



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina. Universidad de Málaga

**CONTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL
CONOCIMIENTO DE LA PROGRESIÓN DE LA LESIÓN
INTRAEPITELIAL CERVICAL: CORRELACIÓN ENTRE LA
VARIABILIDAD GENÉTICA DEL PAPILOMAVIRUS Y LA EXPRESIÓN
DE p16/ki-67 EN LA CITOLOGÍA CERVICAL CONVENCIONAL**

M^a Victoria ORTEGA JIMÉNEZ

Málaga, 2011



AUTOR: María Victoria Ortega Jiménez
Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga

ISBN: 978-84-9747-628-7



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):
[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)
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.



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Dra. Martina Álvarez Pérez, Prof. Asociado de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Dra. Elena Gallego Domínguez, Facultativo Especialista de Anatomía Patológica, Hospital Universitario "Virgen de la Victoria" de Málaga.

CERTIFICAN:

Que D^{ña}. **M^a Victoria ORTEGA JIMÉNEZ**, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral "**CONTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL CONOCIMIENTO DE LA PROGRESIÓN DE LA LESIÓN INTRAEPITELIAL CERVICAL: CORRELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL PAPILOMAVIRUS Y LA EXPRESIÓN DE p16/ki-67 EN LA CITOLOGÍA CERVICAL CONVENCIONAL**", que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Prof. Dr. D. A. Matilla

Dra. Martina Álvarez

Dra. Elena Gallego

A mi familia

A Carmen Roderó, mi maestra

A Martina Álvarez

AGRADECIMIENTOS

Este es un trabajo que nació del entusiasmo, la ilusión y el esfuerzo que muchas personas han realizado de una u otra manera; a todas ellas muchas gracias.

A mis Directores:

Dr. Prof. Catedrático D. Alfredo Matilla Vicente, por brindarme esta oportunidad y otras muchas en mi camino laboral y personal.

Dra. Martina Álvarez Pérez. No hay palabras para describir su ayuda incondicional y paciencia; sin ella no hubiese sido posible la elaboración de este trabajo, así como la motivación que me ha transmitido, siempre con una sonrisa, transformando lo difícil en sencillo.

Dra. Elena Gallego Domínguez, por el trabajo realizado desde el inicio del proyecto y la colaboración en el alivio de mi carga asistencial.

A José Manuel, por su amor, preocupación constante y porque me ha dado tres hijas maravillosas.

A María, Lucía y Alejandra, por llenar mi vida de besos y abrazos.

A mis padres, José y Victoria, por los valores que me han transmitido, su cariño, generosidad y dedicación a sus hijos.

A Juanjo, mi hermano, por su cariño y paciencia infinita.

A María Victoria, mi sobrina, por ser mi niña mayor.

A Manolo y Enriqueta, por su cariño y entrega.

A Maribel y Ana, por ser las mejores tías del mundo.

A Ana, Carmen y Vicky, por la ayuda que me prestan y los buenos momentos que pasamos.

A Ana López Rodríguez, por su cariño.

A Juan Robledo y Miren García, por su amistad.

A mis amigas, ese pilar tan importante en mi vida: Esther Gallardo, Rocío Gómez Guillamón, Ana Temboury, M^a Paz Jurado, Gloria Delgado, Nuria Fdez de Castro, Ana Belén Quesada, Raquel Bravo, María Pitarch, María Calbo, Sonsoles Rodríguez, Carolina Rosales y María José Jiménez.

A Inmaculada Alados y demás amigos y conocidos, que como ella tenían ilusión en la realización de este trabajo.

A Claudia Espinoza, por el cariño con el que cuida a mis hijas y la paz que transmite.

A mis compañeros facultativos especialistas de área, Dr. Alfredo Blanes, Dra. Blanca Cabra, Dra. Cristina González, Dr. Ignacio González de Gor, Dra. Isabel Hierro, Dra. Matilde Polo, Dr. Juan José Sánchez Carrillo y Dr. Luis Vicioso, que, desde mi período de formación como residente, me han aportado no sólo docencia y ayuda profesional, sino que en el terreno personal, también he recibido de ellos su cariño.

A Lidia Pérez Villa, por animarme tanto en la realización de este proyecto.

A las citotécnicas Susana Domínguez y Rafaela Rodríguez, por su profesionalidad y constancia en su trabajo.

A todos los técnicos de laboratorio, Candelaria, Otilia, Mariana, Luli, Lourdes Pérez, Lourdes Suárez, Antonio y José Antonio, que me habéis visto crecer desde mi formación y otros que lleváis menos tiempo en el Servicio.

A María José y Vanessa, por el excelente trabajo técnico realizado, los desayunos y la preocupación vivida en los últimos días.

A las administrativas Teresa Aguilar, Encarnita Bravo, Carmen Cavelo y María Dolores Vázquez.

ABREVIATURAS

ACOG: Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos.

ADC: Adenocarcinoma.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AGC: Células glandulares atípicas.

AGC-N: Células glandulares atípicas, posible neoplasia.

AIS: Adenocarcinoma in situ endocervical.

ASC: Células escamosas atípicas.

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

ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado.

AO: Anticoncepción oral.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ASCCP: Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical.

CC: Citología Convencional.

CEC: Carcinoma escamoso celular.

CIN: Neoplasia intraepitelial cervical.

CIS: Carcinoma *in situ*.

DIU: Dispositivo intrauterino.

ETS: Enfermedad de Transmisión Sexual.

EV: Epidermodisplasia verruciforme.

FDA: Food and Drug Administration.

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

HC2: Hybrid Capture 2.

H-SIL: Lesión cervical intraepitelial de alto grado.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

IC: Intervalo de confianza.

Ig G: Inmunoglobulina G.

IMC: Índice de masa corporal.

L-SIL: Lesión cervical intraepitelial de bajo grado.

LLETZ: Escisión de la zona de transformación con un *loop* amplio.

OR: *Odds ratio*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RS: relaciones sexuales.

SD: Desviación estándar.

TPPT: Thin Pap Test, citología líquida.

URL: Unidades relativas de luz.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPH: Virus del papiloma humano.

VPH-AR: VPH de alto riesgo.

VPH-BR: VPH de bajo riesgo.

VPH-X: Tipo de VPH no determinado.

VSH-2: Virus herpes simple tipo 2.

ZT: Zona de transformación

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	A. EPIDEMIOLOGÍA.....	2
	B. RECUERDO HISTOLÓGICO Y FUNCIONAL DEL CÉRVIX.....	4
	C. LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER DE CÉRVIX.....	5
	D. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	20
	1. Estructura genómica.....	20
	2. Clasificación.....	23
	3. Prevalencia de la infección por VPH.....	28
	4. Transmisión de la infección por VPH.....	29
	5. Duración de la infección por VPH, aclaramiento y persistencia.....	34
	6. Factores de riesgo para la infección por VPH.....	38
	a. Factores genéticos.....	38
	b. Factores virales.....	39
	c. Factores medioambientales.....	41
	7. Mecanismos de oncogénesis y respuesta inmune.....	42
	a. Interacción virus-huésped. Inmunidad de la infección VPH.....	42
	b. Mecanismos de evasión tumoral. Persistencia de la infección viral.....	45
	8. Métodos de detección de la infección viral.....	48
	a. Métodos de prevención primaria: cribado poblacional.....	48
	b. Métodos de detección del VPH.....	56
	i. Métodos de detección indirecta.....	56
	ii. Métodos de detección directa.....	62
II.	PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....	69
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	73

IV. RESULTADOS.....	89
V. DISCUSIÓN.....	117
VI. CONCLUSIONES.....	135
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	138

I. INTRODUCCIÓN

A. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma invasor de cuello de útero es el segundo más frecuente en mujeres a nivel mundial. 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.¹

A nivel mundial, las áreas geográficas con más riesgo son los países menos desarrollados o en vías de desarrollo como Asia, África y Sudamérica, donde se observan hasta 453 casos por 100.000 habitantes. En contrapartida, en los países desarrollados se observan 71 casos por 100.000 habitantes. En los países de la Unión Europea, la frecuencia observada es de 31 casos por 100.000 habitantes.

En España, la incidencia de cáncer de cuello uterino se halla en el segmento bajo europeo, con una tasa poblacional media de 7,6 por 100.000 mujeres/año.¹ La incidencia más alta ha sido la observada por el registro de cáncer de Asturias, donde se observan cifras del 11,5 por 100.000 habitantes/año y la más baja por el de Zaragoza (6,5 por 100.000 habitantes/año).

La mortalidad es más baja que la incidencia, estimándose a nivel mundial un ratio incidencia/mortalidad del 55%.¹ En España las tasas de mortalidad por cáncer ajustadas a población europea han sido publicadas por el Centro Nacional de Epidemiología (C.N.E.) La media española de mortalidad por cáncer de cuello uterino en el año 2007 fue de 2,1 por 100.000 mujeres, datos recogidos del Proyecto Ariadna, del Instituto Carlos III, que se realizó en el año 2009.

En España, en el año 2010 se diagnosticaron 1948 casos de cáncer de cuello uterino, con una tasa de mortalidad de 1,9 por 100.000 habitantes

(712 muertes). Estos datos son similares a los de Francia, y son sólo mejoradas en Suiza (4 por 100.00 habitantes).¹

La mortalidad por cáncer de cuello uterino ajustada a población europea en las provincias andaluzas es la siguiente: Granada (0,97/100.000 mujeres), Córdoba (1,1/100.000 mujeres), Cádiz (1,70/100.000 mujeres), Sevilla (1,7/100.000 mujeres), Málaga (1,7/100.000 mujeres), Almería (2/100.000 mujeres), Jaén (2,7/100.000 mujeres), Huelva (4,5/100.000 mujeres).²

Los casos de cáncer de cérvix, en España, se han reducido de manera considerable, gracias a la implantación y desarrollo de los programas de *screening*/cribado (o diagnóstico temprano de cáncer no sintomático) en la población sexualmente activa.³

El carcinoma de cérvix afecta a pacientes con una edad muy temprana, a diferencia de la edad de presentación en otros tipos de cáncer. La infección por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo y su persistencia, es la causa primordial de carcinogénesis en el cuello del útero.⁴

Si bien hace más de cien años ya se establecieron relaciones causales epidemiológicas entre cáncer de cérvix y las conductas sexuales de riesgo, fue a principios de los ochenta cuando se descubrió la asociación entre VPH y el cáncer de cérvix, además de presentarse otras localizaciones como vejiga, dónde se ha podido demostrar su asociación con la supervivencia.⁵ Posteriormente múltiples estudios identificaron el ADN del VPH en más del 95% de todas las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino, por lo que el VPH es causa necesaria para desarrollar un cáncer invasivo en el cuello del útero.⁶

Las infecciones por el VPH suelen tener un curso silente, la mayoría de las veces se resuelven de forma espontánea, pero, si esta infección viral

persiste, y sobre todo si es por el mismo genotipo, las pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar posteriormente un carcinoma cervical,⁷ sobre todo por los genotipos denominados de alto riesgo, cuya relación causal la describió Harald zur Hausen obteniendo el Premio Nobel en Medicina en 2008. En el año 2003, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) estimó en 655.000 mujeres infectadas por VPH en edades comprendidas entre los 15 y 75 años, de las que 457.000 tenían lesiones de bajo grado o de significado incierto, y 16.000 presentaban lesiones de alto grado, es decir precursoras de cáncer de cérvix .

