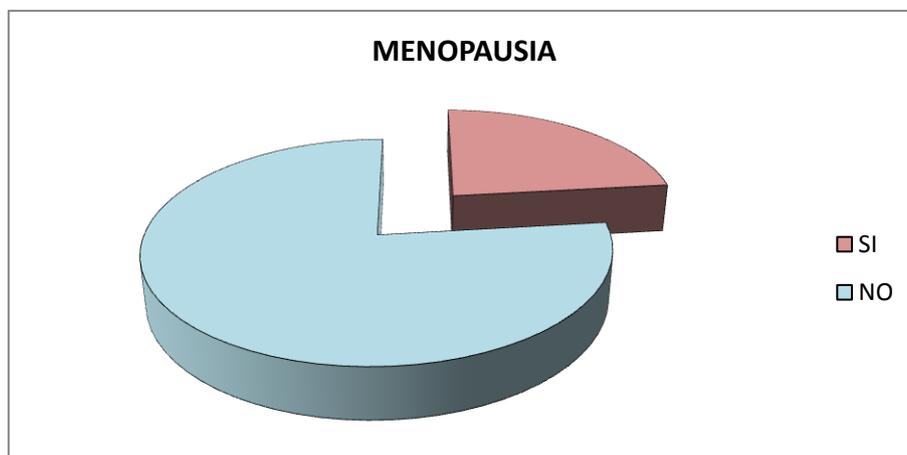


Figura 31. Estado menopáusico de las pacientes.

### Lesión histológica y estado menopáusico

No observamos significación estadística ( $p=0,092$ ) entre el grado de lesión histológica y el estado menopáusico de las mujeres (Tabla 11).

Tabla 11. Relación entre lesión histológica y menopausia.

$p=0,092$			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
Menopausia	SÍ	Nº casos	6	16	22
		% del total	6,3%	16,8%	23,2%
	NO	Nº casos	9	64	73
		% del total	9,5%	67,4%	76,8%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

## 2. DESCRIPCIÓN DE LOS COFACTORES Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA

A continuación presentamos el análisis de cada una de las variables consideradas como posibles factores de riesgo o relacionadas con el grado de lesión histológica de la paciente. Para su desarrollo y, para una mejor comprensión global de los resultados, hemos utilizado, para cada variable de interés, la siguiente estrategia:

- **Factores cualitativos:** tabla de contingencia y test Chi-cuadrado.
- **Factores cuantitativos:**
  - Análisis descriptivo de la variable independiente (factor).
  - Gráfica sobre su distribución de frecuencia.
  - Análisis bivalente inferencial que establezca su posible relación con el grado histológico.

### 2.1. COFACTORES DE ADQUISICIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH

#### 2.1.1. Edad de la primera relación sexual

Analizando la edad media de la “coitarquia” o edad de inicio de las relaciones heterosexuales con penetración de nuestra muestra estudiada, encontramos que dicha edad fue a los 18,17 años, con un rango comprendido entre 14 y 24 años (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros descriptivos de la edad del primer coito.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
“Coitarquia” (años)	95	14	24	18,17	1,95

En la Figura 32 se muestra la distribución de la edad del inicio de las relaciones sexuales en nuestra muestra:

## RESULTADOS

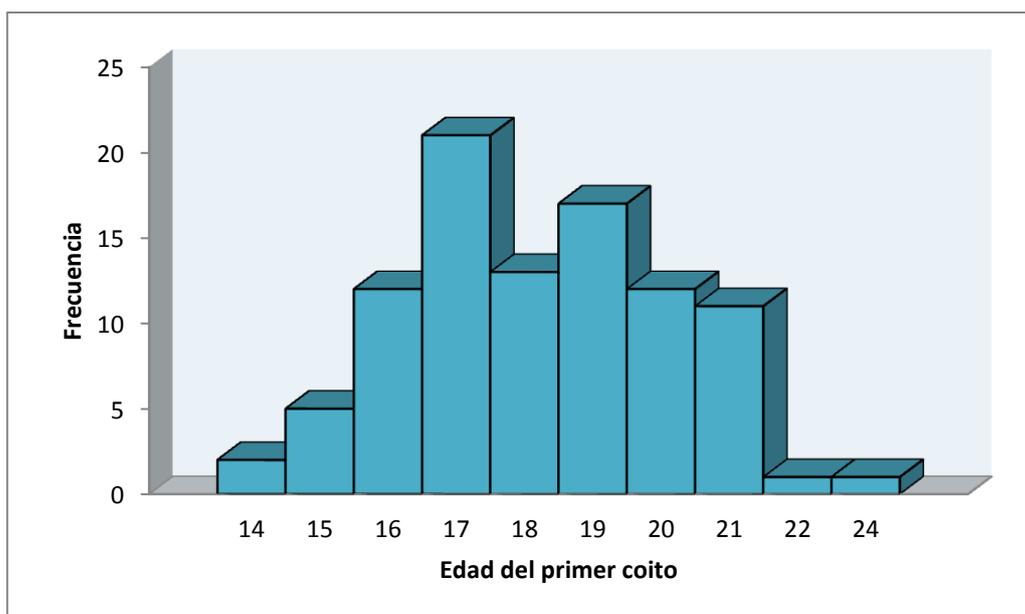


Figura 32. Histograma de la edad de inicio de las relaciones sexuales.

El rango de los 16 a los 20 años de edad de inicio de las relaciones sexuales engloba a los tres cuartos del total de casos estudiados, siendo la edad más frecuente a los 17 años.

### **Lesión histológica y edad de inicio de las relaciones sexuales**

Se ha realizado una tabla de contingencia (Tabla 13) con la edad de la primera relación sexual (en intervalos) y la lesión histológica (bajo y alto grado). Para ello hemos subdividido a las pacientes en varios grupos, según la edad de inicio de las relaciones sexuales:

- $\leq 15$  años.
- De 16 a 20 años.
- De 21 a 29 años.

## RESULTADOS

Tabla 13. Relación entre la edad de la primera relación sexual y lesión cervical.

p=0,167			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
"COITARQUIA" (años)	≤15	Nº casos	0	7	7
		% del total	0,0%	7,4%	7,4%
	16-20	Nº casos	11	64	75
		% del total	11,6%	67,4%	78,9%
	21-29	Nº casos	4	9	13
		% del total	4,2%	9,5%	13,7%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

No hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la edad de la primera relación sexual y el grado de lesión histológica cervical ( $p=0,167$ ). Puede observarse una tendencia, al apreciar que el grupo de mujeres que iniciaron las relaciones sexuales antes de los 15 años de edad cobra mayor peso relativo a medida que aumenta el grado de lesión histológica. En el total de casos de SIL-BG este grupo representa un 0%, y en los casos de SIL-AG un 7,4% (Figura 33).

Observamos que, a medida que aumenta el grado de lesión, encontramos mujeres que comenzaron las relaciones más jóvenes. En el 67,4% de los casos de SIL-AG la edad de inicio de las relaciones sexuales se encontraba entre los 16 y los 20 años.

## RESULTADOS

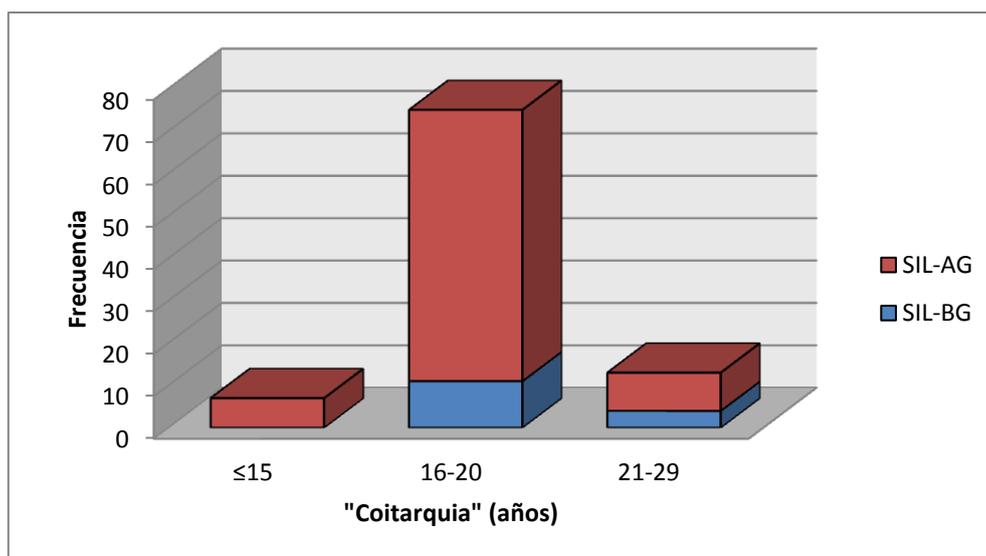


Figura 33. "Coitarquia" (años) y lesión histológica cervical.

### 2.1.2. Número de parejas sexuales

Hemos recogido el número de parejas sexuales que constaba en la historia clínica de las pacientes, en la Tabla 14 se muestran los resultados:

Tabla 14. Parámetros descriptivos del número de parejas sexuales.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Nº parejas sexuales	95	1	7	2,01	1,07

En nuestro estudio la media de parejas sexuales es 2,01 con un rango de 1 a 7 parejas.

En la Figura 34 se muestra el número de parejas sexuales de nuestra muestra. Encontramos que el 40% de las mujeres (n=38) han tenido una sola pareja.

## RESULTADOS

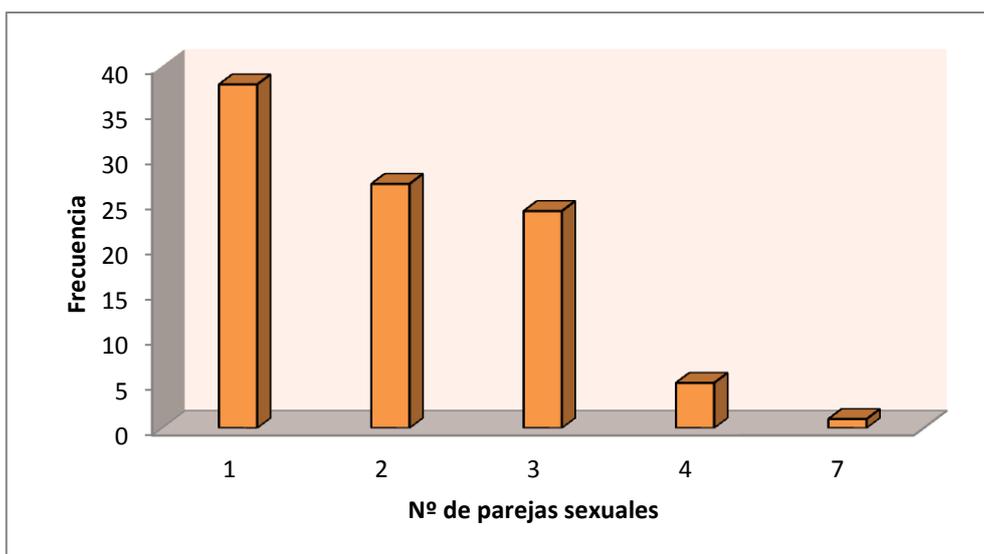


Figura 34. Número de parejas sexuales.

### Lesión histológica y número de parejas sexuales

No se aprecia significación estadística ( $p=0,103$ ) entre la lesión histológica de cérvix y el número de parejas sexuales (Tabla 15).

Tabla 15. Relación entre lesión histológica y número de parejas sexuales.

$p=0,103$			Lesión		Total	
			SIL-BG	SIL-AG		
Nº parejas sexuales	1	Nº casos	8	30	38	
		% del total	8,4%	31,6%	40,0%	
	2	Nº casos	3	2	27	
		% del total	3,2%	25,3%	28,4%	
	3	Nº casos	3	21	24	
		% del total	3,2%	22,1%	25,3%	
	4	Nº casos	0	5	5	
		% del total	0,0%	5,3%	5,3%	
	7	Nº casos	1	0	1	
		% del total	1,1%	0,0%	1,1%	
	Total		Nº casos	15	80	95
			% del total	15,8%	84,2%	100,0%

## 2.2. COFACTORES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL

### 2.2.1. Tabaco

En el momento del diagnóstico 53 de las 95 pacientes eran fumadoras (55,8 %) frente a 34 (35,8%) que no lo eran, y 8 mujeres (8,4%) que pertenecían al grupo de ex-fumadoras ( $\geq 1$  año sin fumar) (Figura 35).

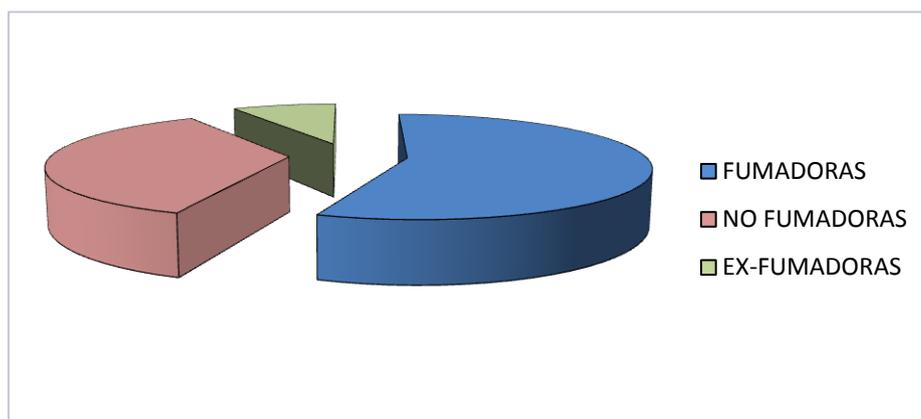


Figura 35. Consumo de tabaco.

### Lesión histológica de cuello uterino y consumo de tabaco

Hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y el grado de lesión histológica ( $p=0,013$ ) (Tabla 16).

Se observa que en los casos con diagnóstico histológico de SIL-AG el porcentaje de mujeres fumadoras se incrementa casi 10 veces con respecto a los casos con diagnóstico de SIL-BG.

En los casos de SIL-AG, puede apreciarse que el porcentaje de mujeres fumadoras representa aproximadamente el doble de las no fumadoras. Mientras que en los casos de SIL-BG los porcentajes de fumadoras, no fumadoras y ex-fumadoras, son muy parecidos (Figura 36).

## RESULTADOS

Tabla 16. Relación entre el grado de lesión cervical y consumo de tabaco.

$p=0,013$			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
<b>FUMADORA</b>	<b>SÍ</b>	Nº casos	5	48	53
		% del total	5,3%	50,5%	55,8%
	<b>NO</b>	Nº casos	6	28	34
		% del total	6,3%	29,5%	35,8%
	<b>EX-FUMADORA</b>	Nº casos	4	4	8
		% del total	4,2%	4,2%	8,4%
<b>Total</b>		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

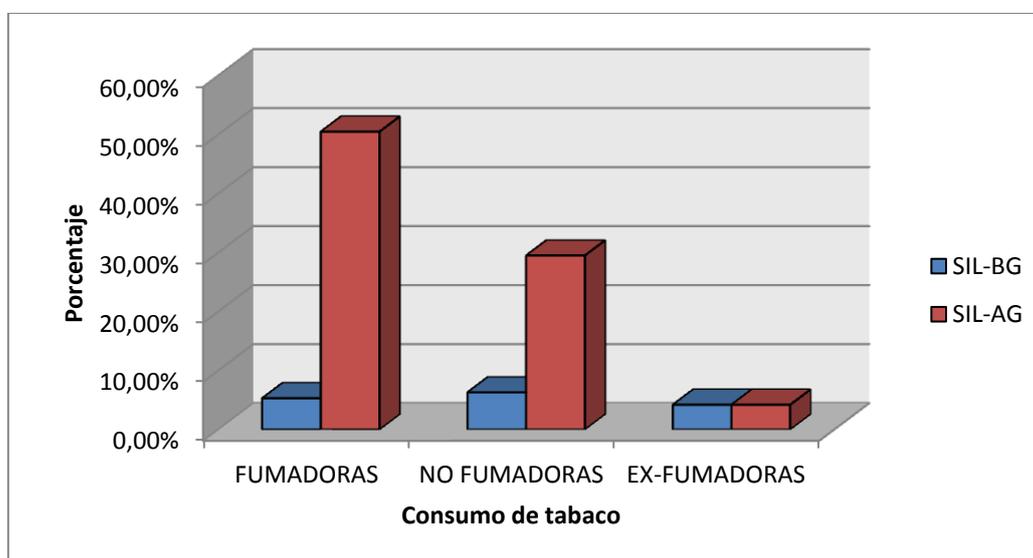


Figura 36. Hábito tabáquico y lesión histológica cervical.

## RESULTADOS

### 2.2.2. Paridad

El número medio de partos por mujer conizada con márgenes afectos fue de 1,64 partos, con un rango entre 0 y 6 partos. En cuanto al número de abortos, previos al diagnóstico, se dieron un total de 35. En relación al total de la muestra obtenemos una media de 0,51 abortos por paciente, cuyo rango abarca de 0 a 4 abortos.

La Tabla 17 y la Figura 37 muestran la distribución del número de partos en las mujeres de nuestra muestra.

Tabla 17. Distribución de frecuencias del número de partos.

		<b>N</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Nº partos</b>	<b>0</b>	25	26,3
	<b>1</b>	18	18,9
	<b>2</b>	21	22,1
	<b>3</b>	13	13,7
	<b>4</b>	4	4,2
	<b>5</b>	4	4,2
	<b>6</b>	1	1,1
	Total	86	90,5
<b>Nº cesáreas</b>	Total	9	9,5
Total		95	100,0

## RESULTADOS

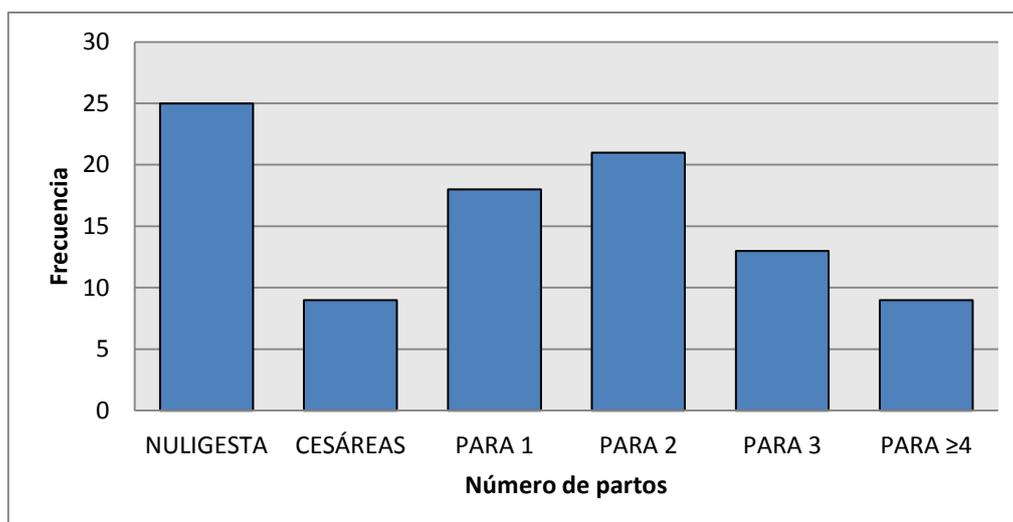


Figura 37. Distribución del número de partos.

### Lesión histológica y paridad

Al estudiar la relación entre el número de partos y la lesión cervical, no encontramos una correlación estadísticamente significativa ( $p=0,562$ ) (Tabla 18).

Tabla 18. Relación entre lesión histológica y número de partos.