B. RECUERDO HISTOLÓGICO Y FUNCIONAL DEL CÉRVIX

El cérvix es la porción inferior del útero que protruye en la parte superior de la vagina. Mide 2,5-3 cm de longitud e incluye las porciones vaginal (*portio vaginalis*, ectocérvix) y endocervical. La apertura anatómica del canal endocervical corresponde al orificio cervical externo situado en el centro del ectocérvix. El ectocérvix está revestido por un epitelio escamoso poliestratificado continuo e histológicamente idéntico al de la mucosa vaginal. El endocérvix está revestido por un epitelio mucoso columnar que se invagina en el estroma formando estructuras pseudo-glandulares. La unión de ambos epitelios se conoce como unión escamo-columnar y su situación varía a lo largo de la vida. Cuando se sitúa por fuera del orificio cervical externo, en el ectocérvix, da lugar a lo que se denomina ectopia y está expuesto a las condiciones de la vagina. Con el tiempo, este epitelio columnar situado fuera del canal endocervical se transforma y es reemplazado gradualmente por un epitelio escamoso. Esta zona de epitelio columnar sustituido por epitelio escamoso metaplásico se denomina zona de transformación.

La mayor parte de los carcinomas de cérvix son de tipo escamosos. La zona de transformación es importante porque prácticamente todos los carcinomas escamosos de cérvix, así como sus lesiones precursoras, se

inician de ella. Los carcinomas que se inician del epitelio columnar del endocérnix son mucho menos frecuentes. Dada su situación en el ectocérnix, la zona de transformación se puede visualizar con la ayuda de un colposcopio. Este epitelio escamoso se distingue del epitelio escamoso ectocervical por poseer menor contenido en glucógeno y los límites entre ambos epitelios son muy netos. Las células descamadas se pueden recoger fácilmente y estudiar la microscopio mediante la tinción originalmente descrita por Papanicolau. En el estudio de estos frotis vaginales se pueden detectar las anomalías citológicas de este epitelio y ser confirmadas por biopsias por su fácil accesibilidad. Estas células descamadas son también las más adecuadas para la extracción del ADN del virus del papiloma humano (VPH).

C. LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER DE CÉRVIX

La evidencia epidemiológica asociada a VPH de alto riesgo o carcinogénicos en lesiones preneoplásicas que pueden desarrollar cáncer cervical se han podido comprobar en estudios de series de mujeres con cáncer cervical. En una de las mayores series, identifican ADN de VPH “alto riesgo” en el 99% de los aproximadamente 1000 carcinomas invasivos recogidos de 22 países de todo el mundo.⁶ El último estudio a nivel mundial realizado en 2010 revela la importancia etiológica de infección por uno o varios genotipos de VPH oncogénicos como causa necesaria para desarrollar un carcinoma cervical invasivo.⁸

La terminología empleada para designar las lesiones escamosas precursoras del carcinoma invasor ha ido modificándose a la par que los conocimientos sobre su etiología y comportamiento clínico. En 1961, en el primer Congreso Internacional de Citología Exfoliativa, el Comité de Terminología Histológica para las lesiones de Cérnix Uterino definió el carcinoma *in situ* como “aquellas lesiones que en ausencia de invasión

muestran un epitelio de revestimiento en el que, en todo su grosor, no se observa diferenciación”. El proceso puede afectar a las glándulas cervicales.

El término displasia se reservaba para aquellos casos en los que las células atípicas no afectaban la totalidad del espesor epitelial. Esta clasificación de las lesiones pre-invasivas en dos grupos, carcinoma *in situ* y displasia (leve, moderada o severa) asumía que ambos grupos tenían un curso clínico diferente (y por tanto un tratamiento distinto). La debilidad de esta clasificación residía en el diagnóstico entre displasia severa y carcinoma *in situ* el cual se basaba en la apreciación de la existencia o no de al menos una capa de maduración epitelial. Este hallazgo, como se demostró en varios estudios, estaba sujeto a gran discordancia entre observadores.

La terminología de neoplasia intraepitelial cervical (CIN), fue adoptado por la comunidad científica a partir de 1969 tras los estudios realizados por Richart.⁹ En ellos asume que los cambios previamente diagnosticados como displasia o carcinoma *in situ* correspondían al espectro morfológico de una misma enfermedad y por lo tanto compartían la misma etiología, biología e historia natural.

En años posteriores, la identificación del virus del papiloma humano (VPH) en lesiones precursoras de cérvix definió nuevos términos (condiloma plano, condiloma atípico, infección subclínica por VPH, atipia coilocítica, atipia condilomatosa, y atipia verrucosa), según la presentación clínica.

En la actualidad, la propuesta más aceptada para el estudio citológico es la terminología Bethesda para interpretación de informes, cuyas recomendaciones fueron realizadas en las reuniones de Bethesda de los años 1988, 1991 y 2001.¹⁰ En ellas se definieron que aquellas lesiones diagnosticadas como “neoplasias intraepiteliales cervicales” (CIN1 ,CIN2 y CIN3) representan, en realidad, dos procesos biológicos diferentes. El CIN1 (displasia leve) y las lesiones diagnosticadas como condiloma (plano o

acuminado) representan la fase de infección productiva por VPH y son designados como "lesión intraepitelial escamosa" (SIL) de bajo grado (fig. 1). Mientras que en el CIN2-3 se agrupan para el diagnóstico cito-patológico lesiones intraepiteliales de alto grado (H-SIL).

El L-SIL se asocia a infección productiva por VPH, pero no muestra alteración significativa del ciclo celular del huésped. La mayoría de los L-SIL remiten de forma espontánea y sólo un porcentaje pequeño progresa a H-SIL.

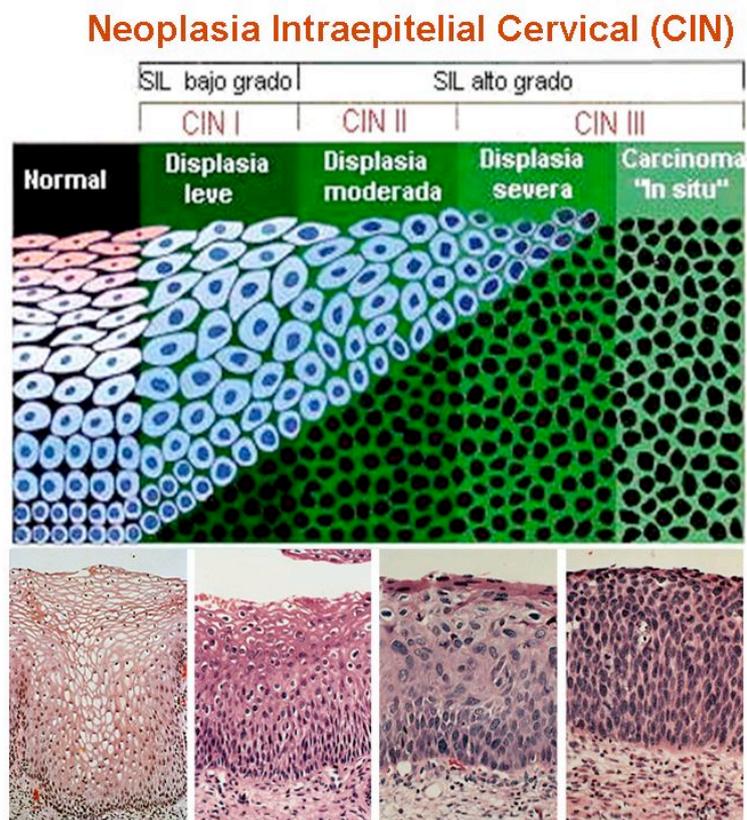


Fig. 1. Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN)

El diagnóstico morfológico de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) fue introducido en los años 70 para demostrar que existían cambios similares en displasias graves y carcinoma *in situ*, clasificando las lesiones en tres grados. Los cambios morfológicos celulares se caracterizan por atipia nuclear con aumento de tamaño, hiper cromasia, presencia de gránulos de cromatina groseros y variación en la forma. Estos cambios nucleares se pueden

acompañar de halos citoplasmáticos que indican alteración del citoesqueleto antes de la liberación del virus hacia el medio ambiente. Las alteraciones nucleares y el halo perinuclear son denominados “*atipias coilocíticas*”. Hoy en día la terminología CIN se aplica para la histología.

La gradación de la lesión en CIN se basa en la expansión o alteración en la maduración de la capa celular inmadura respecto a su localización basal normal. Si las células escamosas atípicas inmaduras están confinadas al tercio inferior del epitelio, la lesión es gradada de CIN1 (o lesión de bajo grado), si se afectan los dos tercios del grosor epitelial se denomina CIN2, y si afecta a todo el grosor epitelial se califica como CIN3.

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

Lesiones de bajo grado (LBG): Condilomas y CIN 1

Lesiones de alto grado (LAG): CIN 2 y CIN 3

Carcinomas microinvasivos

Carcinoma escamoso invasivo

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

Las alteraciones del epitelio si se presentan con crecimiento exofítico, se denominan condilomas acuminados, producidas casi de forma exclusiva

por los VPH 6 y 11. Estas lesiones se constituyen como un crecimiento exacerbado del epitelio con marcada acantosis, formando papilas con ejes conectivos centrales, la queratinización puede estar presente aunque la paraqueratosis e hiperqueratosis no es tan marcada como en las verrugas de la piel genital o de otras localizaciones. La atipia coilocítica es una característica importante que se define por la vacualización citoplásmica y atipia nuclear, pudiéndose observar multinucleación y mitosis. De forma excepcional el crecimiento se produce de forma invertida y simula un carcinoma, en cuyo caso es necesario realizar el diagnóstico diferencial con el carcinoma verrucoso.

Cuando las lesiones de bajo grado son planas pueden estar producidas por cualquier VPH anogenital. En este caso las anomalías nucleares son más marcadas en la capa basal, donde se localizan un mayor número de mitosis. La transición entre el tercio inferior y las capas más superficiales generalmente está bien delimitada. Las células de los dos tercios superficiales muestran diferenciación y orientación adecuada para formar un epitelio estratificado que suele mostrar las alteraciones citopáticas del VPH.