$p=0,562$			Lesión		Total	
			SIL-BG	SIL-AG		
Nº partos	0	Nº casos	4	21	25	
		% del total	4,7%	24,4%	29,1%	
	1	Nº casos	2	16	18	
		% del total	2,3%	18,6%	20,9%	
	2	Nº casos	4	17	21	
		% del total	4,7%	19,8%	24,4%	
	3	Nº casos	3	10	13	
		% del total	3,5%	11,6%	15,1%	
	≥4	Nº casos	2	7	9	
		% del total	2,3%	8,2%	10,5%	
	Total		Nº casos	15	71	86
			% del total	17,4%	82,6%	100,0%

### 2.2.3. Anticonceptivos hormonales

En nuestra muestra el 25,3% de las mujeres utilizaban anticonceptivos hormonales desde hace 3 años o más, frente al 13,7% que lo usaban desde hace menos de 3 años, y el 61,1% que no lo habían empleado (Figura 38).

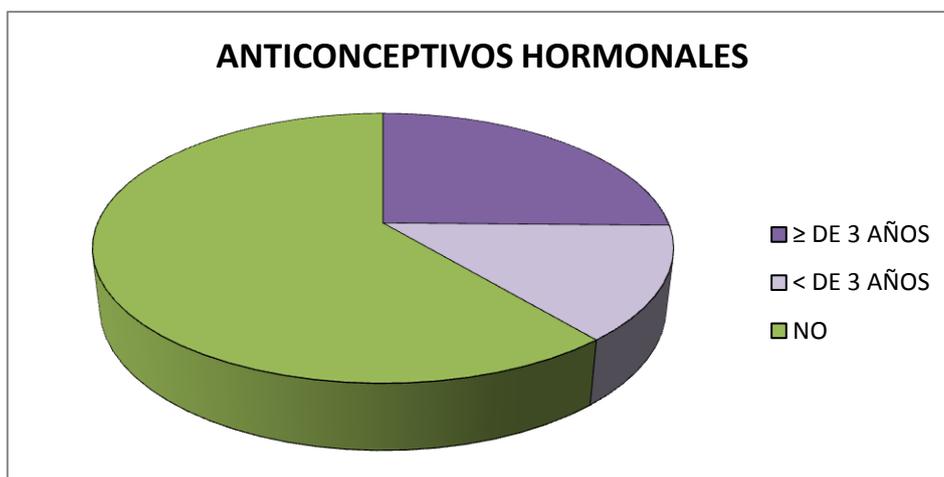


Figura 38. Utilización de anticoncepción hormonal

### Lesión cervical y anticoncepción hormonal

Aunque no existe relación estadísticamente significativa entre el grado de lesión cervical y el uso de anticoncepción hormonal ( $p=0,183$ ) (Tabla 19), la utilización de la misma predominaba en las SIL-AG respecto a las SIL-BG, independientemente del tiempo de uso de dicha anticoncepción hormonal.

## RESULTADOS

Tabla 19. Relación entre el grado de lesión cervical y el uso de anticoncepción hormonal.

p=0,183			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
ACO	≥ 3 años	Nº casos	1	23	24
		% del total	1,1%	24,2%	25,3%
	< 3 años	Nº casos	3	10	13
		% del total	3,2%	10,5%	13,7%
	NO	Nº casos	11	47	58
		% del total	11,6%	49,5%	61,1%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

### 2.2.4. Estado inmunológico

En cuanto al estado inmunológico, en 8 casos (8,5%) presentaban un estado de inmunodepresión, frente al 91,5 % del resto de pacientes de la muestra, que constaban normales. De los 8 casos, 5 mujeres eran portadoras del VIH (5,3%) y una paciente (1,1%) padecía una enfermedad autoinmune en tratamiento con corticoides, de forma crónica mantenida; otras 2 mujeres (2,1%) padecían otros estados de inmunosupresión (Figura 39).

## RESULTADOS

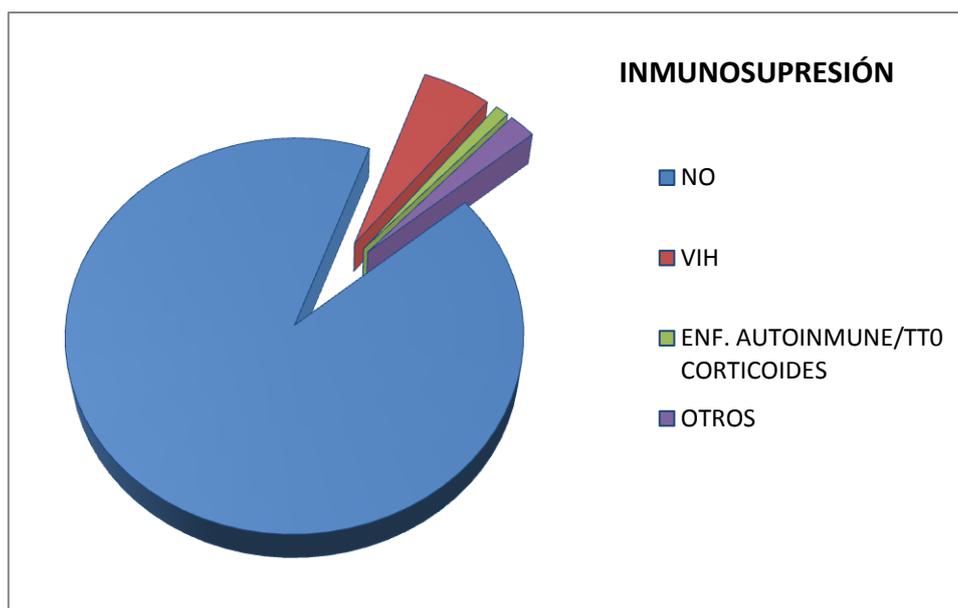


Figura 39. Estado de inmunosupresión.

Solo 7 mujeres (7,4%) estaban vacunadas frente al VPH, y 88 (92,6%) no lo estaban. El tipo de vacuna fue la bivalente en 3 casos (3,2%) y la tetravalente en 4 casos (4,2%) (Figura 40).

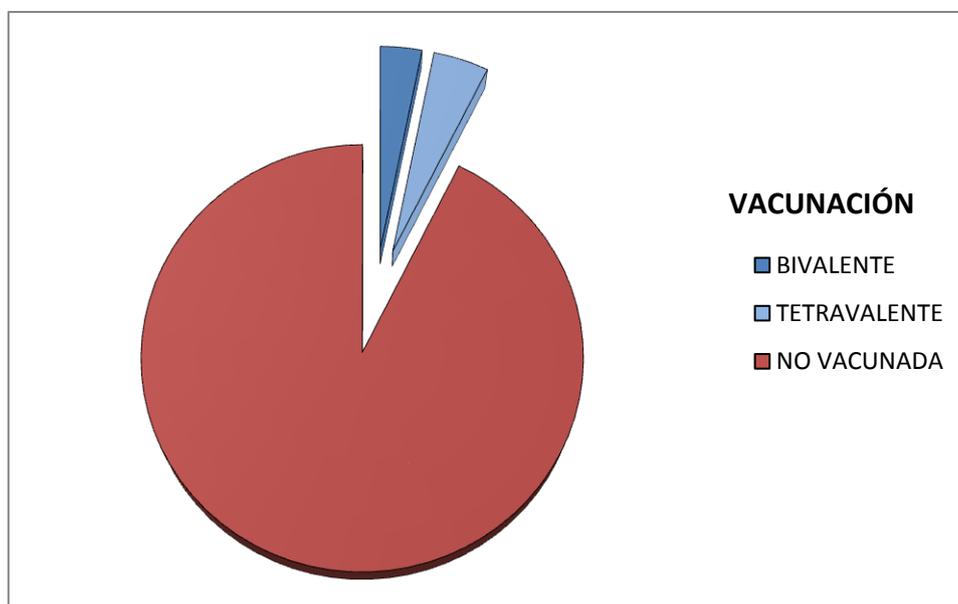


Figura 40. Vacunación frente al VPH.

## RESULTADOS

### Lesión histológica y estado inmunológico

No observamos relación con significación estadística entre el estado de inmunodepresión de las pacientes y el grado de lesión histológica cervical ( $p=0,651$ ) (Tabla 20).

Tabla 20. Relación entre lesión histológica y estado inmunológico.

$p=0,651$			Lesión		Total	
			SIL-BG	SIL-AG		
Inmunodepresión	NO	Nº casos	15	72	87	
		% del total	15,8%	75,8%	91,6%	
	VIH	Nº casos	0	5	5	
		% del total	0,0%	5,3%	5,3%	
	ENF.AUTOINMUNE/ TTO CORTICOIDES	Nº casos	0	1	1	
		% del total	0,0%	1,1%	1,1%	
	OTROS	Nº casos	0	2	2	
		% del total	0,0%	2,1%	2,1%	
	Total		Nº casos	15	80	95
			% del total	15,8%	84,2%	100,0%

### 3. DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA

#### 3.1. Diagnóstico citológico

En 75 casos (78,8%) el resultado del cribado fue H-SIL, en 3 casos (3,2%) fue ASC-H. En 14 de ellos (14,7%) fue L-SIL y 1 caso (1,1%) de ASCUS. Hubo 2 casos (2,2%) de falsos negativos citológicos (Tabla 21).

Tabla 21. Diagnóstico citológico.

		N	Porcentaje (%)
Diagnóstico citológico	H-SIL	75	78,8
	ASC-H	3	3,2
	L-SIL	14	14,7
	ASC-US	1	1,1
	NORMAL	2	2,2
	Total	95	100,0

#### 3.2. Punch biopsia cervical dirigida por colposcopia

Los resultados de la biopsia de cérvix dirigida por colposcopia se muestran en la Tabla 22. En 82 casos (86,3%) el diagnóstico fue SIL-AG y en 2 casos (2,1%) el informe fue SIL-BG.

## RESULTADOS

Tabla 22. Biopsia cervical dirigida por colposcopia.

		N	Porcentaje
<b>BIOPSIA CÉRVIX</b>	<b>NO VALORABLE</b>	10	10,5
	<b>SIL-BG</b>	2	2,1
	<b>SIL-AG</b>	82	86,3
	<b>NEGATIVA</b>	1	1,1
	Total	95	100,0

### Lesión histológica y biopsia de cérvix

De los 82 casos diagnosticados por punch biopsia cervical de SIL-AG, 69 casos (72,6%) coincidieron con el diagnóstico de SIL-AG en el estudio anatomopatológico del cono, y 13 casos (13,7%) fueron SIL-BG (Figura 41).

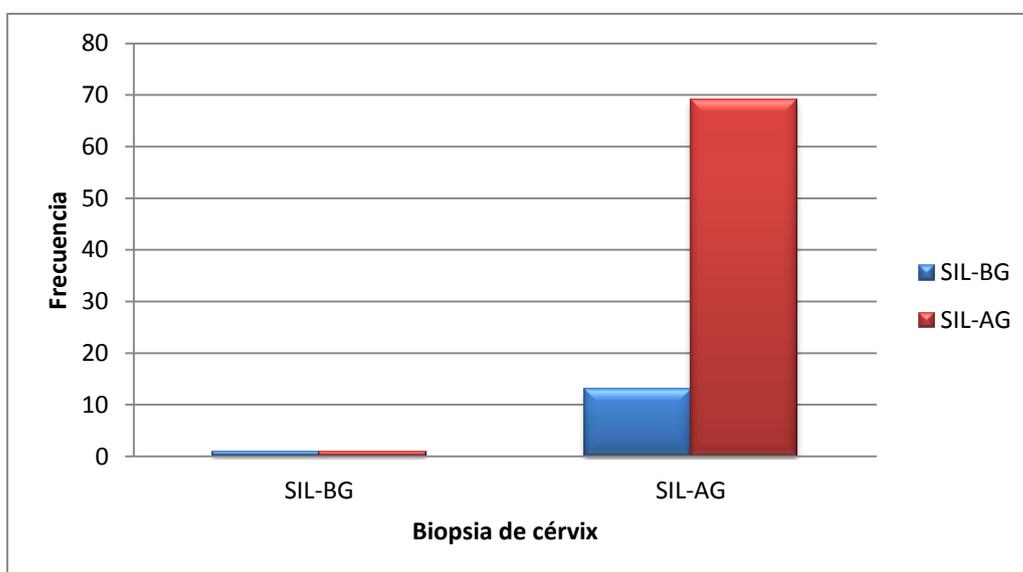


Figura 41. Lesión histológica y biopsia de cérvix.

### 3.3. Diagnóstico molecular del VPH

#### A. Infección por VPH

El diagnóstico molecular del VPH preconización se practicó en 81 (85,3%) de las 95 mujeres, y no se realizó en 14 casos (14,7%).

Los resultados del mismo fueron: 61 casos (75,3%) de VPH-AR, 13 (16,1%) de VPH-AR y BR, y negativo en 7 casos (8,6%) (Tabla 23).

Tabla 23. Descriptores de infección por VPH (resultados del estudio molecular).

		N	Porcentaje (%)
<b>RIESGO INFECCIÓN VPH</b>	<b>ALTO RIESGO</b>	61	75,3
	<b>ALTO+BAJO RIESGO</b>	13	16,1
	<b>NEGATIVO</b>	7	8,6
	Total	81	100,0

Con respecto al tipo de infección, en 46 casos (56,8%) se detecta infección simple por VPH, y en los 35 casos restantes (43,2%) se identifica infección por varios VPHs (Tabla 24).

Tabla 24. Descriptores del tipo de infección VPH.

		N	Porcentaje (%)
<b>TIPO INFECCIÓN VPH</b>	<b>MÚLTIPLE</b>	35	43,2
	<b>SIMPLE</b>	46	56,8
	Total	81	100,0

## RESULTADOS

### Lesión histológica e infección VPH

Al estudiar ambas variables, con significación estadística ( $p=0,000$ ), podemos observar que a medida que aumenta el grado de lesión histológica, aumenta el número de casos positivos del estudio molecular del VPH-AR. Los resultados se detallan en la Tabla 25 y Figura 42.

Tabla 25. Relación entre el grado de lesión histológica y el resultado del riesgo del estudio molecular del VPH.

$p=0,000$			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
<b>RIESGO INFECCIÓN VPH</b>	<b>ALTO RIESGO</b>	Nº casos	8	53	61
		% del total	9,9%	65,4%	75,3%
	<b>ALTO+BAJO RIESGO</b>	Nº casos	1	12	13
		% del total	1,3%	14,8%	16,1%
	<b>NEGATIVO</b>	Nº casos	5	2	7
		% del total	6,2%	2,4%	8,6%
<b>Total</b>		Nº casos	14	67	81
		% del total	17,4%	82,6%	100,0%

## RESULTADOS

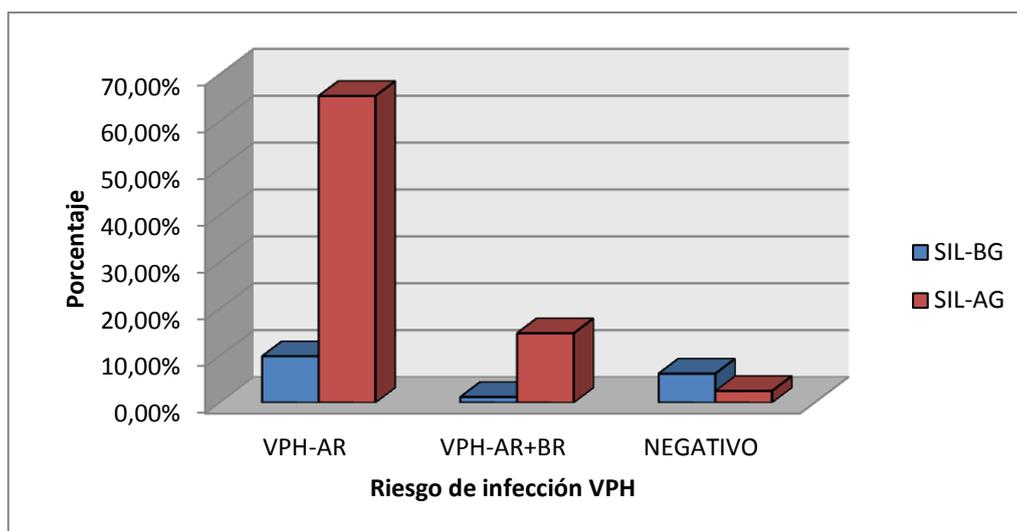


Figura 42. Lesión histológica y resultados del diagnóstico molecular del VPH.

### B. Genotipo del VPH

En el genotipado del VPH hemos seguido la clasificación de Muñoz<sup>30</sup> (Tabla 1) del año 2003:

- **VPH de alto riesgo**: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82 y 73.
- **VPH de probable alto riesgo**: 26, 53 y 66
- **VPH de bajo riesgo**: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108.
- **VPH de riesgo indeterminado**: 34, 57 y 83.

En la Tabla 26 y Figura 43 hemos recogido los genotipos del VPH hallados en el examen preconización.

El VPH-AR que se encuentra con mayor frecuencia es el VPH 16, en 42 casos (44,2%), seguido del VPH 31 en 12 casos (12,6%), y el VPH 58 en 9 casos (9,5%). En el 6,3% de los casos se detectó infección por VPH 18. No hubo ninguna paciente con el diagnóstico de VPH 26 previo a la conización.

## RESULTADOS

Tabla 26. Genotipos del VPH preconización (frecuencia absoluta y relativa).

VPH	N	Porcentaje (%)
<b>Negativo</b>	7	7,4
<b>16</b>	42	44,2
<b>31</b>	12	12,6
<b>58</b>	9	9,5
<b>45</b>	8	8,4
<b>18</b>	6	6,3
<b>Indeterminados (34,57,83)</b>	6	6,3
<b>33,39 51, 52, 53*, 66*</b>	5	5,3
<b>35, 73</b>	4	4,2
<b>56</b>	3	3,2
<b>59, 82</b>	2	2,1
<b>68</b>	1	1,1
<b>26*</b>	0	0,0

\*Probable Alto Riesgo.

## RESULTADOS

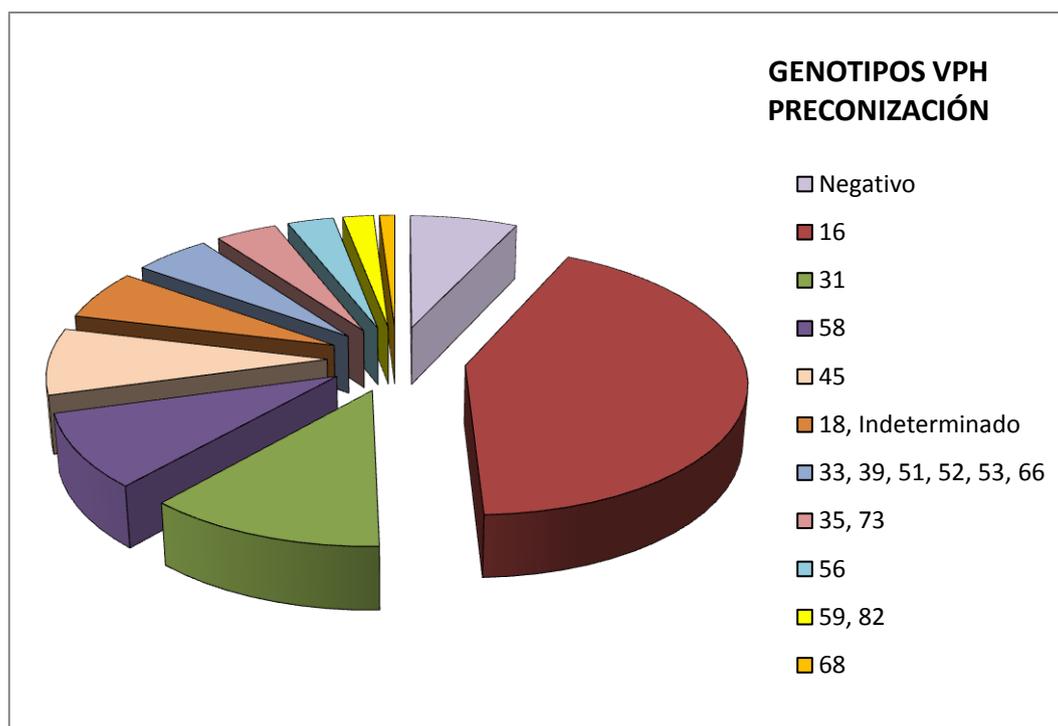


Figura 43. Genotipos del VPH preconización.