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

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

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

Los casos diagnosticados como CIN2 (displasia moderada) y CIN3 (displasia severa y carcinoma *in situ*) considerados como verdaderas neoplasias intraepiteliales y denominadas LGA, suelen estar producidas por un grupo más reducido de genotipos de VPH (16, 18, 31, 33, etc).⁸ Se caracterizan como los cambios displásicos que alcanzan más del tercio inferior del epitelio o incluso afectarlo en la totalidad del espesor. Se denomina CIN2 cuando las alteraciones ocupan menos de dos tercios del epitelio y CIN3 cuando las alteraciones superan los dos tercios del epitelio o alcanzan la totalidad del espesor del mismo. Es frecuente que se produzca durante este proceso una maduración o aplanamiento del estrato más superficial.

El grado de anomalías nucleares es también más evidente que en la LGA. Las mitosis son más frecuentes, pueden encontrarse en distintos niveles según el grado de displasia y observarse formas anormales como mitosis tripolares. La transición entre LGA y el epitelio normal se puede presentar de forma brusca o más gradual con zonas de LBA entre ambos epitelios.

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

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

Desde Papanicolau hasta nuestros días, la nomenclatura citológica es un tema básico que ha preocupado a los citopatólogos. Si en todas las áreas de la citopatología el uso de una nomenclatura unificada es importante, alcanza el máximo relieve en la citopatología del cérvix uterino. El avance definitivo se produce tras la implantación a nivel mundial del sistema Bethesda para describir las alteraciones citológicas incluyendo nuevos conceptos sobre la infección VPH.

En la actualidad, en el Sistema Bethesda (tabla 1) se sustituye el término neoplasia por el de lesión intraepitelial, dividiéndolo en dos categorías, lesiones de bajo grado que corresponden a lesiones víricas, generalmente autolimitadas y con tendencia a la desaparición espontánea y lesiones de alto grado que corresponden a verdaderos cambios premalignos y por lo tanto con tendencia a la progresión a cáncer.

Tabla 1. Sistema de clasificación Bethesda¹⁰

SISTEMA BETHESDA 2001 (modificado)	
<p>IDONEIDAD DE LA MUESTRA</p> <p>Satisfactorio para la evaluación (se agrega un indicador de calidad: elementos de la ZT, flora, etc.)</p> <p>Parcialmente satisfactorio para evaluación por (se especifica la causa: artefactos, ausencia elementos epiteliales de la ZT...).</p> <p>Insatisfactoria para evaluación (se especifica la causa).</p> <p>RESULTADO/INTERPRETACIÓN</p> <p>Negativa para lesiones intraepiteliales o malignidad</p> <p>MICROORGANISMOS 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>OTROS CAMBIOS NO NEOPLÁSICOS: Cambios reactivos asociados con: Inflamación (incluye reparación típica). Radiación. Dispositivo intrauterino (DIU). Células glandulares post-histerectomía. Atrofia.</p>	<p>RESULTADO/INTERPRETACIÓN (CONT)</p> <p>Anomalías celulares epiteliales</p> <p>- CÉLULAS ESCAMOSAS *Células escamosas atípicas: de significado incierto (ASC-US), no es posible excluir HSIL (ASC-H). *Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (LSIL): VPH y displasia leve / CIN 1. *Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado (HSIL): displasia moderada, severa, CIS / CIN 2 y CIN 3 *Carcinoma de células escamosas.</p> <p>- CÉLULAS GLANDULARES *Células glandulares atípicas: endometriales, endocervicales, NOS. *Células glandulares atípicas probablemente neoplásicas: Endocervical, NOS. Adenocarcinoma endocervical in situ. Adenocarcinoma</p> <p>Otros</p> <p>-Células endometriales en mujer \geq 40 años.</p> <p>TÉCNICAS AUXILIARES: (p.ej. HPV).</p> <p>RECOMENDACIONES: (opcional).</p> <p>NOTAS Y SUGERENCIAS (opcional)</p>

El sistema Bethesda 2001 comprende cambios basados en la experiencia clínica y en avances del conocimiento acerca de la biología del carcinoma cervical. El término diagnóstico se reemplaza por interpretación o resultado del informe citológico, ya que la citología se debe considerar como ayuda para definir un diagnóstico. Así que el diagnóstico final y el esquema de tratamiento de una paciente contempla no sólo el estudio citológico sino la anamnesis, los hallazgos clínicos y otros estudios de laboratorio, así como la interpretación del estudio histológico. El objetivo del Sistema Bethesda siempre ha sido fomentar la comunicación eficaz de los hallazgos citológicos relevantes y el estudio ginecológico a fin de brindar una atención óptima a las pacientes.

Sistema Bethesda para interpretación de informes citopatológicos

Tipo de muestra: para indicar si se trata de un extendido convencional (Papanicolau), una citología líquida u otro tipo de muestra.

Calidad de la muestra:

Satisfactoria para evaluación

Insatisfactoria para evaluación

Interpretación /resultado

Negativo para lesión intraepitelial o malignidad

- Microorganismos
- Otros hallazgos no neoplásicos

Anomalías de células epiteliales

- Células escamosas
 - Células escamosas atípicas
 - De significado indeterminado
 - No se puede descartar HSIL
- Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) (incluye VPH/displasia leve /CIN1).
- Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) (incluye displasia moderada y grave CIN2 CIN3).
- Carcinoma escamoso

Células glandulares

- Atípicas
- Células endocervicales (sin especificar o especificar en comentarios)
- Células endometriales (sin especificar o especificar en comentarios)

Células glandulares (sin especificar o especificar en comentarios)

Atípicas

- Células endocervicales, sugestivas de neoplasia
- Células glandulares sugestivas de neoplasia

Adenocarcinoma endocervical in situ

Adenocarcinoma

- Endocervical
- Endometrial
- Extrauterino
- Sin especificar(NOS)

Negativo para lesión intraepitelial o malignidad

Cuando no hay signos de neoplasia, en las versiones anteriores del Sistema Bethesda (TBS), tanto las infecciones como los cambios celulares reactivos se informaban en el apartado "Cambios celulares benignos", pero estaban separados de la categoría "dentro de los límites normales". A fin de poner énfasis en la naturaleza "negativa" de la interpretación de los cambios reactivos, el Sistema Bethesda 2001 fusiona las categorías "cambios celulares benignos" y "dentro de los límites normales" en una nueva categoría "Negativo para lesión epitelial o malignidad", y la categoría de "Infecciones" ha sido reemplazada por "Microorganismos" debido a que la presencia de algunos microorganismos refleja más una colonización que una infección clínica.

La citología cervical es un estudio de *screening* cuyo objetivo principal consiste en detectar el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y sus precursores. Puesto que no siempre están bien definidos los criterios que ayudan a identificar los cambios celulares reactivos, es probable que se dificulte la reproducibilidad de la interpretación.

Los cambios reactivos se clasifican según se asocie a inflamación, radiación o a dispositivos intrauterinos (DIU).

En general en estos cambios las células aumentan el tamaño aunque no así la relación núcleo/citoplasma. Los núcleos agrandados pueden presentar cambios degenerativos y vacuolización nuclear (fig 2). Otros hallazgos asociados pueden ser la presencia de paraqueratosis típica, hiperqueratosis o metaplasia tubárica.

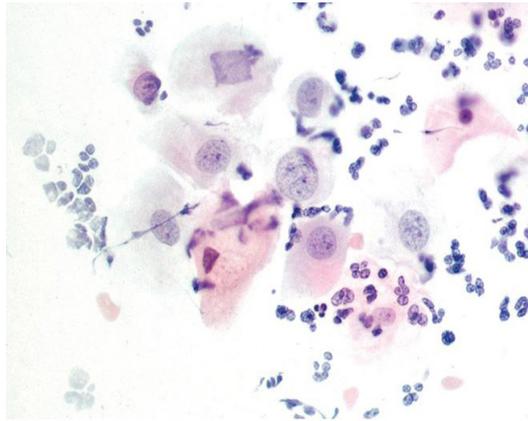


Fig 2. Cambios reactivos

Anomalías de células epiteliales

Células escamosas

1. Células escamosas atípicas (ASC)

El término ASC representa cambios citológicos sugestivos de SIL, que son cualitativamente o cuantitativamente insuficientes para elaborar una interpretación definitiva.¹⁰ Es preciso analizar minuciosamente los hallazgos citológicos sugestivos de cambios reactivos benignos y clasificarlos con criterios como "negativos para lesión intraepitelial o malignidad" siempre que sea posible.

Para elaborar la interpretación de ASC, es preciso que las células examinadas muestren tres características esenciales: (1) diferenciación escamosa, (2) aumento de la relación existente entre el área nuclear y el área citoplasmática (N:C), y (3) hiper cromasia nuclear mínima, cromatina irregular/granular condensada o multinucleación. Es imprescindible hallar

núcleos de aspecto anómalo; sin embargo, los cambios citoplasmáticos que a menudo están asociados a la infección por VPH, como la eosinofilia densa (paraqueratosis) y los halos perinucleares (coilocitosis), deberían impulsar una búsqueda minuciosa de células que justifiquen la interpretación ASC o SIL.

- De significado indeterminado(ASC-US)

Los núcleos tienen aproximadamente entre dos veces y media y tres veces el tamaño del área del núcleo de una célula escamosa intermedia normal (alrededor de $35 \mu\text{m}$). Leve aumento de la relación núcleo y el área citoplasmática. Hiperchromasia nuclear mínima e irregularidad de la distribución cromatínica o de la morfología nuclear (fig 3). Anomalías asociadas a citoplasma eosinófilo denso (paraqueratosis atípica).

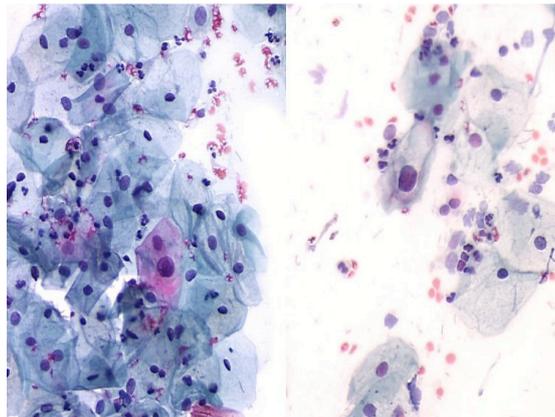


Fig. 3. Atipia escamosa de significado incierto (ASCUS)

- No se puede descartar HSIL (ASC-H)

Las células ASC-H suelen ser escasas, pueden estar aisladas o agrupadas en pequeños fragmentos de menos de 10 células; a veces, en extendidos convencionales, las células pueden observarse en “hilera” o bien dentro del moco. Suelen tener el mismo tamaño que las células metaplásicas y un núcleo entre una vez y media y dos veces y media más grande de lo normal. La relación N:C puede ser similar al de HSIL (fig 4).