Los 35 casos (43,2%) de infecciones multigenómicas se distribuyen de la siguiente forma (Figura 44):

- VPH 16 y otros VPH-AR: 16 casos (45,7%).
- Varios VPH-AR: 10 casos (28,5%).
- VPH 16 y 18: 2 casos (5,7%).
- VPH 16 y VPH-BR: 2 casos (5,7%).
- VPH 16, otros VPH-AR y VPH-BR: 1 caso (2,9%).
- Otros VPH-AR y VPH-BR: 2 casos (5,7%).
- VPH 18 y otros VPH-AR: 1 caso (2,9%).
- VPH 18 y VPH-BR: 1 caso (2,9%).

## RESULTADOS

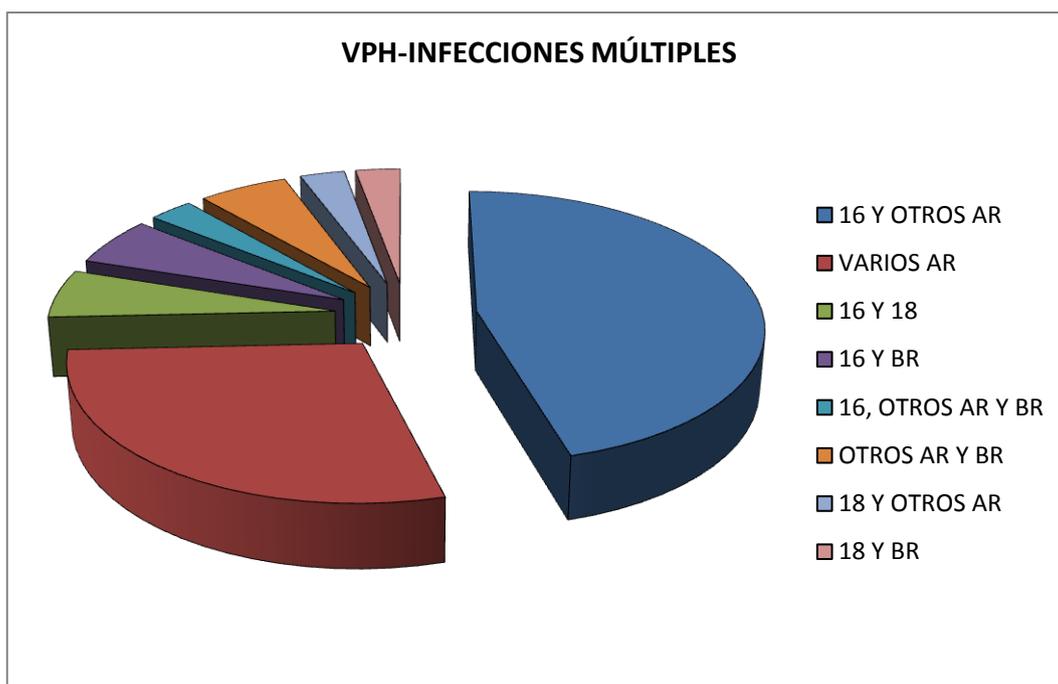


Figura 44. VPH en infecciones multigenómicas.

### Lesión histológica y genotipo del VPH

Hemos analizado el grado de lesión histológica cervical y el genotipo del VPH (Tabla 27).

Tabla 27. Lesión histológica cervical y genotipo del VPH.

		Lesión		Total
		SIL-BG	SIL-AG	
<b>VPH 16</b>	Nº casos	2	40	42
	% del total	2,1%	42,1%	44,2%
<b>VPH 31</b>	Nº casos	2	10	12
	% del total	2,1%	10,5%	12,6%
<b>VPH 58</b>	Nº casos	0	9	9
	% del total	0,0%	9,5%	9,5%
<b>VPH 45</b>	Nº casos	3	5	8
	% del total	3,2%	5,3%	8,4%
<b>VPH 18</b>	Nº casos	1	5	6
	% del total	1,1%	5,3%	6,3%
<b>VPH indeterminado</b>	Nº casos	1	5	6
	% del total	1,1%	5,3%	6,3%

## RESULTADOS

<b>VPH 33</b>	Nº casos	0	5	5
	% del total	0,0%	5,3%	5,3%
<b>VPH 39</b>	Nº casos	1	4	5
	% del total	1,1%	4,2%	5,3%
<b>VPH 51</b>	Nº casos	0	5	5
	% del total	0,0%	5,3%	5,3%
<b>VPH 52</b>	Nº casos	1	4	5
	% del total	1,1%	4,2%	5,3%
<b>VPH 53*</b>	Nº casos	1	4	5
	% del total	1,1%	4,2%	5,3%
<b>VPH 66*</b>	Nº casos	2	3	5
	% del total	2,1%	3,2%	5,3%
<b>VPH 35</b>	Nº casos	1	3	4
	% del total	1,1%	3,2%	4,2%
<b>VPH 73</b>	Nº casos	0	4	4
	% del total	0,0%	4,2%	4,2%
<b>VPH 56</b>	Nº casos	1	2	3
	% del total	1,1%	2,1%	3,2%
<b>VPH 59</b>	Nº casos	0	2	2
	% del total	0,0%	2,1%	2,1%
<b>VPH 82</b>	Recuento	1	1	2
	% del total	1,1%	1,1%	2,1%
<b>VPH 68</b>	Nº casos	0	1	1
	% del total	0,0%	1,1%	1,1%
<b>VPH 26*</b>	Nº casos	0	0	0
	% del total	0,0%	0,0%	0,0%

\*Probable Alto Riesgo.

El VPH 16 se identificó en 40 casos (42,1%) de SIL-AG, analizando desde un punto de vista exclusivamente descriptivo, y en 2 casos (2,1%) de SIL-BG. No se detectó infección por VPH 58, 33, 51, 73, 59, 68 y 26 en ningún caso de SIL-BG. El VPH 26 tampoco se halló en las SIL-AG.

### 3.4. Diagnóstico colposcópico

#### A. Colposcopia diagnóstica

La colposcopia se realizó en 91 casos (95,8%) y no constaba en la historia clínica en 4 casos (4,2%).

El examen colposcópico resultó patológico o positivo en 77 casos (84,6%), normal o negativo en 11 casos (12,1%), e inadecuado o unión escamocolumnar no visible en 3 casos (3,3%) (Tabla 28).

Tabla 28. Resultados del examen colposcópico.

		N	Porcentaje (%)
Colposcopia	Positiva	77	84,6
	Negativa/Normal	11	12,1
	Inadecuada/UEC no visible	3	3,3
	Total	91	100,0

Siguiendo la Clasificación de Río de Janeiro de 2011, en 40 casos (44%) los hallazgos colposcópicos eran de Grado 1 o cambios menores, y en 31 casos (34,1%) eran de Grado 2 o cambios mayores. En 6 casos (6,6%) el informe fue sugestivo de cáncer invasor (Figura 45).

## RESULTADOS

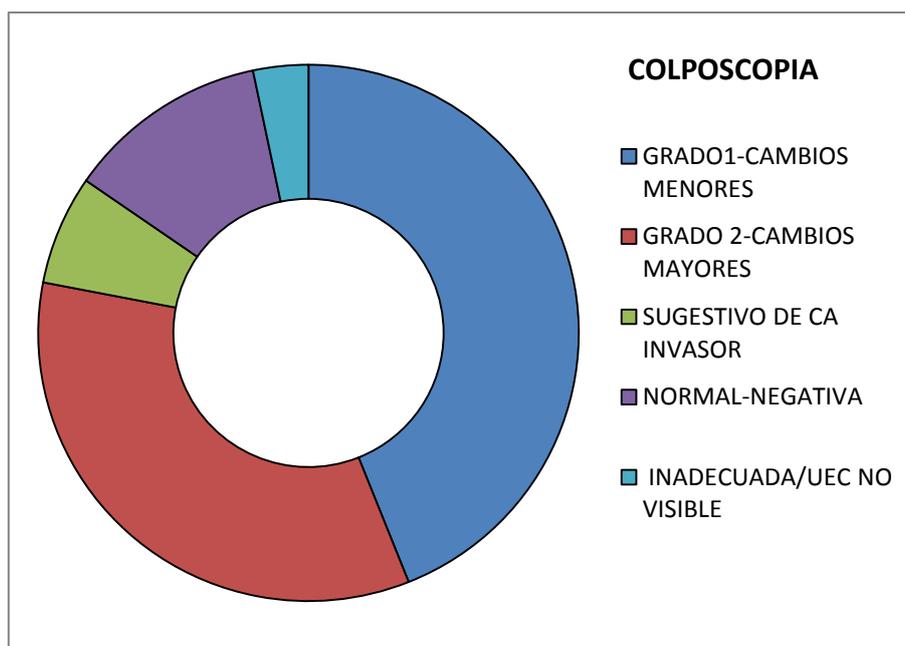


Figura 45. Distribución de los hallazgos colposcópicos.

### Lesión histológica y hallazgos colposcópicos

La relación entre el grado de lesión histológica cervical y los hallazgos colposcópicos se muestra en la Figura 46 y Tabla 29.

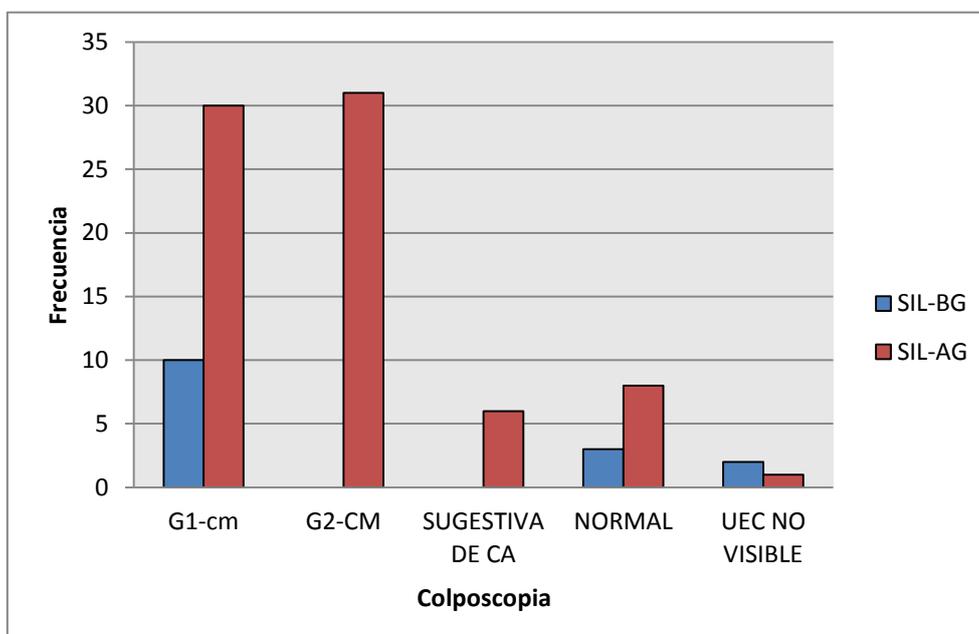


Figura 46. Lesión histológica cervical y colposcopia.

## RESULTADOS

Tabla 29. Relación entre el grado de lesión histológica y los hallazgos colposcópicos.

NS		Lesión		Total		
		SIL-BG	SIL-AG			
Hallazgos colposcópicos	G1-Cambios menores	Nº casos	10	30	40	
		% del total	11%	33%	44%	
	G2-Cambios mayores	Nº casos	0	31	31	
		% del total	0,0%	34,1%	34,1%	
	Sugestivo de Ca invasor	Nº casos	0	6	6	
		% del total	0,0%	6,6%	6,6%	
	Negativa/Normal	Nº casos	3	8	11	
		% del total	3,3%	8,8%	12,1%	
	Inadecuada/UEC no visible	Nº casos	2	1	3	
		% del total	2,2%	1,1%	3,3%	
	Total		Nº casos	15	76	91
			% del total	16,5%	83,5%	100,0%

En las SIL-AG se observaron un 34,1% de hallazgos Grado 2 o cambios mayores, y un 6,6% de imágenes sugestivas de cáncer invasor. Estos resultados no se aprecian en las SIL-BG.

## B. Localización de las lesiones colposcópicas

Si nuestra referencia son las agujas de un reloj, del total de las 77 colposcopias patológicas (84,6%), la mayoría de las lesiones se localizaban a las 12 h. y a las 6 h., con 29 casos (30,5%) y 22 casos (23,2%), respectivamente. Le siguen las 9 h. con 8 casos (8,4%), las 3 h. con 7 casos (7,4%), y las 11 h. con 3 casos (3,1%). En orden decreciente están las 2, 7 y 10 horarias con 2 casos (2,1%) cada una. En último lugar, las 5 h. y 8 h. con 1 caso (1,1%). No se registró ningún caso de lesión a las 1 y 4 h (Figura 47).

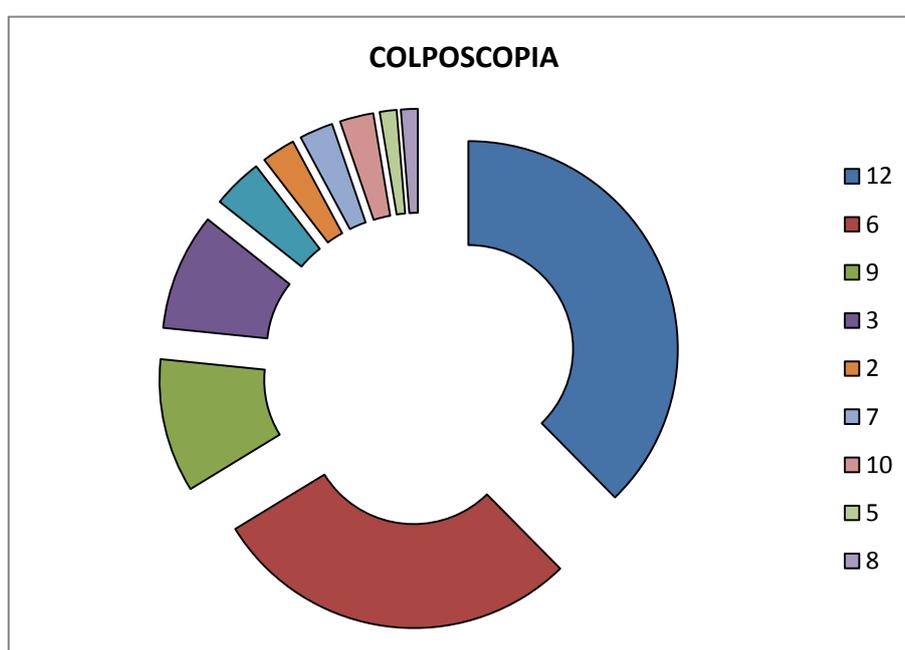


Figura 47. Localización horaria de las lesiones colposcópicas.

Esta localización horaria recogida por cuadrantes resultó con la siguiente distribución: en el cuadrante anterior se localizaron 32 casos (33,6%), en el cuadrante posterior 25 casos (26,4%), en el derecho 11 casos (11,6%), y en el izquierdo 9 casos (9,5%) (Figura 48). En 18 casos (18,9%) no constaba dicha localización.

## RESULTADOS

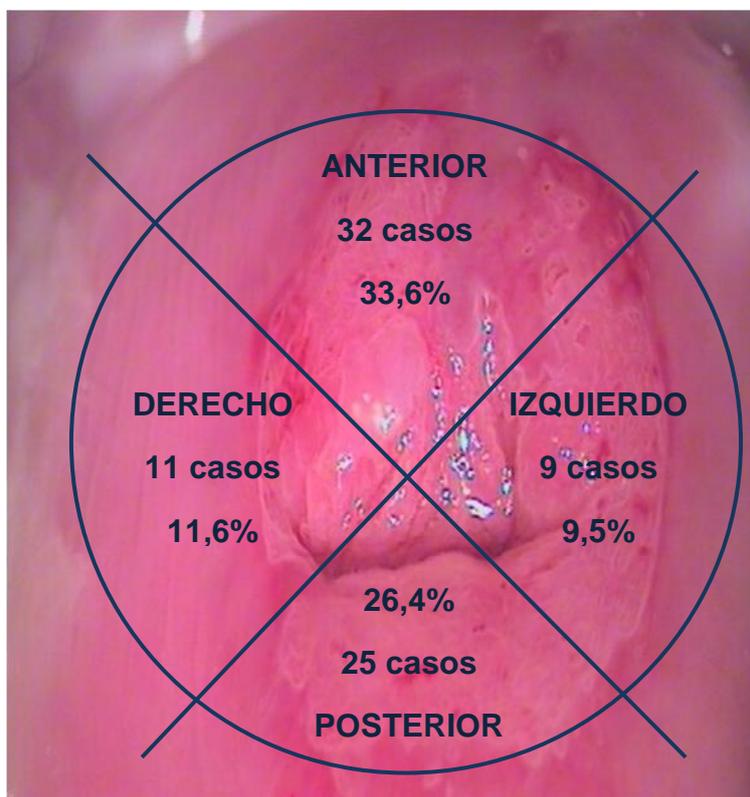


Figura 48. Localización por cuadrantes de las lesiones colposcópicas.

### C. Tamaño de la lesión colposcópica

La lesión colposcópica ocupaba un cuadrante en 46 casos (59,7%), 2 cuadrantes en 23 casos (29,9%) y 4 cuadrantes en 8 casos (10,4%). En 18 casos no se pudo conocer la extensión de la lesión (Tabla 30).

Tabla 30. Tamaño de la lesión colposcópica.

		N	Porcentaje (%)
Tamaño de la lesión colposcópica	1 cuadrante	46	59,7
	2 cuadrantes	23	29,9
	4 cuadrantes	8	10,4
Total		77	100,0

### D. Afectación colposcópica del canal endocervical

Se observó que la lesión colposcópica penetraba por el orificio cervical externo en 32 casos (33,7%) frente a 59 casos (62,1%) que no se introducía por el canal endocervical. En 4 casos (4,2%) no constaba la colposcopia en la historia clínica (Figura 49).

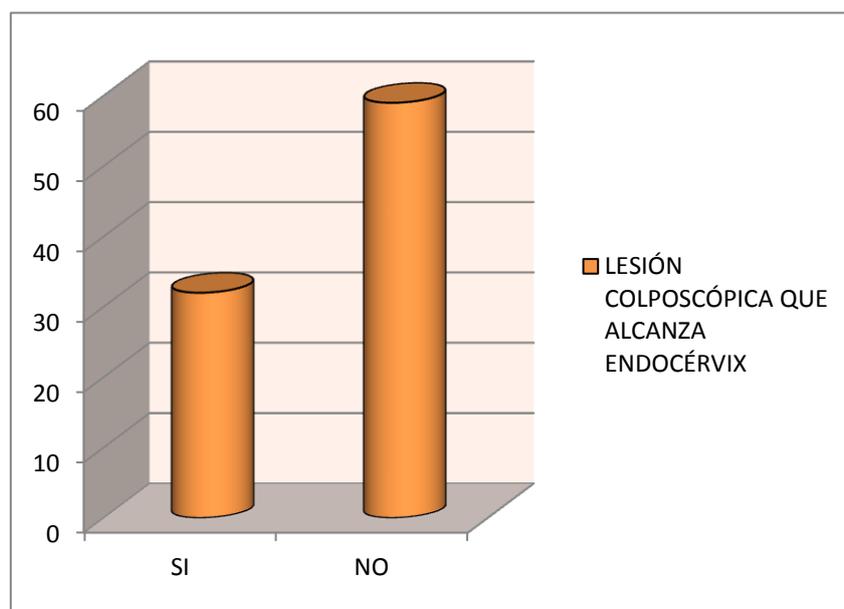


Figura 49. Lesión que alcanza endocérviK colposcópicamente.

## RESULTADOS

### Lesión histológica y lesión colposcópica que alcanza endocérvi

Existe una relación estadísticamente significativa entre la lesión colposcópica que alcanza endocérvi y la gravedad histológica de dicha lesión ( $p=0,011$ ) (Tabla 31). La lesión alcanza el canal endocervical en el 34,1% de los casos de SIL-AG, frente al 1,1% de SIL-BG (Figura 50).

Tabla 31. Relación entre lesión colposcópica que alcanza endocérvi y grado de lesión histológica.

$p=0,011$			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
Lesión colposcópica que alcanza el canal endocervical	SÍ	Nº casos	1	31	32
		% del total	1,1%	34,1%	35,2%
	NO	Nº casos	14	45	59
		% del total	15,4%	49,5%	64,8%
Total		Nº casos	15	76	91
		% del total	16,5%	83,5%	100,0%

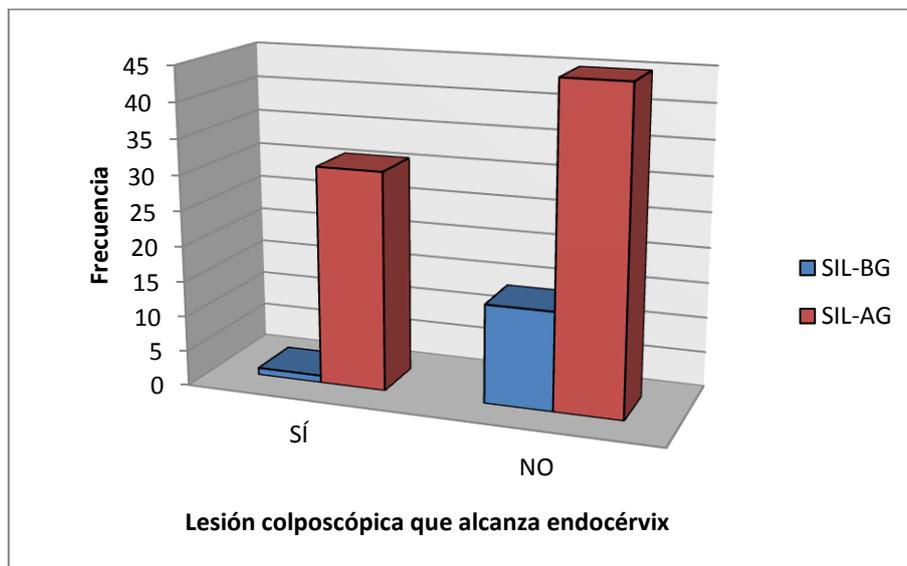


Figura 50. Lesión colposcópica que alcanza OCE y lesión histológica.

### 3.5. Diagnóstico anatomopatológico del cono

#### A. Margen quirúrgico

Nuestra muestra está formada por los 95 casos (100%) de conizaciones con afectación de los márgenes quirúrgicos.

La localización topográfica de dicha afectación fue el borde endocervical en 55 casos (57,9%), el exocervical en 23 casos (24,2%) y ambos bordes (endo y exocérvix) en 17 casos (17,9%) (Figura 51).



Figura 51. Localización de la afectación de los bordes quirúrgicos.

#### Lesión histológica y localización de la afectación de los márgenes quirúrgicos

La Tabla 32 muestra la significación estadística ( $p=0,001$ ) entre el grado de lesión histológica y la localización del margen quirúrgico afectado. En las SIL-AG el borde endocervical está afectado en el 54,7% de los casos, y el exocervical en un 14,7%, frente al 3,2% y 9,5%, respectivamente, en las SIL-BG (Figura 52).

## RESULTADOS

Tabla 32. Relación entre la lesión histológica y la localización de la afectación de los márgenes quirúrgicos.

p=0,001			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
Localización de la afectación del borde	Exocervical	Nº casos	9	14	23
		% del total	9,5%	14,7%	24,2%
	Endocervical	Nª casos	3	52	55
		% del total	3,2%	54,7%	57,9%
	Ambos	Nº casos	3	14	17
		% del total	3,2%	14,7%	17,9%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

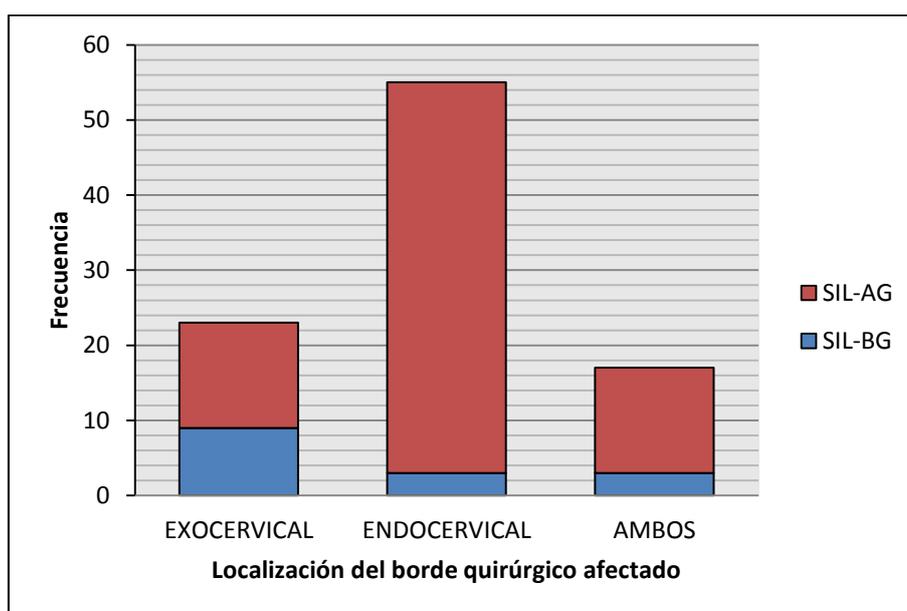


Figura 52. Grado de lesión histológica y localización del margen quirúrgico afectado.

## RESULTADOS

### B. Estirpe histológica

La estirpe histológica de la conización fue una lesión escamosa en 89 casos (93,7%), glandular en 4 casos (4,2%) y mixta (escamosa y glandular) en 2 casos (2,1%).

### C. Afectación glandular

La afectación glandular, en el informe histológico de las piezas de conización, ocurrió en 38 casos (40%), y no estaba presente dicha afectación en 57 casos (60%).

### Lesión histológica y afectación glandular

Observamos una relación estadísticamente significativa ( $p=0,022$ ) entre el grado de lesión histológica cervical y la afectación glandular (Tabla 33). Hay mayor afectación glandular en las SIL-AG (36 casos, 37,9%) que en las SIL-BG (2 casos, 2,1%) (Figura 53).

Tabla 33. Relación entre el grado de lesión histológica cervical y afectación glandular.

$p=0,022$			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
Afectación glandular	SÍ	Nº casos	2	36	38
		% del total	2,1%	37,9%	40,0%
	NO	Nº casos	13	44	57
		% del total	13,7%	46,3%	60,0%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

## RESULTADOS

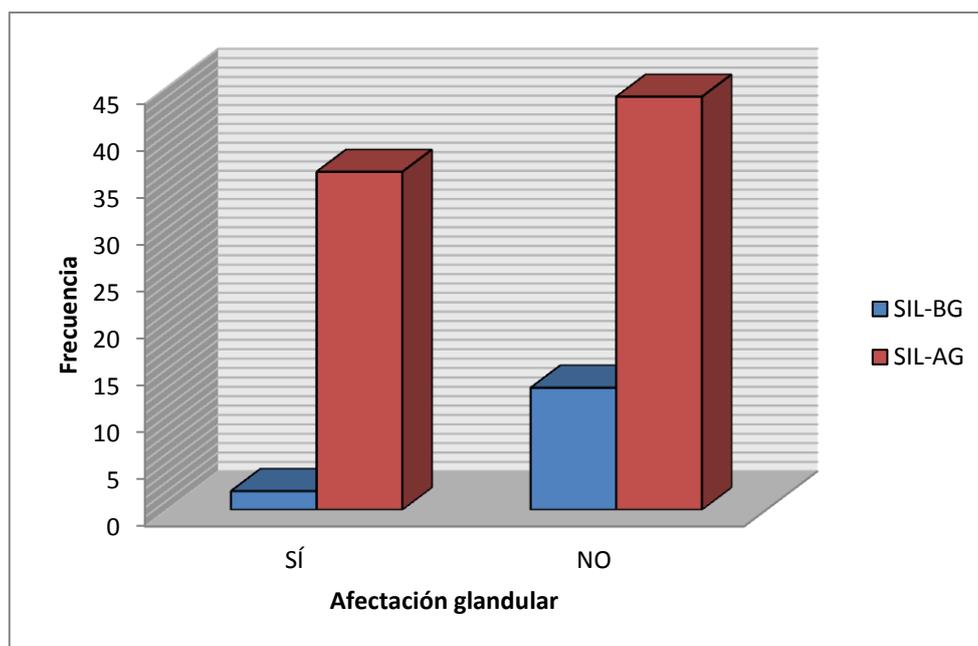


Figura 53. Lesión histológica y afectación glandular.

### D. Legrado endocervical

El legrado de endocérnix realizado postconización fue positivo para lesión escamosa intraepitelial en 19 casos (20%), y negativo en 76 casos (80%).

### Lesión histológica y legrado endocervical

La relación entre ambas variables no resultó estadísticamente significativa ( $p=0,159$ ) (Tabla 34).

El resultado positivo ocurrió en 18 casos (18.9%) de SIL-AG y en 1 caso (1,1%) de SIL-BG. El informe del legrado endocervical fue negativo (normal) en 62 casos (65,3%) de SIL-AG y en 14 casos (14,7%) de SIL-BG (Figura 54).

## RESULTADOS

Tabla 34. Relación entre el grado de lesión histológica y legrado endocervical postconización.

p=0,159			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
Legrado endocervical postconización	Positivo	Nº casos	1	18	19
		% del total	1,1%	18,9%	20,0%
	Negativo	Nº casos	14	62	76
		% del total	14,7%	65,3%	80,0%
Total		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

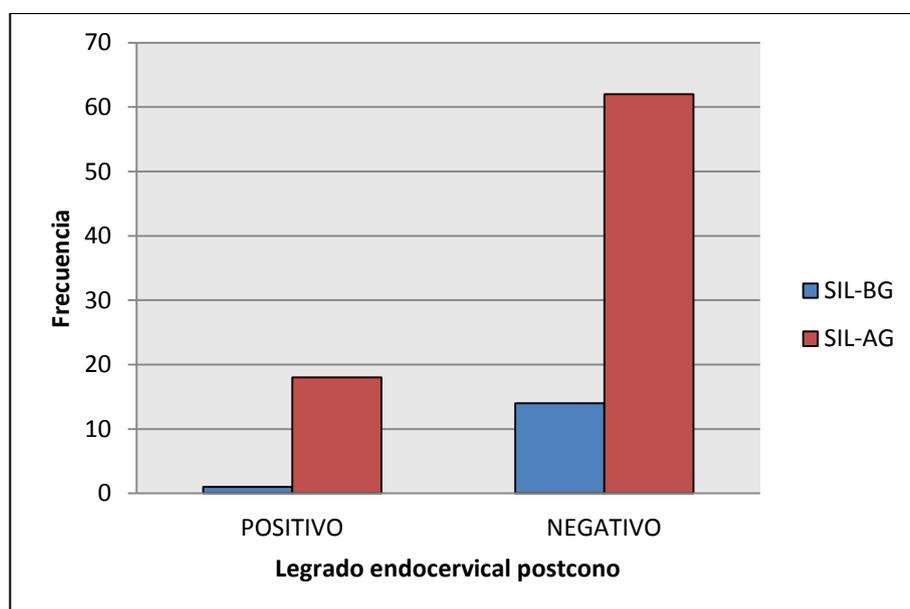


Figura 54. Lesión histológica y legrado endocervical postconización.

### E. Cirujano responsable de la conización

En 21 ocasiones (22,1%) la conización fue realizada por un MIR de la UGC, en 11 casos (11,6%) por un FEA de menos de 10 años de antigüedad en la UGC y, por último, 63 conizaciones (66,6%) fueron efectuadas por un FEA con más de 10 años de antigüedad en dicha Unidad (Figura 55).

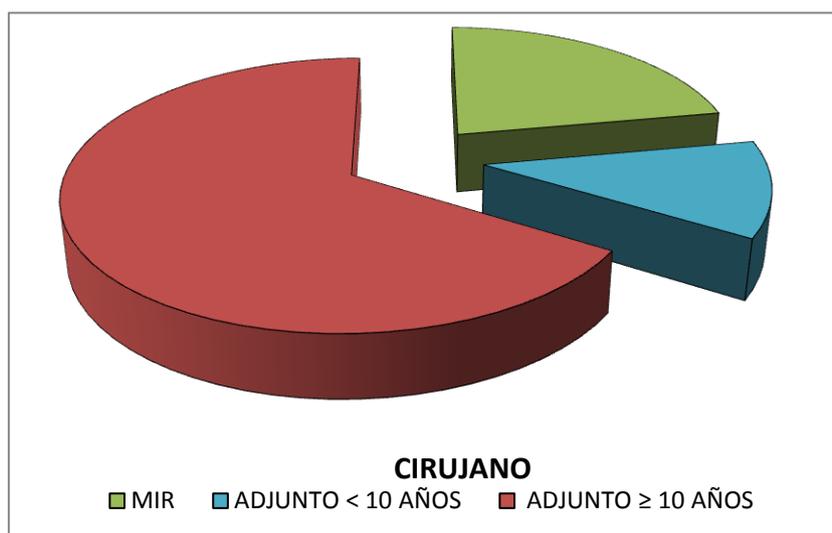


Figura 55. Cirujano responsable de la conización.

#### 4. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE SEGUIMIENTO Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA

##### 4.1. Tratamiento de la afectación de márgenes quirúrgicos

###### A. Ampliación del tratamiento quirúrgico

En 52 casos (54,7%) de conizaciones con márgenes afectados hubo que ampliar el tratamiento quirúrgico y en 43 casos (45,3%) no hubo necesidad de ampliación.

Analizando los 52 casos de necesidad de tratamiento quirúrgico complementario observamos que en 14 casos (14,7%) se efectuó una reconización, en 24 casos (25,3%) se realizó una histerectomía total simple, y en 14 casos (14,7%) se practicó una histerectomía ampliada (Figura 56).

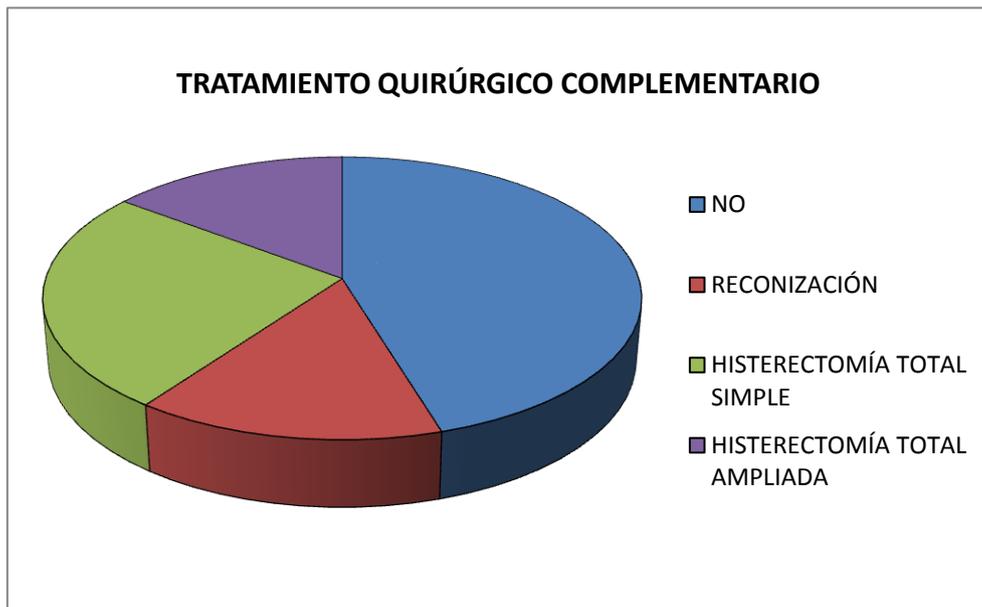


Figura 56. Ampliación del tratamiento quirúrgico.

###### B. Histología de la ampliación del tratamiento quirúrgico

La estirpe histológica del tratamiento complementario resultó una lesión escamosa en 34 casos (35,8%), glandular en 2 casos (2,1%), mixta (escamosa y glandular) en 1 caso (1,1%), y negativa en 15 casos (15,8%).

## 4.2. Persistencia de la infección por VPH postratamiento

### A. Infección por VPH postconización

A los 6 meses del tratamiento quirúrgico, se les realizó el estudio molecular del VPH a 54 mujeres (56,8%), y no constaba dicho test en 41 casos (43,2%).

Los resultados de diagnóstico molecular del VPH postratamiento fueron: 14 casos (26%) de VPH-AR, 5 casos (9,2%) de VPH-BR, 6 casos (11,1%) de VPH-AR y BR, y negativo en 29 casos (53,7%) (Tabla 35).

Tabla 35. Descriptores de infección por VPH postconización.

		N	Porcentaje (%)
<b>PERSISTENCIA INFECCIÓN VPH POSTCONO</b>	<b>ALTO RIESGO</b>	14	26
	<b>BAJO RIESGO</b>	5	9,2
	<b>ALTO+BAJO RIESGO</b>	6	11,1
	<b>NEGATIVO</b>	29	53,7
	Total	54	100,0

La persistencia vírica global del VPH (AR+BR) tras la conización, con márgenes afectos, fue de 25 casos (46,3%). La multiinfección se dio en 13 casos (13,7%). El tiempo de persistencia del VPH fue de 6 meses en 7 casos (28%), 12 meses en 10 casos (40%), y 24 meses en 8 casos (32%).

## RESULTADOS

### Lesión histológica e infección por VPH postconización

El diagnóstico molecular del VPH, realizado a los 6 meses de la conización, muestra una relación estadísticamente significativa con el grado de lesión histológica ( $p=0,048$ ). En la historia clínica constaba este test en 42 casos (44,2%) de SIL-AG y en 12 casos (12,6%) de SIL-BG (Tabla 36).

Tabla 36. Relación entre el grado de lesión histológica y el estudio molecular del VPH postconización.

$p=0,048$			Lesión		Total
			SIL-BG	SIL-AG	
<b>ESTUDIO MOLECULAR DEL VPH POSTCONIZACIÓN</b>	<b>SÍ</b>	Nº casos	12	42	54
		% del total	12,6%	44,2%	56,8%
	<b>NO</b>	Nº casos	3	38	41
		% del total	3,2%	40,0%	43,2%
<b>Total</b>		Nº casos	15	80	95
		% del total	15,8%	84,2%	100,0%

De los 54 casos (56,8%) en los que se realizó el VPH postconización, su resultado fue negativo en 29 casos (53,7%), correspondientes a 25 casos (46,3%) de SIL-AG y 4 casos (7,4%) de SIL-BG.