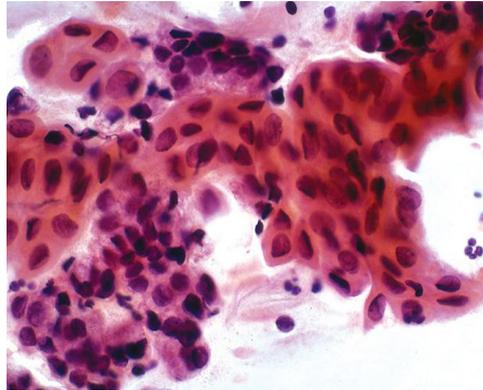


Fig 4. Atipias de células epiteliales escamosas sin descartar lesión de alto grado (ASC-H)

2. Lesión escamosa intraepitelial (SIL)

- De bajo grado (LSIL) (incluye VPH/displasia leve /CIN1)

Los cambios de células escamosas asociadas a la infección por VPH abarcan la “displasia leve” y “CIN1”. Las células se observan aisladas o en láminas. Los cambios citológicos suelen estar limitados a las células que tienen citoplasma maduro o superficial. Las células tienen un tamaño en general grande y citoplasma maduro, bastante abundante y bien definido. El agrandamiento nuclear que supera el triple del tamaño del área del núcleo de una célula intermedia normal genera un leve aumento de la relación N:C. Se observan grados variables de hiper cromasia nuclear acompañados de variabilidad de tamaño, número y morfología nucleares. Es frecuente encontrar binucleación y multinucleación. El contorno nuclear a menudo es algo irregular, pero puede ser liso. Los halos perinucleares (coilocitosis) es una característica propia pero no indispensable en lesiones de bajo grado (fig 5).

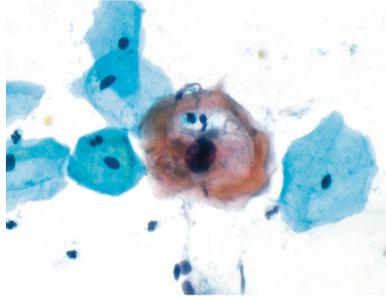


Fig 5. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL)

- de alto grado (HSIL)

Los cambios citológicos afectan a células más pequeñas y menos maduras que las lesiones de bajo grado (LSIL). Las células pueden estar aisladas o en agregados pseudosincitiales. Los grupos hiper cromáticos deben ser evaluados minuciosamente .

El tamaño general de las células es variable y la hiper cromasia nuclear se acompaña de variaciones de tamaño y morfología nuclear. El grado de hipertrofia nuclear es más variable que el que presenta en lesiones de bajo grado. La cromatina puede ser laxa o granular en grumos (fig 6).

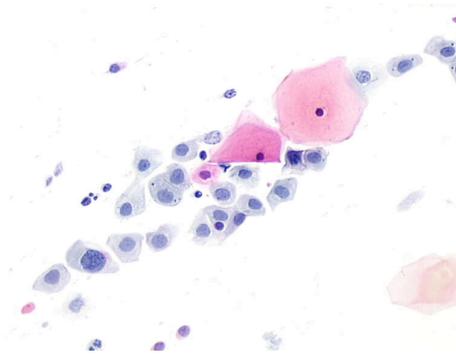


Fig 6. Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL)

3. Carcinoma escamoso

+ Queratinizante: es probable hallar un número relativamente bajo de células, a menudo aisladas y, con menos frecuencia, en conglomerados. Es característica la variación considerable de tamaño y morfología celulares, y

suelen hallarse células fusiformes que a menudo contienen citoplasma eosinófilo denso. Los núcleos también pueden tener una variabilidad importante de tamaño, las membranas nucleares pueden tener configuración irregular y es frecuente hallar núcleos hiper cromáticos. Pueden encontrarse cambios queratósicos asociados pero su presentación no basta para elaborar la interpretación de carcinoma si no se hallan anomalías nucleares (fig 7).

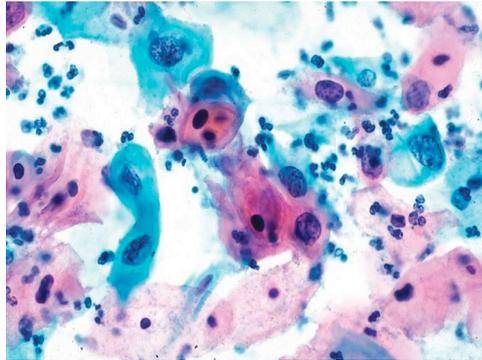


Fig 7. Carcinoma escamoso

+ No queratinizante: las células pueden estar aisladas o dispuestas en agregados sincitiales y los bordes celulares no están bien definidos. Los núcleos presentan distribución muy irregular de la cromatina aglutinada en grumos y es frecuente hallar diátesis tumoral (fig 8).¹⁰

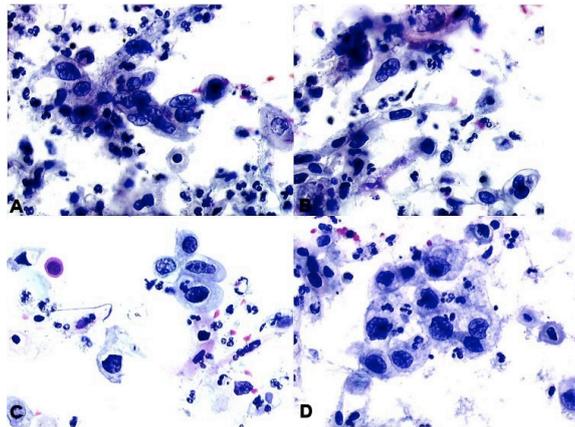


Fig 8 carcinoma escamoso no queratinizante

D. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO(VPH)

1. Estructura genómica

Los VPH son virus de pequeño tamaño (aproximadamente 55 nm) de la familia papoviridae capaces de inducir diversas lesiones epiteliales proliferativas (papilomas). Los virus de esta familia presentan una gran especificidad de especie.¹¹

Estos virus están constituidos por una cápside proteica icosaédrica y un genoma compuesto por una doble cadena circular de DNA, cuya longitud aproximada es de 8000 pares de bases. En dicho genoma se distinguen: la región reguladora codificante de productos virales denominados *marcos de lectura abierta (ORF)*, de la que existen 6 ó 7 regiones tempranas E1-E6 (del inglés *early*) tempranas y la región tardía con los genes L1 a L3 (del inglés *late*) que codifica proteínas estructurales de la cápside y que se expresa al final del ciclo vital, necesarias todas para la replicación viral. También existe la región no codificante de aproximadamente 1000 pb, que se denominan “*upstream regulatory region*” (URR) o “*long control region*” (LCR), que contienen las secuencias que regulan la expresión de las ORFs y que contienen el origen de la replicación viral. Se sitúa entre el final de L1 y del comienzo de E6 (fig 9) .

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV):

Estructura genómica y función de las proteínas virales

Familia papoviridae ADN de doble cadena circular: 7800-7900 pb Sin envoltura Diámetro aprox. 55nm Cápside icosaédrica	
Regiones codif. (ORFs) 6-7 tempranas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 E1 Replicación del ADN viral y mantenimiento del plásmido E2 Regulación de la transcripción viral E4 Unión a las citoqueratinas E5 Transformación celular. Interacción con FC E6 Transformación celular, unión a p53 y su degradación E7 Transformación celular, unión a pRb y activación de la transcripción celular	
2 tardías L2 Proteína de menor tamaño de la cápside L1 Proteína de mayor tamaño de la cápside	L1 y L2
Región no codif. (URR) Final L1 y comienzo E6	

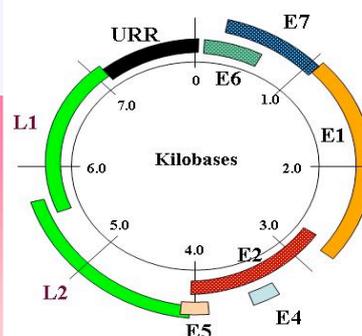


Fig 9. Estructura genómica del VPH

En orden distal de las ORFs son:

E6 y E7 codifican paraproteínas que son capaces de inducir proliferación celular y su transformación. Se expresan en todos los VPH que están asociados a patología, incluyendo lesiones de bajo grado e interfieren directamente con proteínas claves de la maquinaria del ciclo celular, teniendo significación pronóstica y terapéutica.^{12;13}

E6 codifica una oncoproteína de aproximadamente 150 aminoácidos que contiene dos juegos de repeticiones de cisteína que forman un dedo de zinc que es importante para su función. La función biológica de mayor trascendencia del E6 identificada hasta el momento atañe a la inactivación de la proteína supresora de tumores p53.¹⁴ Las proteínas E6 de VPHs de alto riesgo también interaccionan con una proteína que se une al calcio, la ERC-55 y la paxilina, una proteína del citoesqueleto, si bien la importancia de estas interacciones están por dilucidar.

E7 codifica una oncoproteína de aproximadamente 100 aminoácidos con un dominio amino terminal que tiene una secuencia y función similar al E1A adenoviral, al antígeno de gran tamaño T del poliomavirur SV40, y a la ciclina D1 celular. También posee un dominio carboxi-terminal que contiene un dedo de zinc como el de E6. La función más importante de la proteína E7 de los VPHs de alto riesgo es la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRB). Además es capaz de formar complejos con varias proteínas de la célula huésped, incluyendo las proteínas p21 y p 27, las cuales tienen un importante papel regulador durante el crecimiento y la diferenciación epitelial.^{15;16} En determinadas circunstancias, posiblemente a través de la interacción con p21, se ha observado, que la E7 es capaz de inhibir las funciones de p53. También aumenta los niveles de las ciclinas A y E de las fases del ciclo celular G1-S y estimula la actividad de la kinasa dependiente de la ciclina CDK2 (fig 10).^{17;18}

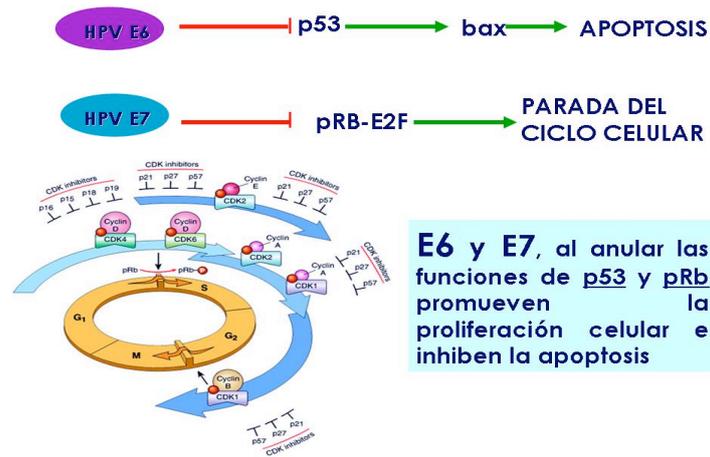


Fig 10. Funciones de las proteínas E6-E7

Las proteínas **E1** tienen una actividad helicasa importante para el mantenimiento y la replicación genómica viral.