En 25 casos (46,3%) el estudio molecular del VPH postcono fue positivo. La relación del total de persistencia vírica postcono con el grado de lesión histológica cervical se muestra en la Tabla 37.

## RESULTADOS

Tabla 37. Relación entre la persistencia del VPH postcono y grado de lesión histológica de cérvix.

NS			Lesión		Total	
			SIL-BG	SIL-AG		
PERSISTENCIA INFECCIÓN VPH POSTCONO	ALTO RIESGO	Nº casos	5	9	14	
		% del total	20,0%	36,0%	56,0%	
	BAJO RIESGO	Nº casos	1	4	5	
		% del total	4,0%	16,0%	20,0%	
	ALTO+BAJO RIESGO	Nº casos	2	4	6	
		% del total	8,0%	16,0%	24,0%	
	Total		Nº casos	8	17	25
			% del total	32,0%	68,0%	100,0%

La **persistencia del VPH-AR** estaba presente en 20 casos (80%) de los conos afectados, y de éstos en 14 casos (56%) como infección simple y en 6 casos (24%) se asociaba a VPH-BR. El VPH-AR, realizado a los 6 meses de la conización, con márgenes afectados, persistió en **13 casos (52%) de SIL-AG**, en 9 casos (36%) de forma simple, frente a 4 casos (16%) en los que aparecía junto a VPH-BR, aunque dicha relación no fue estadísticamente significativa.

### B. Genotipo del VPH postconización

El genotipo que más persistía a los 6 meses tras la conización fue el VPH 16, en 6 casos (6,3%), seguido del VPH 18 y el VPH de riesgo indeterminado, en 4 casos (4,2%). A continuación los VPH 45, 51 y 68 en 3 casos (3,2%), y los VPH 31, 51 y 66 en 2 casos (2,1%). Por último, los VPH 26 y 53 con 1 caso (1,1%) cada uno. También se detectaron 11 casos (11,6%) de persistencia de VPH-BR (Tabla 38 y Figura 57).

## RESULTADOS

Tabla 38. Genotipos del VPH postconización (frecuencia absoluta y relativa).

VPH	N	Porcentaje (%)
16	6	6,3
18	4	4,2
Indeterminado	4	4,2
45, 51, 68	3	3,2
31, 56, 66*	2	2,1
26*, 53*	1	1,1
Bajo Riesgo	11	11,6
33, 35, 39, 52, 58, 59, 82,73	0	0,0

\*Probable Alto Riesgo.

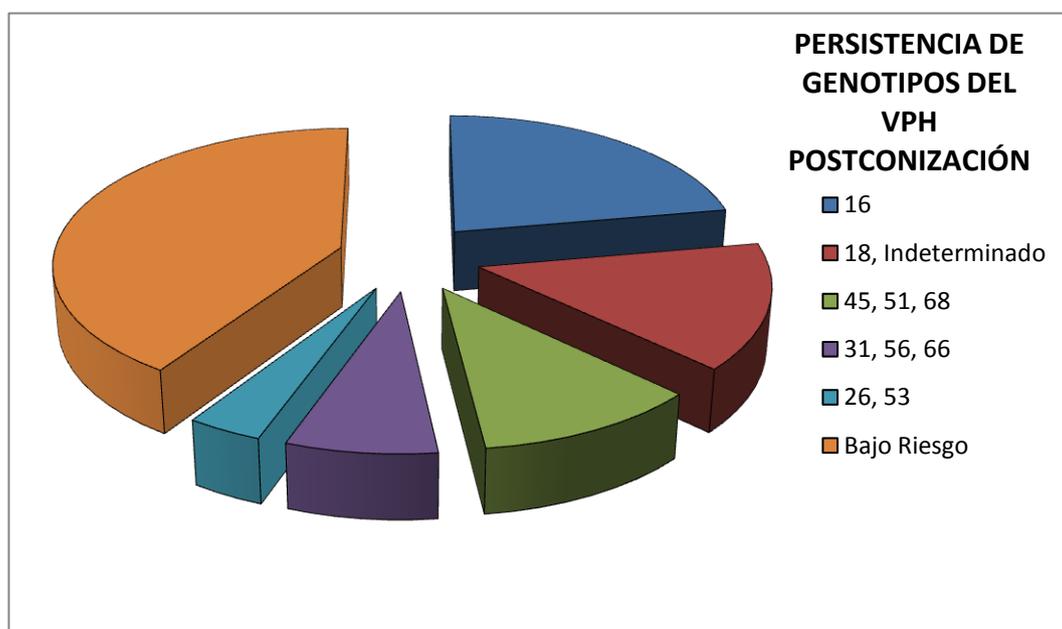


Figura 57. Persistencia de genotipos del VPH postconización.

## RESULTADOS

La Tabla 39 describe la persistencia de genotipos del VPH en relación con el grado de lesión histológica del cérvix. El VPH 16 postratamiento estaba presente en 5 casos (5,3%) de SIL-AG y en 1 caso (1,1%) de SIL-BG.

Tabla 39. Lesión histológica cervical y persistencia de genotipos del VPH postratamiento.

		Lesión		Total
		SIL-BG	SIL-AG	
<b>VPH 16</b>	Nº casos	1	5	6
	% del total	1,1%	5,3%	6,3%
<b>VPH 18</b>	Nº casos	2	2	4
	% del total	2,1%	2,1%	4,2%
<b>VPH Indeterminado</b>	Nº casos	1	3	4
	% del total	1,1%	3,2%	4,2%
<b>VPH 45</b>	Nº casos	1	2	3
	% del total	1,1%	2,1%	3,2%
<b>VPH 51</b>	Nº casos	2	1	3
	% del total	2,1%	1,1%	3,2%
<b>VPH 68</b>	Nº casos	1	2	3
	% del total	1,1%	2,1%	3,2%
<b>VPH 31</b>	Nº casos	0	2	2
	% del total	0,0%	2,1%	2,1%
<b>VPH 56</b>	Nº casos	1	1	2
	% del total	1,1%	1,1%	2,1%
<b>VPH 66*</b>	Nº casos	1	1	2
	% del total	1,1%	1,1%	2,1%
<b>VPH 26*</b>	Nº casos	1	0	1
	% del total	1,1%	0,0%	1,1%
<b>VPH 53*</b>	Nº casos	0	1	1
	% del total	0,0%	1,1%	1,1%
<b>VPH BR</b>	Nº casos	3	8	11
	% del total	3,2%	8,4%	11,6%

\*Probable Alto Riesgo.

### 4.3. Tiempo de seguimiento

El tiempo medio de seguimiento postconización, en nuestra Unidad de Patología del TGI hospitalaria, fue de 23,29 meses, con un rango entre 3 y 70 meses (Figura 58), procediéndose a partir de ahí al alta del TGI y seguimiento en Atención Primaria, siguiendo el Proceso Asistencial Integrado (PAI) de Cáncer de cérvix de la Conserjería de Salud de la Junta de Andalucía.

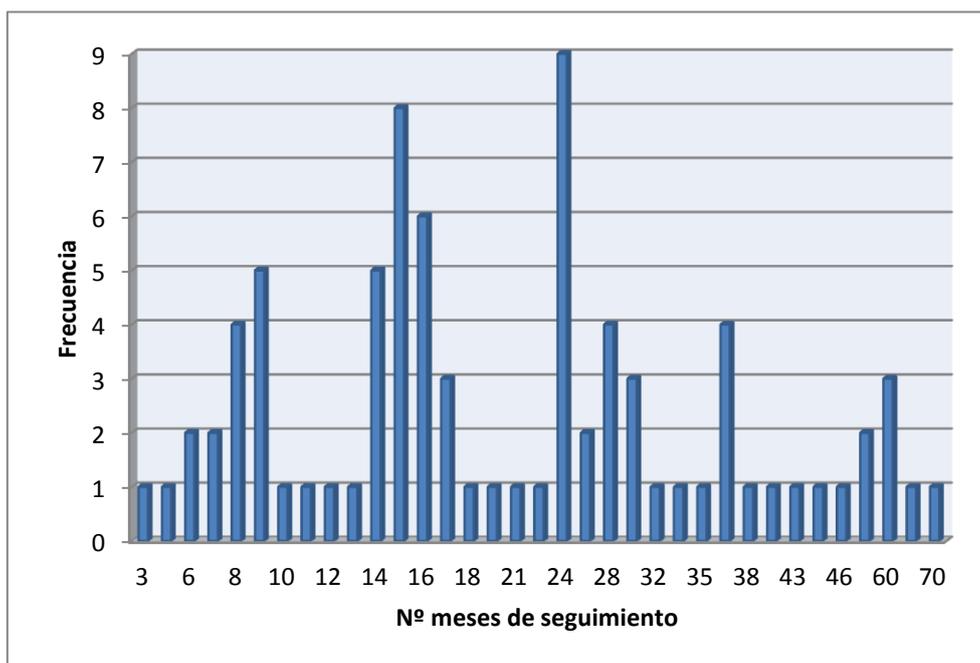


Figura 58. Tiempo de seguimiento.

## RESULTADOS

### 5. DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p16/Ki-67 Y SU CORRELACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA, Y LA PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN VIRAL

La tinción dual p16/Ki-67 se aplicó en un total de 127 casos de márgenes de piezas de conización, con resultado positivo en 87 casos (68,5%), que se distribuyen de la siguiente forma:

#### 5.1. Tinción dual y márgenes afectos

En nuestra muestra de 95 conizaciones con márgenes afectos, constituida por 80 SIL-AG y 15 SIL-BG, aplicamos la tinción dual a los bordes de las piezas de conización, en 93 casos (97,9%), concretamente en 78 casos de SIL-AG y 15 casos de SIL-BG.

La relación entre los resultados de la tinción dual p16/Ki-67 y el grado de lesión histológica cervical en las conizaciones con afectación de los bordes quirúrgicos se muestra en la Tabla 40, con una clara significación estadística ( $p=0,000$ ).

Tabla 40. Relación entre la tinción dual y el grado de lesión histológica con márgenes afectos.

$p=0,000$			p16/Ki-67		Total
			POSITIVO	NEGATIVO	
Lesión Margen Afecto	SIL-BG	Nº casos	2	13	15
		% del total	2,2%	14,0%	16,1%
	SIL-AG	Nº casos	72	6	78
		% del total	77,4%	6,5%	83,9%
Total		Nº casos	74	19	93
		% del total	79,6%	20,4%	100,0%

## RESULTADOS

El test dual resultó positivo en 72 casos (77,4%) de SIL-AG con márgenes afectados, y en 2 casos (2,2%) de SIL-BG (Figura 59).

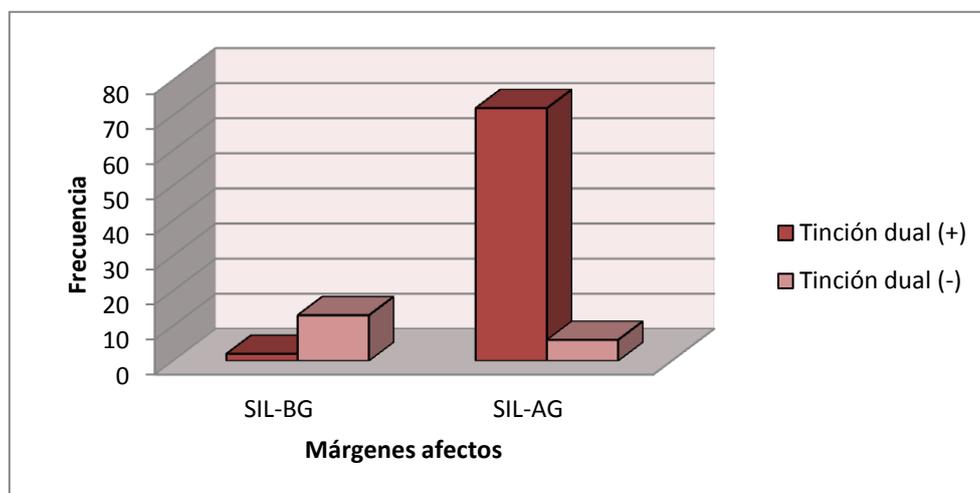


Figura 59. Tinción dual y grado de lesión histológica con márgenes afectados.

También hemos estudiado la relación entre el doble marcador y la localización de la afectación del borde quirúrgico. Los resultados, con significación estadística ( $p=0,000$ ), se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41. Relación entre la tinción dual y la localización de la afectación de los márgenes quirúrgicos.

$p=0,000$			p16/Ki-67		Total
			POSITIVO	NEGATIVO	
Localización de la afectación del borde	Exocervical	Nº casos	11	12	23
		% del total	11,8%	12,9%	24,7%
	Endocervical	Nº casos	48	5	53
		% del total	51,6%	5,4%	57,0%
	Ambos	Nº casos	15	2	17
		% del total	16,1%	2,2%	18,3%
Total		Nº casos	74	19	93
		% del total	79,6%	20,4%	100,0%

## RESULTADOS

En caso de afectación del borde endocervical, la tinción dual fue positiva en 48 casos (51,6%), y negativa en 5 casos ((5,4%). Cuando el borde exocervical estaba afectado, el test dual fue positivo en 11 casos (11,8%) y negativo en 12 casos (12,9%).

### 5.2. Tinción dual y márgenes indemnes

Del total de las 480 conizaciones resultaron 326 casos con bordes libres: 243 SIL-AG y 83 SIL-BG. Para aplicar la tinción dual, escogimos una muestra de 34 casos, formada por 24 SIL-AG y 10 SIL-BG.

Encontramos significación estadística ( $p=0,029$ ) entre el test dual p16/Ki-67 y el grado de lesión histológica en las conizaciones con bordes quirúrgicos indemnes. Los resultados se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Relación entre la tinción dual y el grado de lesión histológica con márgenes indemnes.

$p=0,029$			p16/Ki-67		Total
			POSITIVO	NEGATIVO	
Lesión Margen Indemne	SIL-BG	Nº casos	1	9	10
		% del total	2,9%	26,5%	29,4%
	SIL-AG	Nº casos	12	12	24
		% del total	35,3%	35,3%	70,6%
Total		Nº casos	13	21	34
		% del total	38,2%	61,8%	100,0%

El doble marcador fue negativo en el 61,8% de las SIL con márgenes indemnes, concretamente en 12 casos (35,3%) de SIL-AG y 9 casos (26,5%) de SIL-BG.

✓ Además se aplicó la tinción dual a una **muestra control**, aleatoria, compuesta por 22 cérvix amputados, que habían sido intervenidos por otras causas distintas a procesos oncológicos, y el resultado fue negativo en el 100% de los casos.

### 5.3. Tinción dual y persistencia del VPH-AR postcono

Analizamos la relación entre el test dual p16/Ki-67 y la persistencia del VPH en las conizaciones, con márgenes afectos, y no observamos significación estadística (Tabla 43).

Tabla 43. Relación entre tinción dual y persistencia de VPH postcono.

NS			p16/Ki-67		Total
			POSITIVO	NEGATIVO	
<b>PERSISTENCIA INFECCIÓN VPH POSTCONO</b>	<b>SÍ</b>	Nº casos	17	7	24
		% del total	26,9%	11,1%	38,0%
	<b>NO</b>	Nº casos	31	8	39
		% del total	49,3%	12,7%	62,0%
Total		Nº casos	49	14	63
		% del total	76,2%	23,8%	100,0%

Del total de 25 casos de persistencia vírica global (AR+BR) postconización, con bordes quirúrgicos positivos para lesión intraepitelial (Tabla 37), la tinción dual se aplicó en 24 casos (38%): el resultado fue positivo en 17 casos (26,9%) y negativo en 7 casos (11,1%).

Tampoco observamos relación estadísticamente significativa entre la tinción dual y el resultado del riesgo del estudio molecular del VPH postconización (Tabla 44). El test dual resultó positivo en 13 casos (54,1%) de persistencia del VPH-AR, en 11 casos (45,8%) de forma simple y en 2 casos (8,3%) asociado a VPH-BR.

## RESULTADOS

Tabla 44. Relación entre la tinción dual y el resultado del riesgo del estudio molecular del VPH postconización.

NS			p16/Ki-67		Total
			POSITIVO	NEGATIVO	
RIESGO INFECCIÓN VPH POSTCONO	ALTO RIESGO	Nº casos	11	3	14
		% del total	45,8%	12,5%	58,3%
	BAJO RIESGO	Nº casos	4	1	5
		% del total	16,7%	4,2%	20,9%
	ALTO+BAJO RIESGO	Nº casos	2	3	5
		% del total	8,3%	12,5%	20,8%
Total		Nº casos	17	7	24
		% del total	70,8%	29,2%	100,0%

La Tabla 45 muestra la distribución de la expresión de p16/Ki-67 en relación con el grado de lesión histológica cervical y la persistencia de la infección viral postratamiento.

En las SIL-AG, el doble marcador fue positivo en 11 casos (45,8%) de persistencia de VPH-AR postcono, en 9 casos (37,5%) de forma aislada y en 2 casos (8,3%) asociado a VPH-BR. Frente a 2 casos (8,3%) de positividad del test dual y persistencia de VPH-AR en las SIL-BG (Figura 60).

## RESULTADOS

Tabla 45. Distribución de la expresión de p16/Ki-67 con el grado de lesión histológica cervical y la persistencia del VPH postconización.

			SIL-AG			SIL-BG			Total
VPH POSTCONO			AR	BR	AR+BR	AR	BR	AR+BR	
p16/ Ki-67	(+)	Nº casos	9	4	2	2	0	0	17
		% del total	37,5%	16,6%	8,3%	8,3%	0,0%	0,0%	70,8%
	(-)	Nº casos	0	0	2	3	1	1	7
		% del total	0,0%	0,0%	8,3%	12,5%	4,2%	4,2%	29,2%
Total		Nº casos	9	4	4	5	1	1	24
		% del total	37,5%	16,6%	16,6%	20,8%	4,2%	4,2%	100,0%

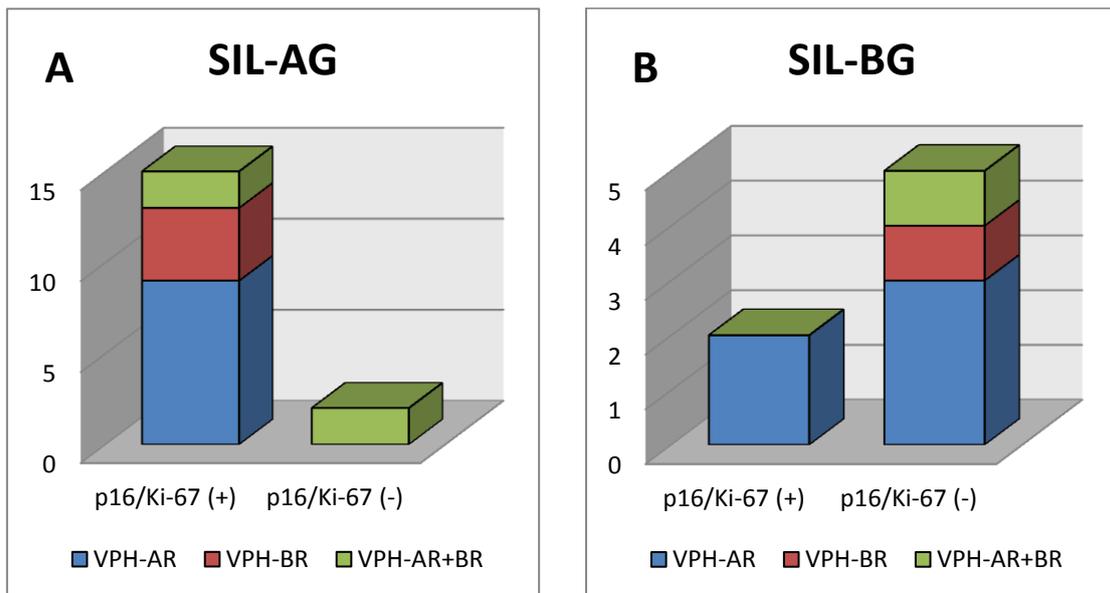


Figura 60. Tinción dual, persistencia de VPH postcono y grado de lesión histológica cervical. A: SIL-AG. B: SIL-BG.