E2 codifica una proteína llamada E2´TR (de 28-31 KDa) que tiene efectos positivos y negativos sobre la transcripción de los demás ORFs. Está poco conservada según algunos de los genotipos, pero existen secuencias que definen dominios estructurales, cuyo grado de conservación es muy alto.¹⁹ Los lugares están formados por unas secuencias palindrómicas ACCGN4CGGT repetidas en tándem. En la mayoría de los VPH se han encontrado al menos cuatro de estos “motivos”. El producto completo de E2 puede actuar como activador o represor de la transcripción y esto depende de la localización de los puntos de unión respecto al promotor, así como estar involucrada en la segregación del genoma y en la encapsulación. No ocurriendo lo mismo en el caso de E6, cuya función es siempre represora de la transcripción.¹⁸

E4 codifica una proteína que se encuentra de forma más abundante en las verrugas y es mayoritariamente expresada en las células de estratos superficiales diferenciadas. Algunas formas de E4 codifican proteínas que se unen y disgregan la red de queratina citoplasmática, al unirse a la filagrina,

produciendo una vacuola citoplasmática en las células que se han diferenciado apropiadamente.

E5 parece tener actividad mitogénica y potenciar los efectos de E6 y E7. Codifica una pequeña proteína que parece unirse a diferentes proteínas de la membrana huésped, incluyendo receptores de factores de crecimiento. También contiene unas secuencias reguladoras 3 poliadeniladas para todos los genes de la región E. Su papel en la carcinogénesis es controvertido porque su expresión frecuentemente se pierde en el proceso de integración viral, pero se piensa que potencia los efectos de E6, E7.²⁰⁻²²

E8-ERC codifica una proteína de reciente descripción que consta de la fusión del producto de un pequeño ORF E8 con parte de la proteína E2. Esta proteína de fusión tiene un tamaño de unos 20 kDa y es capaz de reprimir la replicación del ADN viral así como su transcripción, por ello se cree que juega el papel más importante en el mantenimiento de la latencia de viral observada en las células basales del epitelio infectado.²³

Las regiones tardías **L1** y **L2** codifican proteínas de la cápside viral. L1 codifica la proteína de mayor tamaño y está altamente conservada entre los distintos genotipos de VPH. También contiene los determinantes antigénicos para la reacción cruzada entre los diferentes tipos de VPH y está altamente glicosilada. L2 codifica una proteína de menor tamaño que es altamente variable entre los genotipos.

2. Clasificación

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.⁸

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 Villiers en el año 2004.¹¹ 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 “género” los cuales se usan de forma sistemática por todos los organismos biológicos y frecuentemente se aplica en virología.
- Poder investigar entre la clasificación taxonómica y biológicas y las propiedades patológicas del virus.

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.²⁴⁻²⁶ 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 de la “*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.

Criterios para *género y especie*

Esta clasificación se establece comparando la extensa secuencia de los virus usando L1 y ORF de 96 tipos de papiloma virus humanos, y 22 papilomavirus animales, estableciendo la clasificación con los siguientes criterios:

- 1- El grupo principal de tipos de VPH (por ejemplo los genitales), que previamente fueron denominados “supergrupos”. Para esta taxonomía se introduce el término “género”. La diferencia reside en que comparten menos del 60% de la secuencia identificada en L1 y ORF. Taxonómicamente se denominan: alfa, beta, gamma, delta, épsilon, que corresponden a genotipos humanos del virus del papiloma.
- 2- Los grupos de orden menor de VPH (por ejemplo VPH-6, 11, 44, 55), llamados “grupos” , “subgrupos”, o “agrupaciones menores”. En la nueva clasificación se denominan “especies”. Así cada especie dentro del género comparten entre 60% y 70% de identidad de nucleótidos.
- 3- Los tradicionalmente denominados tipos de VPH están dentro de las especies que comparten entre 71% y 89% de identidad de nucleótidos.

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, 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 especies son los número 9 que se agrupan 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 (fig 11).

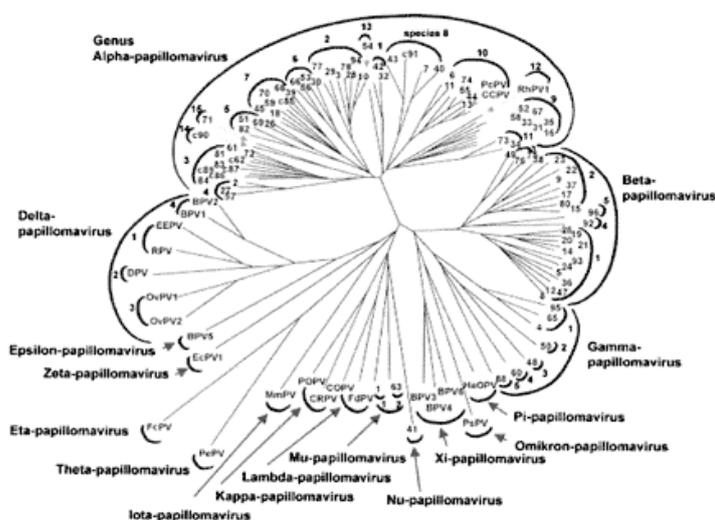


Fig 11 Clasificación taxonómica de Villiers

La clasificación epidemiológica realizada por Muñoz en el año 2003 está basada en un trabajo sobre once estudios en el que participan nueve 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, 73, y 82). Hay tres genotipos (26, 53, y 66) que son considerados como probable alto riesgo. Doce genotipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) son considerados como bajo riesgo y tres genotipos (34, 57, y 83) se asocian a riesgo indeterminado.²⁷

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.

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 (tabla 2).

Tabla (2) Clasificación epidemiológica Muñoz 2003

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

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 que exploraban la asociación entre infección por VPH y cáncer de cérvix 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).^{28;29} El 6 y 11 son responsables de verrugas y condilomas genitales. 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, sobretodo en mujeres jóvenes, y otros presentes en lesiones invasivas como son 33, 35, 52 y 58.⁸

3. Prevalencia de la infección por el VPH

El VPH, representa la infección de transmisión sexual más frecuente. A escala mundial, es el responsable de un 5,2% de todos los tumores humanos, correspondiendo un 2,2% a países desarrollados y un 7,7% a países en vías de desarrollo.^{30;31} Se estima la existencia de 310 millones de portadoras de VPH, de las cuales 27 millones corresponderían a condilomas acuminados, 490.000 cáncer de útero y 68.400 casos de cáncer de vulva, vagina, pene, ano y cavidad orofaríngea.³⁰

El 70-80% de las mujeres y los hombres sexualmente activos, han estado expuestos al virus en algún momento de su vida.³² Esta infección evoluciona de forma natural hacia la curación espontánea en más del 90% de los casos. 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 los individuos.^{33;34} En la tercera década la prevalencia disminuye considerablemente y a partir de los 35 años se mantiene estable en unos valores próximos al 5%.³⁵ Estos datos se han consolidado en un amplio metaanálisis realizado por Silvia Sanjose y colaboradores, que incluyó 78 estudios internacionales. Este metaanálisis concluye que la prevalencia de VPH en la población femenina es inferior al 10% en países desarrollados y ligeramente superior al 15% en países en vías de desarrollo.³⁶

En España se han realizado varios estudios entre 1992 y 2006 que analizan la prevalencia de infección por VPH de alto riesgo oncogénico en

mujeres con citologías cervico-vaginales normales, en los cuales la prevalencia osciló entre 3,4% y el 17% según sea la región, o si la población fue autóctona o inmigrante, siendo la prevalencia más alta en este último caso, aunque en ambas coinciden como genotipos más frecuentes el 16 y el 18.³⁷

En un estudio realizado en Reino Unido sobre 1075 mujeres de edades similares, se detectó un riesgo acumulado de cualquier infección por VPH en tres años del 44%, elevándose al 60%, en 5 años, siendo el VPH 16 el tipo más frecuente.³⁸

La prevalencia del VPH de alto riesgo, tiene una gran variabilidad de distribución a lo largo de todo el mundo, pero en la población general se correlaciona muy bien con las tasas de incidencia de cáncer de cuello de útero en todas las regiones del mundo.³⁹ Según los datos de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), la prevalencia de VPH varía según las áreas geográficas, siguiendo una distribución similar a la prevalencia de cáncer de cérvix; la distribución de los tipos de VPH relacionados en los casos que han desarrollado carcinoma cervical en estudios internacionales que abarcan 38 países de los cinco continentes, confirma el dato de la distribución universal los genotipos (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) de VPH más frecuentes asociados a cáncer cervical, con un papel predominante de los genotipos 16 y 18, así como del 45 en la etiología de adenocarcinoma cervical.⁸

4. Transmisión de la infección por el VPH

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. Aunque se presume que la infección se produce mediante desgarros microscópicos de la mucosa, es plausible que intervengan otros mecanismos específicos de la zona de transformación cervical.⁴⁰

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 zona 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 periodo 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 a 100 copias).⁴¹ (Fig 12)

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV):

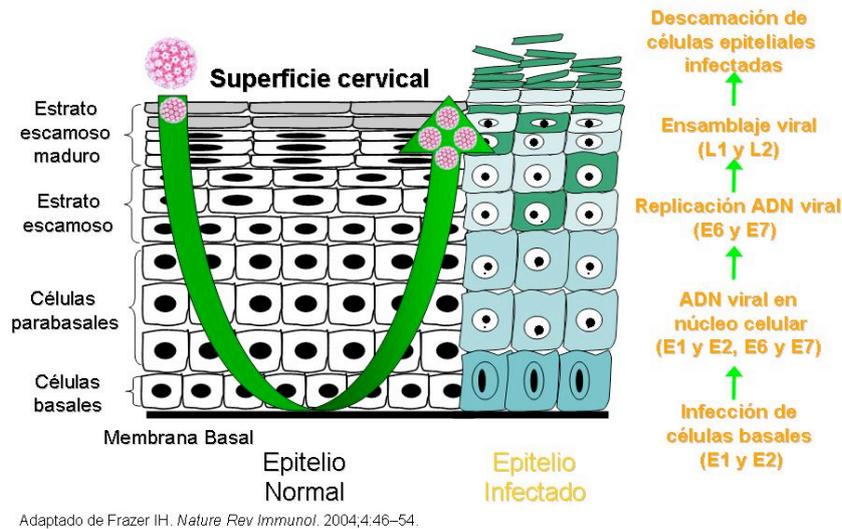


Fig 12. Mecanismos de transmisión y replicación viral

El ciclo vital de los VPHs se encuentra estrechamente ligado al programa de diferenciación de su célula huésped. El epitelio escamoso está compuesto por 20 a 30 capas de células, de las cuales solamente la capa basal más interna se divide de forma activa. Los VPHs al igual que otros virus, aprovechan la dinámica celular para replicarse, y en el cuello 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. En las capas superiores, donde el epitelio es diferenciado, el virus se amplifica sin replicación celular, llegando a alcanzar 1000 copias del 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. 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.⁴² El virus infecta la célula, produciendo lesiones en un periodo 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.³² 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.⁴³

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 del 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 en tracto genital inferior. El VPH se implica también en la etiología del cáncer anal, vulvar, vaginal, carcinomas de cabeza y cuello. De los más de 100 genotipos de VPH asociado a infecciones, aproximadamente 40 se asocia a infecciones del tracto genital femenino.^{11;44}

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.⁴⁵ Las células de Langerhans son las encargadas de presentar los antígenos virales a los queratinocitos, produciéndose una respuesta inmune contra la infección.⁴⁶

Cofactores de transmisión

Las características histológicas y de localización de la zona de transformación escamoso-columnar en el exocérnix, sobre todo , de las mujeres jóvenes pueden explicar el mayor riesgo de infección entre las mujeres que inician a edades tempranas la actividad sexual.

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

En este sentido, se ha puesto de manifiesto el efecto protector en la mujer de la circuncisión masculina, favoreciéndose la disminución de la infección y transmisión viral, ya que el epitelio queratinizado aumenta la resistencia a la entrada viral. La circuncisión no sólo reduce en el hombre el riesgo de infectarse por el VPH, sino que además, las mujeres monógamas

que tienen relaciones con un varón promiscuo circuncidado tienen un riesgo significativamente menor de presentar un cáncer cervical.⁴⁷

El posible papel del preservativo como profiláctico de la transmisión del VPH es controvertido;⁴⁸ admitiendo que el uso correcto del preservativo durante todo el contacto sexual puede actuar como una barrera, disminuyendo el contagio.

5. Duración de la infección por el VPH, aclaramiento y persistencia

La mayor parte de las infecciones por el VPH son asintomáticas y se producen de forma transitoria, desapareciendo entre los 12 y 18 meses, con un aclaramiento total del virus en el transcurso de 24 meses.⁴⁹

Las infecciones de la mucosa cervical se denominan latentes, cuando no producen lesión celular, y sólo son detectables por técnicas específicas de detección del ADN viral, ya que aún no hay signos morfológicos de acción viral.⁵⁰

Cuando el virus produce lesión celular, puede expresarse clínicamente como lesiones genitales asociadas a genotipos de bajo riesgo (6,11,40,43,44,54,61,70,72,81,CP6108), siendo el 6 y 11 el 80% de los causantes de los condilomas acuminados, aunque no se pueden excluir como posibles agentes carcinogénicos.

Los VPHs de alto riesgo oncogénico, sobre todo los genotipos 16, 18 y 45, pueden iniciar la alteración celular con lesiones escamosas de bajo grado (LSIL), y con un curso clínico silente, pero pueden progresar a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Hay genotipos de alto riesgo, como el

45, que no se suele relacionar con lesiones de bajo grado, pero si con carcinomas invasivos de aparición temprana.⁵¹

Si la infección persiste y no se aclara el virus, estas pacientes pueden desarrollar un carcinoma de cérvix,⁷ aunque esta progresión sólo ocurre aproximadamente en un 1 % y suelen relacionarse con la presencia de genotipos de alto riesgo sobre todo 45, 16 y 18 si se presentan como infecciones únicas.⁵¹

La duración media de la infección por VPH es variable, según los distintos estudios pueden oscilar desde 6 a 24 meses. Por lo general, los virus de alto riesgo, tienen una persistencia de mayor duración que los de bajo riesgo.⁵² 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.

En el seguimiento clínico es más frecuente el aclaramiento de la infección que la persistencia, sin haberse establecido un acuerdo consensuado del tiempo que ha de transcurrir para considerar una infección como persistente. En la práctica clínica, se define la persistencia como la detección del mismo genotipo viral en dos o más determinaciones realizadas en un periodo de tiempo que oscila de uno a dos años. La persistencia de la infección durante seis meses suele ocurrir en el 50% aproximadamente de las mujeres infectadas, y tras 5 años de seguimiento solo persisten un 7%.²⁹ 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.³²

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 (H SIL: CIN2 y CIN3) y cáncer invasivo.⁵³⁻⁵⁵

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.⁵⁶ Se ha observado que el 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%.⁵⁷ La probabilidad de remisión es menor en edades más avanzadas.⁵⁰

Los estudios de identificación y genotipado parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por el VPH precede a la remisión de los cambios citológicos.⁵⁰ En estudios de persistencia y aclaramiento realizado sobre citologías con atipias citológicas, 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, según la secuencia temporal que sigue la infección por VPH (fig13).

Para disminuir la persistencia, algunos estudios sugieren que el uso del preservativo facilita el aclaramiento del VPH y la remisión de las lesiones intrapiteliales del tracto genital, por lo que es recomendable su uso en estos casos. Así mismo, se ha comprobado que en las mujeres afectadas por el

VPH, el riesgo de cáncer invasivo disminuye si tienen una historia adecuada de cribado citológico.⁵⁸

La resolución de la infección parece dar un cierto grado de protección respecto a la reinfección para el mismo genotipo de VPH con cierto grado de inmunidad cruzada entre otros tipos virales. Otros factores para la progresión neoplásica incluyen el uso de anticonceptivos orales, alta paridad y hábitos tóxico, dietas pobres en frutas y verduras, así como coinfecciones de transmisión sexual como Chlamidias y virus del herpes simple pueden ayudar a la progresión.⁵⁹

RELACIÓN ENTRE HPV-SIL-CARCINOMA

• Secuencia temporal

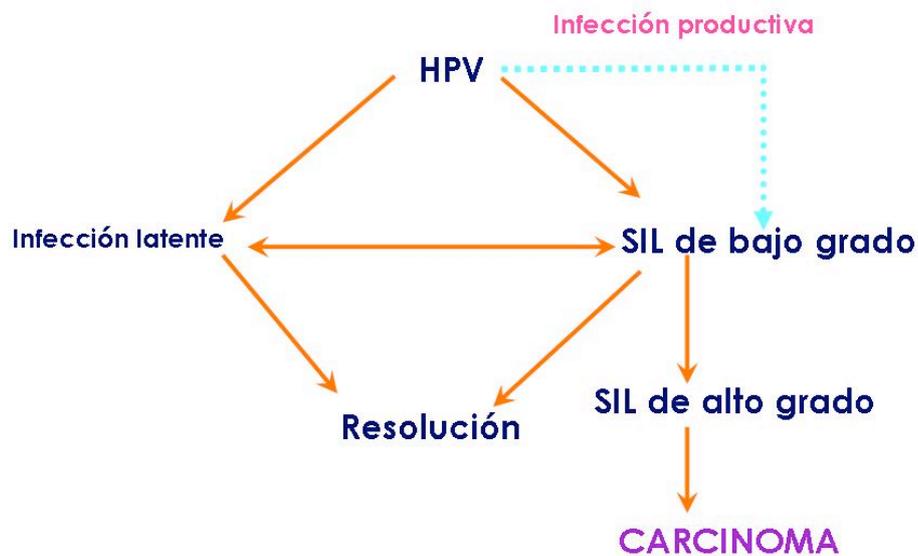


Fig. 13 Secuencia temporal Infección viral-SIL-Carcinoma

6. Factores de riesgo para la infección por VPH

Si bien la infección viral es causa necesaria para poder desarrollar una lesión preinvasiva y de forma posterior un carcinoma, es cierto que no en todas las mujeres infectadas se desarrolla una transformación neoplásica; así que tienen que existir otros factores exógenos, endógenos, características virales, respuesta inmune y una susceptibilidad genética que en conjunción con la infección por VPH puedan determinar esta progresión.⁶⁰

a) factores genéticos

Se han realizado múltiples estudios que indican que aspectos genéticos juegan un papel en la oncogénesis, sin dejar claro si la infección por VPH induce mutaciones genéticas o si algunos individuos tienen más susceptibilidad a la transformación celular inducida por el virus a razón de la existencia de polimorfismos genéticos. La naturaleza causal y el mecanismo por el cual el gen de la célula huésped inicia la regulación de la expresión oncogénica del VPH y previene una inmortalización celular inducida por el virus, aún es desconocida. Se han asociado algunas mutaciones con la oncogénesis (ácido retinoico receptor (RARA), polimorfismos de p53 (TP53), polimorfismos de interleuquina (IL)-10(IL10), gen metilendetetrahidrofolato reductasa (MTHFR), loci susceptibilidad EVER1 y EVER2 (TMC6 y TMC8), gen WAF1(CDKN1A)).^{61;62}

Aunque los genes del sistema HLA se han investigado de forma más extensa, se necesitan mas estudios acerca de los mecanismos de estos procesos que contribuyen a la asociación entre polimorfismos genéticos del sistema HLA y la susceptibilidad de cánceres asociados al VPH.⁶³

b) Factores virales

El genotipo viral es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preinvasiva, siendo los genotipos 16 y 18 los que presentan un mayor riesgo de progresión. Concretamente el VPH 16 presenta un riesgo absoluto de diagnóstico de cáncer de aproximadamente el 40% a los 3-5 años tras infección persistente (71,72,73).^{64;65}

Las mujeres infectadas por más de un genotipo de VPH tienen un riesgo total mayor de desarrollar un cáncer que aquellas infectadas por un genotipo, pero aún no está claro la suma de riesgos.⁶⁶ Se ha comprobado que las mujeres previamente infectadas por el genotipo 16, son más susceptibles de infectarse por otros genotipos como el 58. Además se ha determinado mayor carga viral de genotipo 16 cuando se presenta como multiinfección que cuando la infección es sólo por este genotipo, por lo que aún no hay nada claro sobre si la multiinfección actúa como una acción viral sinérgica o al contrario como competitiva para la infección y desarrollo de lesiones.⁶⁶

El VPH 16 tiene una consideración especial en los programas de prevención ya que causa la mitad de los casos de cáncer de cérvix en todo el mundo y es el principal tipo carcinogénico en cada país estudiado,⁶⁷ siendo este genotipo el más común de la población general, ya que se encuentra aproximadamente en el 20% de infecciones entre mujeres con citología normal,⁶⁸ el 20% entre mujeres con ASCUS, el 26% con lesiones de bajo grado y un 45% con cambios de alto grado, aunque no produzca más anomalías citológicas que otros genotipos de alto riesgo.⁶⁹

El VPH 16 estudiado de forma prospectiva persiste una media de tiempo más prolongado que cualquier otro genotipo, así como se asocia su persistencia al desarrollo de lesiones precancerosas.⁶⁹

El VPH 18, proporcionalmente, se ha asociado más a adenocarcinomas, así como el VPH 45 se asocia en mayor proporción a lesiones precancerosa y a carcinomas invasivos de aparición temprana.⁷⁰

Los ocho genotipos de alto riesgo, asociados a neoplasia más comunes son el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, y, 58, con diferencias en la distribución por regiones. El genotipo 33 es más frecuente en Europa mientras que los genotipos 58 y 52 son los más frecuente en Asia. El uso notable del análisis secuencial para la identificación del genotipo ha demostrado en estudios de metaanálisis, que los genotipos de alto riesgo se asocian en multiinfecciones del epitelio cervical, con una ligera disminución de la infección por un solo genotipo, como el 16. Cuando se producen infecciones por el genotipo 45, se ha podido comprobar que desarrolla lesiones preinvasivas en mujeres más jóvenes que cuando estas lesiones tienen como agente causal el genotipo 16.