# DISCUSIÓN

---

### 1. CONSIDERACIONES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

#### 1.1. Edad

En nuestro estudio, la edad media de las pacientes sometidas a conización cervical con márgenes afectos, fue 41,77 años, con un rango entre 20 y 71 años. En los 80 casos de SIL-AG fue de 40,9 años (20-71), y en los 15 casos de SIL-BG fue 46,5 años (34-65).

Esta edad media es similar a la encontrada en los distintos estudios publicados sobre mujeres con lesiones premalignas del cérvix, que se sitúa entre los 27 y 47 años, según el metaanálisis de Ghaem-Maghami et al<sup>181</sup>.

En el estudio de Kietpeerakool et al<sup>179</sup>, sobre factores clínico-patológicos predictores de escisión incompleta tras conización, la edad media de las 201 pacientes era 43 años, con un rango entre 26 y 72 años.

Encontramos que el 66% de las mujeres de nuestro estudio pertenecen al grupo de edad comprendido entre los 30 y los 50 años, siendo comparable a la mayoría de las series publicadas<sup>188</sup>.

#### 1.2. Menopausia

En nuestra serie, 22 pacientes (23,2 %) eran menopáusicas en el momento del diagnóstico, y 73 (76,8 %) no lo eran. No observamos significación estadística ( $p=0,092$ ) entre el grado de lesión histológica y el estado menopáusico de las mujeres.

En el estudio de Serati et al<sup>182</sup>, sobre factores de riesgo para la recurrencia de CIN tras conización, realizado en Italia con 282 mujeres conizadas, el 9,6% eran menopáusicas.

En el trabajo de Chen et al<sup>189</sup> con 1113 pacientes, de las cuales 141 presentaban márgenes positivos en la conización, el 35,4% de las mujeres eran menopáusicas, frente al 11,6% que no lo eran.

## 2. CONSIDERACIONES SOBRE LOS COFACTORES DE ADQUISICIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH

### 2.1. Edad de inicio de las relaciones sexuales

La edad media de inicio de las relaciones sexuales en nuestro estudio fue 18,17 años, con un rango comprendido entre 14 y 24 años. El rango de los 16 a los 20 años de edad de inicio de las relaciones sexuales engloba a los tres cuartos del total de casos estudiados, siendo la edad más frecuente a los 17 años.

El estudio AFRODITA<sup>190</sup> es un estudio transversal de base poblacional, diseñado para estimar el grado de realización de la citología preventiva en España, así como la prevalencia de indicadores sociodemográficos, reproductivos, de conducta sexual y del conocimiento de la mujer sobre la infección por VPH, el cribado y el cáncer de cérvix. Según los resultados de este estudio aproximadamente un tercio de las mujeres estudiadas iniciaron sus relaciones sexuales entre los 19 y 21 años. La media de edad de la primera relación sexual es de 23,8 años en mujeres de 56 a 70 años, y de 18,2 años en las mujeres de 18 a 25 años.

No hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la edad de la primera relación sexual y el grado de lesión histológica cervical ( $p=0,167$ ).

Sin embargo, hemos observado una tendencia, en las mujeres que iniciaron las relaciones sexuales antes de los 15 años de edad, ya que éstas son más frecuentes a medida que aumenta la gravedad de la lesión histológica.

Simões et al<sup>191</sup> publican un estudio retrospectivo de 274 mujeres conizadas, en el que la edad media de la primera relación sexual es 17,42 años, con un rango que varía desde los 10 a 32 años.

En el estudio de Valasoulis et al<sup>192</sup> realizado en Grecia, sobre el papel de los cofactores, relacionados con la infección por VPH, para predecir enfermedad residual/recurrente, la edad media de inicio de las relaciones sexuales es 18,3 años, muy similar a nuestro trabajo.

### 2.2. Número de parejas sexuales

En nuestro estudio, el 40% de las mujeres han tenido una pareja, el 28,4% dos parejas, y el 25,3% tres parejas. La media de compañeros sexuales es 2,01, con un rango de 1 a 7 parejas.

En el estudio AFRODITA<sup>190</sup>, el 70,6% de las pacientes han tenido una sola pareja sexual en el global de la población española.

No apreciamos significación estadística ( $p=0,103$ ) entre la lesión histológica de cérvix y el número de parejas sexuales, pero el porcentaje de mujeres con 3 parejas es mayor en las SIL-AG (22,1%) que en las SIL-BG (3,2%).

En el estudio publicado por Crochard et al<sup>193</sup>, sobre jóvenes de 18-24 años de 7 países europeos, el número medio de parejas sexuales varía de 2 a 4.

## 3. CONSIDERACIONES SOBRE LOS COFACTORES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENÉISIS CERVICAL

### 3.1. Hábito tabáquico

En nuestro trabajo, el 55,8% de las pacientes eran fumadoras frente al 35,8% que no lo eran, y el 8,4% pertenecían al grupo de ex-fumadoras ( $\geq 1$  año sin fumar).

Hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y el grado de lesión histológica ( $p=0,013$ ).

En la mayoría de los datos revisados en la literatura, se pone de manifiesto que el tabaco interfiere en un aumento de la prevalencia de la infección, y se asocia también con un aumento del riesgo de CIN y cáncer cervical<sup>76-83</sup>.

En el estudio español de Moya et al<sup>177</sup>, sobre factores de riesgo relacionados con la persistencia o recidiva de CIN, el 28,8 % de las pacientes eran fumadoras.

Andrade et al<sup>194</sup> en su trabajo con una muestra de 97 mujeres conizadas con márgenes positivos, en la que el 35% eran fumadoras, concluyen que el tabaco es un factor de riesgo para la recidiva de CIN.

### 3.2. Paridad

El número medio de partos por paciente fue de 1,64 partos, con un rango entre 0 y 6 partos. Obtenemos una media de 0,51 abortos por paciente, cuyo rango abarca de 0 a 4 abortos.

Al estudiar la relación entre el número de partos y la lesión cervical, no encontramos una correlación estadísticamente significativa ( $p=0,562$ ).

Ocho estudios de casos y controles sobre el carcinoma invasivo y dos estudios sobre el carcinoma in situ de cuello uterino, sugieren que las mujeres con tres o cuatro embarazos tienen un riesgo 2,6 veces superior de presentar cáncer de cuello uterino que las nulíparas, y las mujeres con 7 ó más partos tienen un riesgo 3,8 veces mayor<sup>86</sup>.

### 3.3. Anticonceptivos hormonales

Moreno et al<sup>84</sup> realizan un meta-análisis en el que incluyeron 10 estudios de casos y controles en pacientes con cáncer de cuello uterino (CIS y carcinoma invasivo). Concluyen que el uso a largo plazo de los anticonceptivos orales podría aumentar hasta 4 veces el riesgo de cáncer de cérvix en mujeres infectadas por el VPH.

En nuestra muestra el 25,3% de las mujeres utilizaban anticonceptivos hormonales desde hace 3 años o más, frente al 13,7% que lo usaban desde hace menos de 3 años, y el 61,1% que no lo habían empleado. La utilización de los mismos predominaba en las SIL-AG respecto a las SIL-BG, independientemente del tiempo de uso de dicho tratamiento hormonal.

Según los resultados obtenidos en la encuesta DAPHNE<sup>195</sup>, sobre anticoncepción en España, publicada en el año 2011, el porcentaje de mujeres que utilizaban anticonceptivos hormonales era un 20,3% en el año 2007, un 17,9% en el año 2009, y un 16,3% en el año 2011. Por tanto, el porcentaje de mujeres que usaban anticonceptivos hormonales es mayor en nuestra muestra que la media de dicho estudio.

### 3.4. Inmunosupresión

Coronado et al<sup>196</sup> destacan el estado de inmunosupresión como factor de riesgo predictivo de recurrencia de lesiones preneoplásicas del tracto genital inferior.

En nuestra serie el 8,5% de las pacientes presentaban un estado de inmunodepresión, bien por VIH, enfermedad autoinmune en tratamiento con corticoides u otras causas. Todas estas mujeres se encontraban en los casos de SIL-AG, no había ninguna paciente inmunodeprimida entre las SIL-BG.

La incidencia global de CIN en las mujeres VIH positivas varía entre el 10 y el 25%<sup>106-109</sup>. Las pacientes con VIH positivo tienen un mayor riesgo de infección por VPH y 9 veces más riesgo de desarrollar cáncer cervical.

## 4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

### 4.1. Biopsia cervical

En nuestra muestra la biopsia cervical dirigida por colposcopia se realizó en el 85% de las pacientes. El 72,6% de los casos de SIL-AG informados en la biopsia de cérvix, fueron diagnosticados de SIL-AG en el estudio histológico del cono.

Un meta-análisis de nueve publicaciones, realizado por Mitchell et al<sup>130</sup>, analizó la exactitud diagnóstica de la colposcopia+biopsia y concluye que para diferenciar el epitelio normal del que presenta cualquier anomalía, la suma de la colposcopia y la biopsia ofrece una sensibilidad del 96%, con una especificidad del 48%. La especificidad aumenta al 69% cuando diferenciamos entre cérvix normal-LSIL frente a CIN2-3, aunque paralelamente se reduce la sensibilidad al 85%.

### 4.2. Infección por VPH y genotipo viral

El diagnóstico molecular del VPH preconización se realizó en el 85,3% de las mujeres, y sus resultados fueron: 61 casos (75,3%) de VPH-AR, 13 (16,1%) de VPH-AR y BR, y en 7 casos (8,6%) fue negativo. Apreciamos una relación, con significación estadística ( $p=0,000$ ), entre el resultado del riesgo del estudio molecular del VPH, y el grado de lesión histológica del cérvix.

## DISCUSIÓN

Muchos trabajos reflejan claramente un aumento de la prevalencia de infección por VPH con el aumento de la severidad de la lesión cervical, llegando de manera mayoritaria a cerca del 90% de prevalencia de infección por VPH en los casos de carcinoma.

En un estudio realizado en Barcelona, por González-Bosquet et al<sup>197</sup>, se obtuvo una prevalencia de infección por VPH del 46,6% en ASCUS, 60,7% en LSIL y del 84,2% en HSIL.

En la serie de Pérez-Castro et al<sup>198</sup>, en Galicia, sobre un total de 94 pacientes con lesión CIN2+, la prevalencia del VPH-AR fue del 96,8%, con un 47% de infecciones simples y un 53% de infecciones múltiples.

En nuestro estudio se detectó un 56,8% de infecciones simples y un 43,2% de infecciones múltiples.

De los datos revisados en la literatura, se observó que en Portugal, en un estudio realizado por Pista et al<sup>199</sup>, con muestras cervicales de 1.057 mujeres, el 32% de las infecciones por VPH eran debidas a infecciones múltiples, además estas infecciones fueron más frecuentes en mujeres menores de 30 años.

Algunos estudios sugieren el posible papel de la infección múltiple y la progresión de la neoplasia cervical, mientras que otros muestran que el riesgo de lesiones precancerosas o cáncer invasor en mujeres infectadas por múltiples tipos no es mayor que el de las infectadas por un único tipo de VPH. La evidencia más reciente señala que el factor más importante en la progresión de las lesiones es el genotipo del VPH, más que si la infección es simple o múltiple.

Kanh et al<sup>200</sup> estudiaron las diferencias en la progresión a CIN 3 según el tipo de VPH-AR. En mujeres infectadas por VPH-AR con citología inicial negativa, el 10% de las mujeres infectadas por el VPH 16 o 18 presentaron CIN 3 a los 3 años, y el 18-20% a los 10 años. Sin embargo, la progresión a CIN 3 de las mujeres con otros tipos de VPH-AR fue del 3%.

Los genotipos del VPH identificados en el estudio preconización por orden de frecuencia fueron:

## DISCUSIÓN

- VPH 16 en el 44,2% de los casos. El VPH 16 fue el detectado con mayor frecuencia, tanto en infecciones simples como multigenómicas.
- VPH 31 en el 12,6%.
- VPH 58 en el 9,5%.
- VPH 45 en el 8,4%.
- VPH 18 y VPH de riesgo indeterminado en el 6,3%.
- VPH 33, 39, 51, 52, 53 y 66 en el 5,3%.
- VPH 35 y 73 en el 4,2%.
- VPH 56 en el 3,2%.
- VPH 59 y 82 en el 2,1%
- VPH 68 en el 1,1%.

Un análisis combinado de 12 estudios llevados a cabo en 25 países, realizado por Muñoz et al<sup>201</sup>, estimó la prevalencia específica de tipos de VPH en 3.085 casos de CCU. Se aplicó un protocolo de estudio estandarizado y la determinación de ADN de VPH mediante PCR con cebadores GP5+/6+. La prevalencia global de VPH fue del 96% y los tipos más comunes fueron, por orden de frecuencia decreciente, los VPH 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 69, 73 y 82.

Actualmente, hay evidencia suficiente para afirmar que el VPH 16 es el genotipo más frecuente a nivel mundial y en cada región, pero que existen variaciones en la prevalencia del resto de los diferentes genotipos del VPH según la población que estudiemos.

En nuestra muestra, el VPH 31 es el segundo más frecuente al igual que en la serie de Pérez-Castro et al<sup>198</sup> y el estudio de Tjalma et al<sup>202</sup>. Castle et al<sup>203</sup>, en lesiones CIN3 encuentran, por orden de frecuencia, VPH 16, 31, 52, 51 y 18.

El VPH 18 representa el 6,3% de los casos, por detrás del VPH 16, 31, 58 y 45. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en la población española. Doménech-Peris et al<sup>204</sup>, aportan una prevalencia del VPH 18 del 2,9%, por detrás también del VPH 16, 58, 33, 31 y 53; Otero Motta et al<sup>205</sup>, del 5,8% para el VPH 18, por detrás del VPH 16, 53, 51, 31, 58, 66, 56 y 33.

## DISCUSIÓN

Los datos publicados por el *Information Centre on HPV* de la WHO/ICO<sup>45</sup> en el 2015, con referencia a los tipos más frecuentes de VPH en España en las HSIL, son los siguientes: VPH 16 (42,6%), VPH 52 (5,9%), VPH 33 (5,4%), VPH 31 (4,3%), VPH 51 (4%), VPH 18 (3%), VPH 35 (2,9%), VPH 58 (2,8%), VPH 56 (2,4%) y VPH 68 (2%) (Figura 8).

### 4.3. Colposcopia

Una revisión realizada en el año 2006 por la Cochrane<sup>206</sup>, basada en la evidencia actualmente disponible sobre el empleo de la colposcopia, concluye que es un método excelente para el estudio de mujeres con citología anormal, pero sin utilidad como test de cribado primario ni como sustituto de la evaluación histológica. Confirma su eficacia en establecer la topografía de las lesiones y localizar las áreas más sospechosas para dirigir la biopsia. Además se confirma su eficacia en la planificación individual de la terapia más efectiva.

En nuestro estudio, la colposcopia fue patológica en el 84,6% de los casos: encontramos hallazgos colposcópicos de Grado 1 o cambios menores en 40 casos (44%), y de Grado 2 o cambios mayores en 31 casos (34,1%). En 6 casos (6,6%) el resultado colposcópico fue sospecha de cáncer invasor de cérvix.

Las lesiones colposcópicas se localizaban con mayor frecuencia en el cuadrante anterior (33,6%), y sobre todo a las 12 h. (30,5%). El 59,7% ocupaban sólo un cuadrante. Estas lesiones penetraban por el orificio cervical externo en 32 casos (35,2%), de las cuales 31 (34,1%) eran SIL-AG.

Hammes et al<sup>207</sup> publicaron un estudio cuyo objetivo era evaluar la capacidad de la colposcopia en predecir el diagnóstico histológico al aplicar la Clasificación de la IFCPC. Para distinguir entre cérvix normal y el que presenta lesiones de bajo grado (CIN1) respecto al que presenta CIN2+, la colposcopia tuvo una sensibilidad del 61,1% y una especificidad del 94,4%. Los hallazgos colposcópicos clasificados como cambios mayores tuvieron el mayor VPP para detectar CIN2+. Las anomalías colposcópicas dentro de la ZT y las lesiones extensas estuvieron más estrechamente relacionadas con lesiones de alto grado.

### 4.4. Diagnóstico anatomopatológico del cono

#### A. Afectación de los márgenes quirúrgicos

Durante el período del estudio (2008-2013) se realizaron, en nuestra UGC, un total de 480 conizaciones, de las cuales resultaron con márgenes afectados de lesión 95 casos (19,8%), que constituyen nuestra muestra, formada por 80 SIL-AG y 15 SIL-BG.

La afectación de los márgenes quirúrgicos de la conización es un factor asociado a la persistencia/recurrencia lesional<sup>177, 182</sup>. La incidencia de bordes quirúrgicos afectados ha sido descrita hasta en el 48% de los casos en los que se realiza un tratamiento escisional<sup>179-181</sup>. Sin embargo la escisión incompleta no es sinónimo de lesión residual. El daño térmico en los márgenes de resección puede dificultar su evaluación histológica. La frecuencia del daño térmico es dependiente de la experiencia y habilidad del cirujano, y de la utilización de un equipo adecuado<sup>208</sup>.

En el estudio de los márgenes de la conización de nuestra serie, resultaron afectados: el borde endocervical en 55 casos (57,9%), el exocervical en 23 casos (24,2%) y ambos bordes en 17 casos (17,9%).

Hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la localización del margen quirúrgico afectado y el grado de lesión histológica cervical ( $p=0,001$ ). En las SIL-AG el borde endocervical está afectado en el 54,7% de los casos, y el exocervical en un 14,7%, frente al 3,2% y 9,5%, respectivamente, en las SIL-BG.

En el estudio de Kietpeerakool et al<sup>182</sup>, la frecuencia de afectación de márgenes del cono fue del 44,3%: el margen endocervical en el 19,9%, el exocervical en el 11,4% y ambos bordes en el 12,9% de los casos. Los autores concluyen que el estado menopáusico y la longitud del cono de menos de 10 mm son predictores de escisión incompleta del margen endocervical.

En la serie de Chen et al<sup>189</sup>, el 12,3% de los casos tenían márgenes positivos, con afectación del margen endocervical en el 32%, el exocervical en el 45,4%, y ambos márgenes en el 22,6%. Este autor también reporta que el estado menopáusico y la existencia de grandes áreas de lesión son factores de riesgo para márgenes positivos.

## DISCUSIÓN

El estudio anatomopatológico tras el tratamiento escisional, en el estudio español de Moya et al<sup>177</sup>, mostró en el 12,5% la afectación de cómo mínimo un margen de resección. El porcentaje más alto se halló en las pacientes con CIN3, donde el 16% presentó todos los márgenes afectados.

En la serie de O'Shea et al<sup>209</sup>, con 144 mujeres sometidas a conización (LEEP), el 46,5% de los casos tenían los márgenes afectados: el margen endocervical en el 11,1%, el exocervical en el 30,5%, y ambos márgenes endo y exocervical en el 4,9%.

Como la mayoría de los distintos trabajos publicados, el estudio de Leguevaque et al<sup>210</sup> refiere que el factor predictor de recurrencia más importante es el test del VPH-AR positivo a los 6 meses de la intervención, seguido de la afectación del margen endocervical.