Los VPHs de bajo riesgo, suelen producir infecciones por un solo genotipo y estas no suelen desarrollar lesiones de alto grado o invasivas, sobre todo el genotipo 6, a no ser que estén asociadas a genotipos de alto grado.⁸

Los genotipos 16, 18 y 45, tienen una integración mas efectiva en el genoma humano que otros genotipos, por lo que pueden desarrollar de forma más rápida lesiones de alto grado.⁷¹

Prácticamente los carcinomas invasivos de cuello de cérvix, de presentación insidiosa como habíamos expuesto anteriormente, suelen ser positivos para VPH 45, lo que indica una integración en el genoma humano de forma rápida y un tiempo de progresión más corto para el desarrollo de carcinoma, la mayoría de las veces sin pasar por estadios preinvasivos.²⁹

Otros genotipos clasificados filogenéticamente como oncogénicos son 26, 30, 67, 69 y 82 aunque no se sabe con exactitud el mecanismo de carcinogénesis asociado por su escasa evidencia epidemiológica.

c) Factores medioambientales

La transformación maligna secundaria a factores ambientales está bien establecida y documentada para algunos tipos de cánceres, sin embargo no están tan claros estos factores en relación a la oncogénesis del VPH, ya que no hay un modelo animal para poder confirmar epidemiológicamente esta vinculación.

Hay factores de riesgo asociados a la adquisición del virus, como la exposición a parejas sexuales de alto riesgo o promiscuas, el elevado número de parejas sexuales, la falta de higiene genital, no utilizar métodos barrera (uso del preservativo) durante la relación sexual o la falta de circuncisión en el varón.⁶⁰

-La *edad de inicio de las relaciones sexuales* es un conocido factor de riesgo. La prevalencia de VPH más alta comprende las edades inmediatas al inicio de las relaciones y responde a los patrones de comportamiento sexual de la comunidad.⁵³ En grupos de edad de 15 a 25 años, si tienen compañeros sexuales distintos, la prevalencia puede llegar a ser del 30 al 40%. Después de este pico, sigue una disminución muy marcada, que se estabiliza en edades de 25 a 40 años en un 3-10%, interpretándose esta cifra como una medida indirecta del número de mujeres portadoras crónicas de la infección viral, y por tanto, del grupo de alto riesgo para progresión neoplásica. En algunas poblaciones se ha observado un segundo pico de prevalencia en mujeres postmenopáusicas, postulándose que fuera el reflejo de una reactivación de la infección latente y que se asociaría a la reducción fisiológica de la inmunidad natural con la edad.⁶³

-*Coinfecciones*. *Chlamydia trachomatis* parece ser un cofactor que actúa por inducción de inflamación crónica y metabolitos mutagénicos.

-*Anticonceptivos hormonales*: Existe una relación a largo plazo entre la infección por VPH y el uso prolongado de anticonceptivos, sobre todo tras diez años de tratamiento ya que se produce un cambio en la respuesta inmunitaria local. Se estima que el riesgo de infección disminuiría después de ocho años de suspenderlos.⁷²

Otros cofactores implicados en la transformación neoplásica incluyen los siguientes: otras enfermedades de transmisión sexual, obesidad, exposiciones a radiaciones ionizantes, alteraciones hormonales, hábitos tóxicos y dieta.

7. Mecanismos de oncogénesis y respuesta inmunitaria del huésped

a) Interacción virus huésped. Inmunidad de la infección VPH

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 de 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 los linfocitos 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), 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.

En términos generales, tras la primera infección de las células del epitelio cervical por VPH se desencadenan una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células “*natural killer*” (NK), 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, sin duda, mecanismos de inmunidad específica.

En el epitelio cervical existen células específicas con capacidad de actuar como presentadoras de antígenos, son las células reticulares 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. 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- γ 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 y B deberán reconocer a las células infectadas, ahora 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.

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.^{73;74}

b) Mecanismo de evasión tumoral, persistencia de la infección viral

Muchos virus son capaces de mantener infecciones a largo plazo sin efectos citopáticos aunque con producción de viriones, bien de forma crónica o bien con reactivaciones productivas intermitentes. El patrón de infección, crónica o latente, y la aparición de brotes con efectos citopáticos, va a ser totalmente dependiente de las condiciones celulares del huésped. La persistencia de la infección viral requiere la evasión de la detección y eliminación de las células virales por el sistema inmune.

Estos procesos de evasión pueden ocurrir por diferentes vías; en ciertos casos los virus presentan antígenos de superficie muy variables que conducen a la síntesis de un exceso de anticuerpos, no neutralizantes, que pueden llegar a interferir con los que sí tienen esa capacidad de neutralización.

Se ha observado otro mecanismo de evasión en ciertos tumores en los que la respuesta inmunitaria se evita mediante la depleción de la expresión de moléculas del MHC. Este mecanismo de evasión se evidencia, fundamentalmente, en aquellos tumores en los que no es posible mimetizar la presencia de antígenos de superficie por ser necesarios para el mantenimiento del fenotipo tumoral.

Muchas infecciones víricas toman como diana a células inmunocompetentes como CD4+T y células de Langerhans, comprometiendo así la eliminación de la infección por alteración de los mediadores en el montaje de la respuesta inmune. En verrugas genitales se ha observado una disminución notable del número de células de Langerhans, con la consiguiente disminución de la capacidad de presentación antigénica. También se han constatado importantes disminuciones en la actividad de las células NK, con funciones de inmunidad inespecífica, en lesiones premalignas y malignas.^{73;74}

Como se ha explicado en puntos anteriores, los VPHs, infectan las células basales del epitelio cervical y aprovechan el proceso de diferenciación del epitelio para sintetizar las proteínas que le permitirán ensamblar nuevas partículas víricas. Las células epiteliales infectadas activan su mecanismo de defensa celular consistente en una revisión de la secuencia del ADN antes de dividirse. Este proceso ocurre durante una fase del ciclo celular y está dirigido por una cascada de proteínas entre las que destacan la p53 y la proteína Rb. Cuando la célula localiza el ADN viral, en un proceso perfectamente regulado, intenta reparar el error y dado que este ADN es excesivamente grande como para ser eliminado, p53 y Rb dirigen a la célula infectada a una “muerte celular programada” por apoptosis, evitando así que esta célula sirva de propagadora de la infección. Los tipos de VPH-AR, se protegen de este mecanismo celular sintetizando unas proteínas que bloquean este sistema de defensa celular. Los genes E6 y E7, transcriben un producto cuya traducción resultará en la producción de las proteínas E6 y E7 que respectivamente serán capaces de bloquear a p53 y Rb del ciclo celular y protegerse de la muerte de la célula por apoptosis, pudiendo de este modo seguir utilizándola como centro de producción de partículas virales. Por esto E6 y E7 deben considerarse, a todos los efectos, oncogenes virales.⁷⁵ El proceso de bloqueo de p53 y Rb por las proteínas E6 y E7, no tendría mayor problema si no resultase en una inmortalización celular. Como consecuencia del bloqueo del sistema de reparación de errores, la célula no solamente es

incapaz de eliminar el ADN viral, sino que también se ve imposibilitada para arreglar errores intrínsecos al ADN celular, de modo que va acumulando alteraciones genéticas y además, como el proceso de apoptosis también se ha bloqueado, se convertirá en una célula inmortalizada con ADN en progresiva decadencia, es decir, en una célula con fenotipo neoplásico.

Parece claro, que el mecanismo de oncogénesis por VPH comienza con la expresión de E6 y E7 que bloquean a p53 y Rb y que inmortalizan a la célula comprometiendo, con ello, la funcionalidad de su ADN; sin embargo, ciertos experimentos han demostrado que la expresión basal de E6 y E7 en los VPHs es muy baja ya que la proteína E2, por medio de la región reguladora URR mantiene prácticamente silenciada la expresión de las mismas. Ante esto, únicamente una infección con gran cantidad de virus sería capaz de producir las suficientes unidades de E6 y E7 como para iniciar este proceso. Efectivamente, las infecciones con alta carga viral, en las que el sistema inmune no es competente para eliminar la infección tienen un riesgo más alto de transformación neoplásica. Sin embargo, se ha demostrado que ciertas infecciones persistentes con baja carga viral, generan un fenotipo tumoral efectivo. La demostración de que en la mayoría de los carcinomas el ADN viral estaba fragmentado e integrado en el genoma celular, permitió contestar a esta cuestión. En la mayoría de los casos, una porción del ADN viral se fragmentaba por la región E2, perdiendo ésta su capacidad de actuar sobre URR y dar la orden de que ésta mantenga reprimida la expresión de E6 y E7, de este modo, una pequeña cantidad de virus estará desregulado y producirá grandes cantidades de proteína E6 y E7 que iniciarán el proceso de bloqueo de p53 y Rb de modo altamente efectivo.^{70;76-78}

En caso de la existencia de coinfecciones por varios genotipos, algunos estudios han sugerido que el caso de coinfección de un VPH tipo 6 (bajo riesgo) y un VPH 16 (alto riesgo) tienen un riesgo significativamente menor de desarrollar carcinoma que una infección simple por VPH 16, aunque se necesitan más estudios para poder demostrar los posibles

mecanismos de este antagonismo.⁷⁵ En cambio hay discordancia entre autores que no han encontrado relación en caso de coinfecciones con otros tipos virales y en cambio otros consideran una infección múltiple como un determinante importante de persistencia.⁷⁹

8. Métodos de detección de la infección viral

a. Métodos de prevención primaria: cribado poblacional

No existe acuerdo entre las distintas sociedades médicas sobre la edad de inicio y fin de cribado, la periodicidad de la prueba y la realización simultánea o no de la prueba del VPH con la citología.

Existen varias recomendaciones, por ejemplo *La Sociedad Americana del Cáncer* recomienda que el inicio del cribado sea en los tres primeros años después de iniciar las relaciones sexuales pero no más allá de los 21 años y realizarse anualmente si se utiliza citología convencional o cada dos años si se utiliza citología en fase líquida. Mientras, *La Canadian Task Force* recomienda que el inicio coincida con el inicio de las relaciones sexuales o a los 18 años y realizar la citología cada tres años hasta los 35 y cada 5 hasta los 75 años. La comisión de expertos de la Unión Europea hizo sus primeras recomendaciones en el año 1991 para los países miembros. Estas recomendaciones incluían la realización de citologías vaginales en mujeres entre 25 y 65 años en intervalos de 3-5 años. Posteriormente, en 1999, se recomendó iniciar la realización de citologías entre los 20 y 30 años.

En España, el Programa de Actividades Preventivas y de Promoción de la Salud (PAPPS), proyecto de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria, recomienda iniciar la citología a los 35 años, inicialmente con dos pruebas con periodicidad anual y después una citología cada cinco años; también recomienda la búsqueda activa de mujeres con factores de riesgo de

infección por VPH. Diferentes sociedades médicas (Sociedad Española de Patología Cervical y Colposcopia, Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia y Sociedad Española de Citología) recomiendan de forma consensuada realizar la primera citología a los tres años después del inicio de las relaciones sexuales o a partir de los 25 años. La frecuencia más recomendada para la repetición de la prueba es cada tres años, tras dos exámenes anuales con resultados normales (Fig 14 y 15).

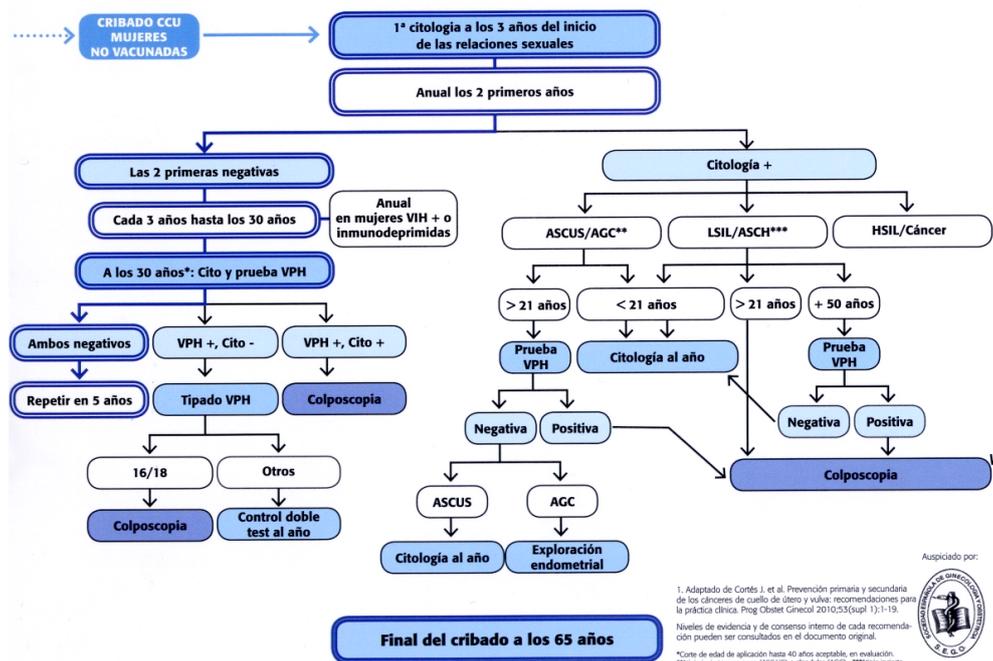


Fig. 14. Recomendaciones de la SEGO 2010 para *screening* poblacional en mujeres no vacunadas

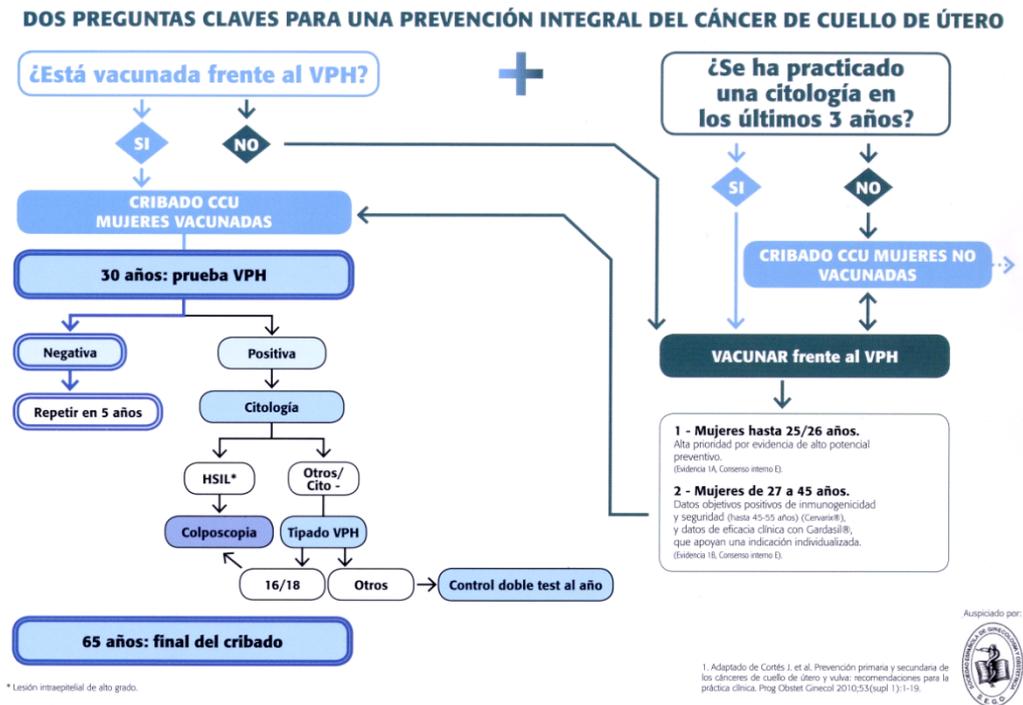


Fig 15. Recomendaciones de la SEGO 2010 para *screening* poblacional en mujeres vacunadas

Los autores argumentan que en España la estrategia de realización de citologías no sigue una línea organizada, lo que conlleva que mujeres jóvenes, con más medios socioeconómicos y de bajo riesgo estén más controladas que mujeres mayores, con menos medios y con un riesgo mayor. Aún así, el 20% de mujeres en edad fértil nunca se ha realizado una citología. Ser mayor de 55 años, vivir en una zona rural y pertenecer a clase social más baja influye a la hora de seguir exámenes ginecológicos. Así, el porcentaje de mujeres que se han realizado una citología aumenta progresivamente hasta los 55 años y, a partir de aquí, disminuye rápidamente. Por otro lado, el 61,1% de las mujeres de poblaciones con menos de 5.000 habitantes se han practicado una citología al menos una vez frente al 77,6% de las de municipios con más de 200.000 habitantes. Asimismo, casi el 60% de las mujeres de clases sociales menos favorecidas se han realizado alguna vez el test de Papanicolaou frente al 83% de las encuestadas con un nivel social más alto. En cuanto a la periodicidad de la prueba, el 41% de las

encuestadas se había sometido a la prueba durante el último año, el 69% se la había hecho en los últimos tres años y el 73%, en los últimos cinco años.⁸⁰

Citología de Papanicolaou. Los programas de detección precoz actuales basados en la citología convencional con Papanicolau, han sido responsables de la reducción del cáncer de cervical durante las dos últimas décadas. No obstante, este método tiene algunas limitaciones, ya que sólo permite identificar a aquellas mujeres con signos aparentes de lesión cervical, pero no aquellas con infección latente. Los nuevos métodos de recolección y procesamiento de las muestras mediante técnicas de citología en monocapa para tinción PAP han ayudado a reducir el número de resultados falsos negativos.

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.

Los programas organizados de cribado poblacional mediante la citología de Papanicolaou han demostrado su efectividad al disminuir la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino en los países donde se han aplicado de forma masiva, por encima del 70-80% de la población, si se realiza de forma sistemática y continuada durante años. También los programas oportunistas o no organizados han logrado disminuir las tasas de cáncer de cérvix aunque en menor medida que los organizados. Los factores que condicionan la efectividad y eficiencia son la incidencia del tumor, la historia natural de la enfermedad, la sensibilidad de la citología y las dificultades de captación de los grupos de mayor riesgo de cáncer de cérvix.

La citología de Papanicolaou consiste en la toma, observación e interpretación de una muestra de células del cérvix de diferentes ubicaciones. Esta prueba detecta cambios inflamatorios, infecciosos o la

presencia de células anormales y neoplásicas. 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, de los que en la actualidad el más usado es la clasificación de Bethesda, 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.¹⁰

La sensibilidad de la citología exfoliativa es de un 50% y su especificidad del 98% para poblaciones de baja prevalencia. El volumen de falsos negativos es elevado. La mayor parte de los falsos negativos se produce por una toma de muestra inadecuada, y sólo un tercio por errores en la lectura. Los errores se reducen al mejorar la garantía de calidad del programa de cribado. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para mejorar la calidad de la citología convencional, con la finalidad de minimizar errores en la recogida y manipulación de las muestras y mejorar la interpretación.

Desde su introducción en los años 50, la técnica de citología cervico-vaginal por Papanicolaou ha sido la mejor herramienta para reducir significativamente la mortalidad por cáncer de cérvix. Sin embargo, en los países que han puesto en práctica un programa de despistaje, el proceso se ha estabilizado en las dos últimas décadas, posiblemente debido a que esta técnica ha recogido todos los beneficios que ofertaba. La citología cervico-vaginal convencional presenta un número significativo de limitaciones que dan lugar a un índice del 5-15% de falsos positivos y del 15-40% de falsos negativos. Se estima que aproximadamente hasta dos terceras partes de los falsos negativos se deben a limitaciones en la toma de la muestra. En este sentido, no todas las células recogidas del cérvix quedan adheridas al portaobjetos, bien por defecto de la extensión, bien porque parte de las células pueden quedar adheridas al dispositivo de la recogida (cepillo, espátula). Además existen casos donde la adecuada interpretación de los extendidos convencionales se ve comprometida por el exceso de sangre,

moco, células inflamatorias, defectos de fijación, artefactos provocados por desecación y ocasionalmente por el escaso componente celular. Para corregir estas limitaciones se ha intentado durante años investigar técnicas alternativas capaces de disminuir significativamente el número de falsos negativos.⁸¹

En esta línea, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó en 1996 un sistema basado en la citología líquida, permitiendo una homogeneización de la muestra con adhesión al porta-objeto en capa celular fina y fondo limpio, lo cual facilita sustancialmente su lectura.

Los análisis clínicos que condujeron a la FDA a la aprobación de esta técnica se basaron en el estudio de más de seis mil mujeres y concluyeron con un aumento significativo en la detección de lesiones intraepiteliales y una reducción próxima al 30% en el número de muestras no valorables.⁸²

La técnica consiste en una vez recogida la muestra citológica cérvico-uterina de forma habitual se introduce en un vial que contiene un líquido conservante (base metanol). De este modo prácticamente la totalidad de las células recogidas se transfieren al vial y quedan fijadas inmediatamente. El vial se identifica y se envía al laboratorio para su procesamiento. Los porta-objetos se preparan de forma automatizada, obteniéndose muestras citológicas