### **B. Afectación glandular**

La afectación glandular, en el informe histológico de las piezas de conización, estaba presente en 38 casos (40%), y de éstos 36 casos (37,9%) eran SIL-AG, ya que observamos una relación estadísticamente significativa ( $p=0,022$ ) entre la gravedad de la lesión histológica cervical y la extensión glandular de la misma.

La mayoría de los autores no encuentran relación entre la afectación glandular y la probabilidad de presentar una recidiva<sup>188, 211, 212</sup>. El estudio de Kong et al<sup>188</sup> analiza los factores de riesgo para predecir lesión residual/recurrente en 701 pacientes conizadas, con una afectación glandular del 58,2%, superior a nuestra serie, y no encuentran relación de la misma con enfermedad residual o recurrente. El autor concluye que el estado del margen endocervical junto al test del VPH-AR postcono son los factores predictivos más importantes de la recidiva de lesión escamosa.

### 5. CONSIDERACIONES SOBRE LA PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN POR VPH POSTRATAMIENTO

El control y seguimiento de las pacientes tratadas por una lesión de alto grado es una parte muy importante de cualquier programa de prevención de cáncer de cérvix. La determinación del VPH-AR contribuye notablemente a mejorar el rendimiento de la citología y la colposcopia en la detección del fallo terapéutico.

En un meta-análisis, publicado en 2012 por Kocken et al<sup>175</sup>, donde se han revisado 8 publicaciones con 1.513 mujeres tratadas por CIN2+, se valoró la utilidad de la detección del VPH-AR frente a la citología y la prueba combinada (citología más detección de ADN del VPH-AR). Las sensibilidades agrupadas fueron 79% (IC 95%: 72-85%) para la citología, 92% (IC 95%: 87-96%) para las pruebas del VPH-AR, y 95% (IC 95%: 91-98%) para la prueba conjunta. Las especificidades agrupadas fueron 81% (IC 95%: 74-86%) para la citología, 76% (IC 95%: 67- 84%) para las pruebas del VPH-AR, y 67% (IC 95%: 60-74%) para la prueba combinada. Actualmente, la utilidad del test de detección de ADN del VPH-AR en el seguimiento de las pacientes tratadas por CIN2+, es un estándar de referencia, y se recomienda su utilización por la mayoría de las sociedades científicas.

En nuestra serie el estudio molecular del VPH a los 6 meses de la conización se realizó en el 56,8% de los casos, resultando positivo en 25 casos (46,3%) y negativo en 29 casos (53,7%). En el 6,3% se demostró persistencia del VPH 16, seguido del VPH 18 en el 4,2%, y en el 3,2% de los casos se identificó el VPH 45, 51 y 68.

El estudio de Baser<sup>213</sup> et al en el 2014, sobre factores de riesgo para la persistencia del VPH tras tratamiento de CIN2/3, en 113 mujeres conizadas, detecta persistencia del VPH-AR en 24 mujeres (21,2%); muy similar a nuestro trabajo con 20 casos de persistencia de VPH-AR postcono.

Rositch et al<sup>214</sup> realizan un meta-análisis, en el que incluyen 25 estudios, para estimar la incidencia de infección por VPH-AR tras tratamiento de CIN, en casi 2.000 mujeres, y concluyen que dicha incidencia varía ampliamente del 0 al 47%.

## 6. CONSIDERACIONES SOBRE LA EXPRESIÓN DE p16/Ki-67

La tinción dual p16/Ki-67 detecta la expresión de dos biomarcadores, la proteína p16<sup>INK4a</sup>, reguladora del ciclo celular, y la proteína Ki-67, un marcador de proliferación celular. La detección simultánea de ambas proteínas en la misma célula es un indicador de la desregulación del ciclo celular que ocurre cuando se produce la transformación oncogénica inducida por VPH-AR. El test dual es útil en muestras cito-histológicas del cuello uterino, tanto de origen escamoso como glandular, y proporciona un criterio objetivo para identificar aquellas mujeres con riesgo elevado de padecer o desarrollar una lesión de alto grado, con elevada sensibilidad y especificidad.

En nuestro estudio, la aplicación de la tinción dual a los bordes de 93 piezas de conización (97,9%), afectos de lesión escamosa, resultó positiva en 72 casos (77,4%) de SIL-AG, y en 2 casos (2,2%) de SIL-BG. La tinción dual p16/Ki-67 y el grado de lesión histológica cervical en las conizaciones con afectación de los bordes quirúrgicos muestran una relación estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ). Asimismo, encontramos significación estadística ( $p=0,029$ ) entre el test dual p16/Ki-67 y el grado de lesión histológica en las conizaciones con márgenes quirúrgicos indemnes.

Diversos trabajos relacionan la expresión de p16 y Ki-67 con el grado de lesión histológica, y la consideran un factor de riesgo de progresión de CIN<sup>215-217</sup>.

También observamos una relación, con significación estadística ( $p=0,000$ ), entre el doble test y la localización de la afectación del borde quirúrgico. En caso de afectación del borde endocervical, la tinción dual fue positiva en 48 casos (51,6%), y negativa en 5 casos (5,4%).

Kim et al<sup>218</sup> estudian la expresión de p16, Ki-67, y otros biomarcadores, en 149 muestras de biopsia cervical (31 CIN1, 25 CIN 2, 41 CIN3, 35 carcinoma escamoso, y 17 negativas), y asocian la expresión de Ki-67 con la escisión incompleta, considerándola como un factor de riesgo de afectación de los márgenes quirúrgicos positivos.

Cuando analizamos la relación entre el test dual p16/Ki-67 y la persistencia del VPH-AR en las conizaciones, con márgenes afectos, no observamos significación estadística. De los 13 casos de SIL-AG con márgenes afectos y persistencia del VPH-AR postratamiento, el marcador inmunohistoquímico fue positivo en 11 casos (45,8%).

## DISCUSIÓN

El estudio de Song et al<sup>219</sup> en el año 2007, con 49 muestras de conización, incluyendo 12 CIN2 y 37 CIN 3, investiga la correlación entre la carga viral del VPH-AR, y la expresión de p16 o Ki-67, para identificar biomarcadores que puedan predecir la enfermedad residual después de la conización con márgenes positivos. La expresión de p16 y Ki-67 se asoció significativamente con el grado de CIN, y la carga viral del VPH-AR no se relacionó con lesiones residuales después de la conización con márgenes positivos.

Donà et al<sup>220</sup> encontraron en 140 pacientes, un 94,6% de positividad tanto para VPH (VPH 16 y 18) como para la tinción dual, y concluyeron que esta positividad está asociada significativamente a la presencia de CIN2+ confirmada por estudio histopatológico.

Estos hallazgos demuestran la importancia de la expresión simultánea de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en células epiteliales del cuello uterino infectadas por VPH-AR, lo cual aporta un dato relevante para el manejo clínico de las pacientes conizadas por SIL-AG, con afectación de los márgenes quirúrgicos, ya que la positividad en la tinción dual nos indicaría de manera confiable la existencia de un proceso de transformación celular y posiblemente asociado a progresión neoplásica.

# CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

1. La tinción dual p16<sup>INK4a</sup>/ Ki-67 se manifiesta muy útil en el estudio de los márgenes afectos de las conizaciones, resultando positiva en la mayoría de los casos de SIL-AG (HSIL), sobre todo si está afectado el borde endocervical. Además, se confirma que dicho marcador no se expresa cuando los bordes del cono están indemnes de lesión escamosa.

2. En los casos con márgenes afectos por SIL-AG, se ha observado una relación altamente significativa con el consumo de tabaco y con la infección por el VPH 16. No obstante, ninguno de los otros cofactores incluidos en el estudio (edad de inicio de relaciones, número de parejas sexuales previos a la conización, menopausia, paridad, uso de anticoncepción hormonal, estado inmunitario), han aportado información relevante.

3. En el estudio molecular del VPH transcurridos 6 meses desde la conización, aunque no haya existido significación estadística, observamos una alta tasa de persistencia del VPH-AR, siendo el genotipo 16 el más frecuente, seguido de los genotipos 18, 45, 51 y 68.

4. En el estudio colposcópico de los casos de nuestra serie, observamos que las lesiones de AG ocupan un solo cuadrante (c. anterior-12 h.) y alcanzan de forma significativa el OCE.

5. El legrado endocervical postconización no resulta buen predictor de lesiones escamosas residuales, tanto en lesiones escamosas de AG como de BG. A la vista de estos resultados planteamos la necesidad de buscar otra prueba diagnóstica alternativa, como la determinación intraoperatoria del VPH (VPH-IO), inmediatamente postconización.

# BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55 (4): 244-65.
2. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review 1975-2006. National Cancer Institute; 2009.
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, version 2.0. IARC Cancer Base n° 5 ed. Lyon: IARC Press; 2004. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008. GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010; 127: 2893-2917.
5. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110 (3 Suppl 2): S4-7.
6. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S3/11-25.
7. Tavassoli FA, Devilee P, editors. Tumours of the breast and female genital organs. 2<sup>nd</sup> ed. Lyon: IARC Press; 2003.
8. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60 (5): 277-300.
9. Arbyn M, Raifu AQ, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004. *Annals Oncol.* 2007; 18: 1708-15.
10. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures. 2<sup>nd</sup> ed. Atlanta: American Cancer Society; 2011.
11. North AB, South CD. Cancer Incidence in Antarctica (1998-2002). In: Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, editors. Cancer Incidence in Five Continents. Vol. 9. IARC Scientific Publications No. 160. Lyon: IARC Press; 2007.
12. World Health Organisation. World health statistics 2010. [Internet]. Geneva: WHO; 2010. Disponible en: <http://www.who.int/whosis/whostat/2010>
13. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide, version 2.0. IARC Cancer Base n° 10 ed. Lyon: IARC Press; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>

## BIBLIOGRAFÍA

14. Arbyn M, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in the 27 member states for the European Union: estimates for 2004. *Annals Oncol.* 2007; 18: 1423-5.
15. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. [Internet]. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; junio 2009. Disponible en: [http://www.isciii.es/htdocs/pdf/mort\\_2006.pdf](http://www.isciii.es/htdocs/pdf/mort_2006.pdf)
16. Torrejón R, Fernández C, Rita M, editors. Cáncer de cérvix: Proceso Asistencial Integrado. 2ª ed. Sevilla: Conserjería de Salud. Junta de Andalucía; 2010.
17. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Arnold K, Marchesi F, Capocaccia R, et al. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer.* 2009; 45: 931-91.
18. Gondos A, Chokunonga E, Brenner H, Parkin DM, Sankila R, Borok MC, et al. Cancer survival in southern African urban population. *Int J Cancer.* 2004; 112 (5): 860-4.
19. Verdecchia A, Guzzinati S, Francisci S, De Angelis R, Bray F, Allemani C, et al. Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. *Eur J Cancer.* 2009; 45: 1042-66.
20. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 1985 Mar 7-13; 314 (6006): 111-4.
21. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002; 89: 213-28.
22. Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer.* 2004; 109: 157-62.
23. Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Ifyner T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:1262-67.
24. 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.
25. de Sanjosé S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer:

## BIBLIOGRAFÍA

- a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 1048-56.
26. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324:17-27.
  27. Halpern AL. Comparison of papillomavirus and immunodeficiency virus evolutionary patterns in the context of a papillomavirus vaccine. *J Clin Virol.* 2000; 19: 43-56.
  28. Myers G, Lu H, Calif C, Leitner T. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin Cancer Biol.* 1996; 7: 349-58.
  29. Ong CK, Chan S, Campo Ms, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 1993; 67: 6424-31.
  30. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (6): 518-27.
  31. Smith J, Herrero R, Erles K, Grimm D, Muñoz N, Bosch FX, et al. Adeno-associated virus seropositivity and HPV-induced cervical cancer in Spain and Colombia. *Int J cancer.* 2001; 94: 520-26.
  32. Muñoz N, Hernández-Suarez G, Méndez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer.* 2009; 100: 1184-90.
  33. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr.* 1998; 132: 277-84.
  34. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 1158-71.
  35. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vacarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005; 366 (9490): 991-8.

## BIBLIOGRAFÍA

36. de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 453-9.
37. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006; 24 (Suppl 1): S1-S15.
38. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006; 24 (suppl 13): S52-S61.
39. Bruni L, Díaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch X, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010; 202: 1789-99.
40. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesion and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003; 89 (1): 101-5.
41. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol.* 2012; 84 (6): 947-56.
42. Jurado IM, Olalla MA, Moyano M, Olalla MM, Rodríguez-Pastor JL. Prevalencia de VPH en mujeres con citologías y colposcopias normales en la unidad del T.G.I. de Málaga. Mallorca: Póster N°19. IX Congreso AEEM, Oct. 2008.
43. Jurado IM, Olalla MA, Moyano R, Garcés MD,. El virus del papiloma oncógeno en el cuello uterino de mujeres climatéricas con citologías normales. *Gineblog.* [Internet]. 2013. Disponible en: <http://www.gineblog.com/sexualidad/enfermedades-transmision-sexual/virus-papiloma-oncogeno-cuello-uterino-mujeres-climatericas-con-citologias-normales.html>
44. Olalla MA, Jurado IM, Moyano R, Pérez S, Espejo MP, Olalla MM. Prevalence and Genotype Distribution of Oncogenic-risk Human Papilloma Virus in the Cervix of Climateric Women with Normal Pap Smears. *Open Journal of Epidemiology.* 2014; 4 (3): 164-68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/ojepi.2014.43022>

## BIBLIOGRAFÍA

45. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Spain. Summary Report 2015-03-20.
46. Marrazzo JM, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers JM, Stine K. Papanicolaou test screening and prevalence of genital human papillomavirus among women who have sex with women. *Am J Public Health*. 2001; 91: 947-52.
47. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 46-54.
48. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 342-50.
49. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 (Suppl 5): F55-F70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
50. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006; 24 (Suppl 1): S16-S22.
51. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997; 102: 3-8.
52. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ Jr., Franco EL, Moscicki AB, Palefsky JM, et al. Advances in prevention of cervical cancer and other human papillomavirus-related diseases. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25: 65-81.
53. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissasi F, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 321-22.
54. Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, Vu HL, Andrasi J, et al. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2005; 96: 452-61.
55. Padilla-Paz LA. Human papillomavirus vaccine: history, immunology, current status and future prospects. *Clin Obstet Gynecol*. 2005; 48: 226-40.
56. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuipers JM, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions after initial infection. *J Infect Dis*. 2005; 191(5): 731-8.
57. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in Human Papillomavirus carcinogenesis. *Virus Res*. Nov 2002; 89 (2): 191-99.

## BIBLIOGRAFÍA

58. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjosé S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1105-12.
59. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Colmes KK, et al. Condom use and the risk of genital HPV infection in young women. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2645-54.
60. Da Silva DM, Velders MP, Nieland JD, Shiller JT, Nickoloff BJ, Kast WM. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol.* 2001 May; 13 (5): 633-41.
61. Zentz C, Wiesner M, Man S, Frankenberger B, Wollenberg B, Hillemanns P, et al. Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Hum Immunol.* 2007 Feb; 68 (2): 75-85.
62. Peng S, Trimble C, Wu L, Pardoll D, Roden R, Hung CF. HLA-DQB1\*02 restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4+ T cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15; 13 (8): 2479-87.
63. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 204.
64. Gilles C, Manigart Y, Konopnicki D, Barlow P, Rozenberg S. Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. *Gynecol Oncol.* 2005; 96: 112-18.
65. 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. *JAMA.* 2001; 285: 2995-3002.
66. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet.* 2004; 364: 1678-83.
67. Nobbenhuis MAE, Helmerhorst TJM, Van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet.* 2001; 358: 1782-3
68. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993; 12:186-92.

## BIBLIOGRAFÍA

69. Ho GY, Bierman R, Beardsley L. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998; 338: 423-8.
70. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12: 485-90.
71. Burchell AN, Eduardo L, Franco EL. Epidemiology of oncogenic and nononcogenic HPV types, and the evidence for differences in their sexual transmissibility. En: Monsonego J, editor. *Emerging issues on HPV infections: from science to practice.* Basel: Karger; 2006. p. 20-23.
72. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al, por el HPV Study Group. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003; 158: 486-94.
73. Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 14-9.
74. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet.* 2003; 362: 1871-6.
75. Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, et al. Proyecto Epidemiológico Guanacaste (PEG) Group. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population base cohort study. *BMJ.* 2009 Jul 28; 339: b2569.
76. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use are risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer.* 2000; 82: 1332-8.
77. 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.
78. Kapeau AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M. Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *Am J Epidemiol.* 2009; 169 (4): 480-8.

## BIBLIOGRAFÍA

79. Pérez S, Jurado IM, Moyano R, Hierro I, Gómez T, Olalla MA. Is there a clinical profile for patients with persistent HPV infection following conization? Sevilla: Póster 1-15. Congreso EUROGIN, Feb. 2015. Disponible en: [http://www.eurogin.com/2015/images/pdf/eurogin\\_2015\\_abstracts\\_part\\_3.pdf](http://www.eurogin.com/2015/images/pdf/eurogin_2015_abstracts_part_3.pdf)
80. Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Diener-West M, et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2005; 105: 174-81.
81. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89 (12): 295-303.
82. Szarewski A, Maddox P, Royston P, Jarvis M, Anderson M. The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2001; 108 (3): 295-303.
83. Inamine M, Nagai Y, Mitsuhashi A, Nagase S, Yaegashi N. Cigarette smoke stimulates VEGF-C expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 and 2 lesions. *Int J Clin Oncol.* 2012; 17 (5): 498-504.
84. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002; 359: 1085-92.
85. Castellsagué X, Díaz M, Vaccarella S, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, et al. Intrauterine device use, cervical infection with human papillomavirus, and risk of cervical cancer: a pooled analysis of 26 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2011; 12 (11): 1023-31.
86. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002. 359: 1093-101.
87. Cortés J, Martín-Torres F, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M, et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol.* 2010; 53 (Supl 1): 1-19.
88. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in etiology of

## BIBLIOGRAFÍA

- invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis.* 2002; 185 (3): 324-31.
89. Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hanson BG, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer.* 2005; 116 (1): 110-5.
90. Samoff E, Koumans EH, Markovitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, et al. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol.* 2005; 162 (7): 668-75.
91. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94 (21): 1604-13.
92. Quint KD, de Koning MNC, Geraets DT, Quint WGV, Pirog EC. Comprehensive analysis of Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis in in-situ and invasive cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2009; 114 (3): 390-4.
93. Rieck G, Fiander A. The effect of lifestyle, role of diet and nutrition factors on gynaecological cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006; 20 (2): 227–51.
94. Davies AA, Smith GD, Harbord R, Bekkering GE, Sterna JAC, Beynon R, et al. Nutritional interventions and outcome in patients with cancer or preinvasive lesions: systematic review. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98 (14): 961-73.
95. Puig-Tintoré LM, Cortés J, Castellsagué X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S, et al. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol.* 2006; 49 (Supl 2): 5-62.
96. Kahn MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1072-9.
97. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008; 68: 307-13.
98. Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 35-40.

## BIBLIOGRAFÍA

99. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006. 15: 820-2.
100. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer.* 2004; 112: 854- 9.
101. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma *Brit J Cancer.* 2005; 92: 891-4.
102. Ordi J, Puig-Tintoré LM, Torné A, Sanz S, Esteve R, Romagosa C, et al. Contribución de la detección del virus del papiloma humano de alto riesgo al estudio de las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino. *Med Clin (Barc).* 2003; 121: 441-5.
103. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer.* 2001; 89: 1616-23.
104. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Cubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004; 92: 873-80.
105. Ozsaran AA, Ates T, Dikmen Y, Zeytinoglu A, Terek C, Erhan Y, et al. Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1999; 20 (2): 127-30.
106. de Sanjosé S, Palefsky J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res.* 2002; 89 (2): 201-11.
107. Palefsky J, Holly EA. Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 41-6.
108. Chirenje ZM. Hiv and cancer of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2005; 19: 269-76.
109. Galceran J, Marcos-Gragera R, Soler M, Romaguera A, Ameijide A, Izquierdo A, et al. Cancer incidence in AIDS patients in Catalonia, Spain. *Eur J Cancer.* 2007; 43 (6): 1085-91.

## BIBLIOGRAFÍA

110. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002; 29 (Suppl 16): 15-8.
111. Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Jul 1; 88(13): 5523-7.
112. Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology.* 2009 Jan 5; 383 (1): 69-77.
113. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kissel'ov F, Eienkel J, Hoeckel M, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene.* 2003; 22: 3977-84.
114. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2009 Oct 17.
115. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. Review. *Virus Res.* 2009; 143:195-208.
116. Commission of the European Communities. Recomendación del Consejo sobre el Cribado del Cáncer de 2 de diciembre 2003 (2003/878/CE). *Diario Oficial de la Unión Europea (L327/34, del 16-XII-2003).*
117. IARC International Agency for Research on Cancer. Cervix Cancer Screening. *IARC Handbooks of Cancer Prevention.* Vol. 10. Lyon: IARC Press; 2005.
118. ACS American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures.* Atlanta: American Cancer Society; 2008.
119. ACOG American College of Obstetrician and Gynecologist. Practice Bulletin: clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Cervical Cytology Screening. August 2003; N° 45.
120. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287(16): 2114-19.
121. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5: F88-F99.

## BIBLIOGRAFÍA

122. Castle PE, Bulten J, Confortini M, Klinkhamer P, Pellegrini A, Siebers AG et al. Age-specific patterns of unsatisfactory results for conventional Pap smears and liquid-based cytology: data from two randomised clinical trials. *BJOG*. 2010; 117: 1067-73.
123. De Bekker-Grob EW, de Kok IM, Bulten J, van Rosmalen J, Vedder JE, Arbyn M et al. Liquid-based cervical cytology using ThinPrep technology: weighing the pros and cons in a cost-effectiveness analysis. *Cancer Causes Control*. 2012; 23: 1323-31.
124. Eversole GM, Moriarty AT, Schwartz MR, Clayton AC, Souers R, Fatheree LA et al. Practices of participants in the College of American Pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytology, 2006. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134: 331-5.
125. Tambouret RH. The evolution of the Papanicolaou smear. *Clin Obstet Gynecol*. 2013; 56: 3-9.
126. Dalla Palma P, Moresco L, Giorgi Rossi P. Health technology assessment of computer-assisted Pap test screening in Italy. *Act Cytol*. 2013; 57 (4): 349-58. doi: 10.1159/000351167
127. Papillo JL, St John TL, Leiman G. Effectiveness of the ThinPrep Imaging System: clinical experience in a low risk screening population. *Diagn Cytopathol*. 2008; 36: 155-60.
128. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*. 2008; 337: a1754. doi: 10.1136/bmj.a1754
129. Torné A, del Pino M, Cusido M, Alameda F, Andia D, Castellsagué X, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Prog Obstet Ginecol*. 2014; 57 (Supl 1): 1-53.
130. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998 Apr; 91(4): 626-31.
131. Cantor SB, Cárdenas-Turanzas M, Cox DD, Atkinson EN, Nogueras-González GM, Beck JR, et al. Accuracy of colposcopy in the diagnostic setting compared with the screening setting. *Obstet Gynecol*. 2008 Jan; 111(1): 7-14.

## BIBLIOGRAFÍA

132. Bornstein J, Bentley J, Bosze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, et al. 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2012 Jul; 120 (1): 166-72.
133. Mitchell MF, Cantor SB, Ramanujam N, Tortolero-Luna G, Richards-Kortum R. Fluorescence spectroscopy for diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol.* 1999; 93:462-70.
134. Alameda, F. Simposio Sociedad Española de Anatomía Patológica-Sociedad Española de Citología: detección de virus del papiloma humano en programas de cribado de cáncer cervical. *Rev Esp Patol.* 2014; 47(4): 245-54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.patol.2014.05.001>
135. Ortiz M, Torres M, García A. Determinación del virus del papiloma humano (VPH): aspectos técnicos. En: de Sanjosé S y García AM, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención.* 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006. p. 89-105.
136. Arney A, Bennett KM. Molecular diagnostic of human papillomavirus. *Laboratory Medicine.* 2010; 41(9): 523-30.
137. Hubbard RA. Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 127(8): 9405.
138. Lörincz AT, Richart RM. Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cytology in Cervical Screening Programs. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127(8): 959-68.
139. Arbyn M, Roelens J, Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PP, et al. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Mar 28; 3: CD008054. doi: 10.1002/14651858.CD008054.pub2
140. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink ET, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009; 124: 516–20.
141. Schiffman M, Solomon D. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic contesting. *N Engl J Med.* 2013; 2324-31.
142. Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127: 335-7.

## BIBLIOGRAFÍA

143. Ramírez A, Musset M, Vilamala M, Muns M, Laso E, Serrano L, Alameda F. Hybrid capture 2 high-risk human papillomavirus test: should “grey zone” results justify repeating the test? *Anal Quant Cytol Histol.* 2013; 35: 152-6.
144. Wiwanitkit V. Cervista HPV HR test kit in cervical cancer screening. *J Low Genit Tract Dis.* 2013; 17: 99.
145. Chranioti A, Spathis A, Aga E, Meristoudis C, Pappas A, Panayiotides I, et Al. Comparison of two commercially available methods for HPV Genotyping. CLART HPV2 and Linear Array HPV genotyping tests. *Anal Quant Cytol Histol.* 2012; 34: 257-63.
146. Dutra I, Foroni I, Couto AR, Lima M, Bruge-Arma J. Molecular diagnosis of human papillomavirus and related diseases-from bench to bedside-research aspects, Dr. Davy Vanden Broeck (ed.), 2012 ISBN: 978-953-307-855-7, Intech. Disponible en: <http://www.interchopen.com/books/humanpapillomavirus-and-relateddiseases-from-bench-to-bedsideresearchaspects/molecular-diagnosis-of-human-papillomavirus>
147. Bonde J, Rebolj M, Ejegod DM, Preisler S, Lynge E, Rygaard C. HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART HPV2 human papillomavirus genotype microarray system. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1):413. doi: 10.1186/1471-2334-14-413
148. Herraiz-Hernandez E, Alvarez-Perez M, Navarro-Bustos G, Esquivias J, Alonso S, Aneiros-Fernandez J, et al. HPV Direct Flow CHIP: A new human papillomavirus genotyping method based on direct PCR from crude-cell extracts. *J Virol Methods.* 2013; 193: 9-17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.018>
149. Pinto AP, Degen M, Villa LL, Cibas ES. Immunomarkers in Gynecologic Cytology: The Search for the Ideal ‘Biomolecular Papanicolaou Test’. *Acta Cytol.* 2012; 56 (2): 109-21. doi: 10.1159/000335065
150. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *Biomed Research International.* 2013, Article ID 519619, 10 pages. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519619>
151. Godoy AEG, Bazzo KO, De Moura LB, Serafini EP. Expression Analysis of p53, Ki-67 and bcl-2 in Pre-Malignant Lesions of the Cervix. *Open Journal of*

## BIBLIOGRAFÍA

- Obstetrics and Gynecology. 2014; 4: 462-69. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/ojog.2014.48067>
152. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of Protein Biomarkers in the Detection of High-Grade Disease in Cervical Cancer Screening Programs. *Journal of Oncology*. 2012, Article ID 289315, 11 pages. doi: 10.1155/2012/289315
  153. Guo M, Baruch AM, Silva EG, Jan YJ, Lin E, Sneige N, et al. Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135: 212–20. doi: 10.1309/AJCP1LLX8QMDXHHO
  154. Torres FJ, Alameda F, Ordi J, Costa I. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico y en el manejo de las lesiones del cuello uterino. *Rev Esp Patol*. 2012; 45 (2): 86-95.
  155. Ordi J, García S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, et al. p16INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28: 90-7.
  156. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosis high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2010 Mar; 133(3): 395-406.
  157. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. NTCC working group. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 168-76.
  158. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16INK4a immunochemistry in cervical histopathology and cytology: An update of recent developments. *Int J Cancer*. 2015; 136: 2741-51. doi: 10.1002/ijc.28900
  159. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, et al. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol*. 2008; 19(3): 162-68. doi: 10.3802/jgo.2008.19.3.162

## BIBLIOGRAFÍA

160. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for Cervical Cancer Precursors with p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105 (20): 1550-7. doi: 10.1093/jnci/djt235
161. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. European CINtec Cytology Study Group. P16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSI-L Papanicolau cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolau cytology study. *Cancer Cytopathol.* 2011; 119 (3): 158-66. doi: 10.1002/cncy.20140
162. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, et al. Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol.* 2011; 121 (3): 505-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.033
163. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodríguez-Carunchio L, Torne A, del Pino M. Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol.* 2014; 122: 227-35.
164. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large Loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynecol.* 1989; 96: 1054-60.
165. Oncoguía SEGO: Prevención del cáncer de cuello de útero. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO. Octubre 2014.
166. Urdaneta-Machado JR, Uhia AM, Cepeda de Villalobos M, Guerra M, Nasser Baabel-Zambrano N, Contreras-Benítez A. Conización con asas diatermias en lesiones premalignas de cuello uterino. *Prog Obstet Gynecol.* 2011; 54(10): 511-17.
167. Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2006; 118: 2048–55.
168. Strander B, Andersson-Ellstrom A, Milsom I, Sparen P. Long term risk of invasive cancer after treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 3: population based cohort study. *BMJ.* 2007; 335: 1077.
169. Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RHM, de Schipper FA, Snijders PJF, et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN

## BIBLIOGRAFÍA

- 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv.* 2004 Jul; 59(7): 543–53.
170. Melnikow J, Kulasingam S, Slee C, Helms LS. Surveillance after treatment for cervical intraepithelial neoplasia: outcomes, cost, and cost-effectiveness. *Obstet Gynecol.* 2010; 116(5): 1158-70.
171. Wright TC, Massad LS, Dunton CHJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197: 340-5.
172. Chan BKS, Melnikow J, Slee CA, Arellanes R, Sawaya GF. Posttreatment human papillomavirus testing for recurrent cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Apr; 200(4): 422.e1–9.
173. Paraskevaïdis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2004 Apr; 30(2): 205–11.
174. Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15: 908-14.
175. Kocken M, Uijterwaal MH, de Vries ALM, Berkhof J, Ket JCF, Helmerhorst TJM, et al. High-risk human papillomavirus testing versus cytology in predicting post-treatment disease in women treated for high-grade cervical disease: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2012 May; 125(2): 500–7.
176. Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol.* 2006 Nov; 103(2): 631–6.
177. Moya AM, Martínez Escoriza, JC. Cálculo de prevalencia y riesgo atribuible de los factores de riesgo relacionados con la persistencia o recidiva de neoplasia cervical intraepitelial (CIN). *Clin Invest Gin Obst.* 2012; 39(3): 102-7. doi: 10.1016/j.gine.2010.11.009

## BIBLIOGRAFÍA

178. Martin-Hirsch PP, Paraskeva E, Bryant A, Dickinson HO. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Dec 4; 12: CD001318. doi: 10.1002/14651858.CD001318.pub3
179. Jakus S, Edmonds P, Dunton C, King SA. Margin status and excision of cervical intraepithelial neoplasia: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 2000 Aug; 55(8):520-7.
180. Ghaem-Maghani S, Sagi S, Majeed G, Soutter WP. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia and risk of treatment failure: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 985-93.
181. Serati M, Siesto G, Carollo S, Formenti G, Riva C, Cromi A, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 165: 86-90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.06.026>
182. Kietpeerakool C, Srisomboon J, Ratchusiri K. Clinicopathologic predictors of incomplete excision after loop electrosurgical excision for cervical preneoplasia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2005 Oct; 6(4): 481-4.
183. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan JM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG.* 2001 Oct; 108(10): 1025-30.
184. Torne A, Fuste P, Rodriguez-Carunchio L, Alonso I, del Pino M, Nonell R, et al. Intraoperative postconisation human papillomavirus testing for early detection of treatment failure in patients with cervical intraepithelial neoplasia: a pilot study. *BJOG.* 2013 Mar; 120(4): 392-9.
185. Instituto Nacional de Estadística. Censo 2011. Cifras oficiales de población resultantes de la revisión del Padrón municipal a 1 de enero de 2011. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t20/e260/a2011/10/&file=mun29.px&type=pcaxis&L=0>
186. Hatch KD, Shingleton HM, Orr JW Jr, Gore H, Soong SJ. Role of endocervical curettage in colposcopy. *Obstet Gynecol.* 1985 Mar; 65(3): 403-08.
187. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Oct; 136(10): 1266-97.

## BIBLIOGRAFÍA

188. Kong TW, Son JH, Chang SJ, Paek J, Lee Y, Ryu HS. Value of endocervical margin and high-risk human papillomavirus status after conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia, adenocarcinoma in situ, and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2014; 135: 468-73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.09.022>
189. Chen Y, Lu H, Wan X, Lv W, Xie X. Factors associated with positive margins in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and postconization management. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009 Nov; 107 (2): 107-10. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.05.027
190. de Sanjosé S, Cortés X, Méndez C, Puig-Tintoré L, Torné A, Roura E, et al. Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population. Results from the AFRODITA survey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 140: 234-40. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.04.005
191. Simões R, Campaner AB. Post-cervical conization outcomes in patients with high-grade intraepithelial lesions. *APMIS.* 2013; 121: 1153-61.
192. Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, Kyrgiou M, Tsoumpou I, Valari O, et al. Alterations in human papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2011; 121: 43-48. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.12.003
193. Crochard A, Luyts D, di Nicola S, Gonçalves MA. Self-reported sexual debut and behavior in young adults aged 18-24 years in seven European countries: implications for HPV vaccination programs. *Gynecol Oncol.* 2009 Dec; 115(3 Suppl): S7-S14. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.06.003
194. Andrade CEMDC, Dos Reis R, Vieira MA, Da Silva IDC, Tsunoda AT, Fregnani JHTG, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) recurrence in patients with positive cone margins. *Gynecol Oncol.* 2014; 133: 63.
195. Equipo DAPHNE. VII Encuesta de anticoncepción en España 2011. Madrid: Bayer HealthCare Pharmaceuticals; 2011.
196. Coronado P, Fasero M, Ramirez M, Arab C, Bellon M, García J, et al. La inmunosupresión es un factor mayor de riesgo en la recidiva de las lesiones del tracto genital inferior asociadas al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol.* 2010; 53(5):179-88.

## BIBLIOGRAFÍA

197. González-Bosquet E, Esteva C, Muñoz-Almagro C, Ferrer P, Pérez M, Lailla JM. Identification of vaccine human papillomavirus genotypes in squamous intraepithelial lesions (CIN2-3). *Gynecol Oncol*. 2008; 111(1): 9-12.
198. Pérez-Castro S, Lorenzo-Mahía Y, Iñarrea Fernández A, Lamas- González MJ, Sarán-Diez MT, Rubio-Alarcón J, et al. Cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in Galicia, Spain: HPV 16 prevalence and vaccination impact. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(8): 479-85.
199. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 941-46.
200. Kanh MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, et al. The elevated 10-year risk of cervical pre-cancer and cancer in women with HPV type 16 or 18 and possible utility of type. Specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 1072-9.
201. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004; 111: 278-85.
202. Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, et al for the HERACLES/SCALE Study Group. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2013; 132: 854-67.
203. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Wentzensen N, Gravitt PE. Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19: 1675-81.
204. Doménech-Peris A, Conesa-Zamora P, Sahiquillo-Frias L, Ortiz-Reina S, Moya-Biosca J, Acosta-Ortega J, et al. Human Papillomavirus genotyping in histological sections of precursor lesions of cervical carcinoma: its role as a possible adjunct for the evaluation of the oncogenic potential of specific Human Papillomavirus genotypes-a study in a coastal region of southeastern Spain. *Gynecol Obstet Invest*. 2010; 70: 113-19.
205. Otero-Motta A, Ordóñez JL, González-Celador R, Rivas B, García MC, Bullón A, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *APMIS*. 2011; 119: 204-15.

## BIBLIOGRAFÍA

206. Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekoussis T, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, et al. The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: The Cochrane colposcopy & cervical cytopathology collaborative group (C5 group) approach. *Cancer Treat Rev.* 2006; 32 (7): 516-23.
207. Hammes LS, Naud P, Passos EP, Matos J, Brouwers K, Rivoire W, et al. Valor de la terminología de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia (IFCPC) en la predicción de la enfermedad cervical. *J Low Genit Tract Dis.* 2008; 1: 14-22.
208. Paraskevaidis E, Kichener H, Malamou-Mitsi V, Agnanti N, Lois D. Thermal tissue damage following laser and largeloop conisation of the cervix. *Obstet Gynecol.* 1994; 84: 752-54.
209. O'Shea AS, Stockdale CK. The impact of LEEP margin status on subsequent abnormal cervical cytology. *Proc Obstet Gynecol.* 2014; 4(2): 5.
210. Leguevaque P, Motton S, Decharme A, Soulé-Tholy M, Escourrou G, Hoff J. Predictors of recurrence in high-grade cervical lesions and a plan of management. *Eur J Surg Oncol.* 2010 Nov; 36(11): 1073-9. doi: 10.1016/j.ejso.2010.08.135
211. Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol.* 2008; 108(3): 549-54. doi:10.1016/j.ygyno.2007.11.009
212. Chambo A, Garbeloto E, Rodrigues J, Pereira M. Positive Endocervical Margins at Conization: Repeat Conization or Colposcopic Follow-Up? A Retrospective Study. *J Clin Med Res.* 2015; 7(7): 540-44.
213. Baser E, Ozgu E, Erkilinc S, Togrul C, Caglar M, Gungor T. Risk factors for human papillomavirus persistence among women undergoing cold-knife conization for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2014; 125: 275-78.
214. Rositch AF, Soeters HM, Offutt-Powell TN, Wheeler BS, Taylor SM, Smith JS. The incidence of human papillomavirus infection following treatment for cervical neoplasia: A systematic review. *Gynecol Oncol.* 2014; 132: 767-79.
215. Indarti J, Aziz MF, Sutrisna B, Siregar NC, Suryawati B, Harahap A. Demographic characteristics, risk factors and immunocytochemistry of p16<sup>INK4a</sup>,

## BIBLIOGRAFÍA

- Ki-67, MCM5, and survivin as predictors for the progress of cervical precancer lesion. *Med J Indones*. 2010; 19(3): 147-53.
216. Looi ML, Dali AZHM, Ali SAM, Yusof YAM. Expression of p16 and pKi-67 in Cervical Preneoplasia and Neoplasia. *Asia Pac J Mol Med*. 2011; 1: 1-7.
217. Reuschenbach M, Seiz M, Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 in epithelial cells. *Int J Cancer*. 2012; 130: 388-94.
218. Kim TH, Han JH, Shin E, Noh JH, Kim HS, Song YS. Clinical Implication of p16, Ki-67, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cervical Neoplasia: Improvement of Diagnostic Accuracy for High-grade Squamous Intraepithelial Lesion and Prediction of Resection Margin Involvement on Conization Specimen. *J Cancer Prev*. 2015; 20(1): 70-7.
219. Song SH, Park HM, Eom DW, Lee JK, Lee NW, Kim AR, et al. The expression of p16 (INK4a) and ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. *Int J Gynecol Cancer*. 2007; 17(4): 858-67.
220. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012; 126: 198–202. doi:10.1016/j.ygyno.2012.05.004



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA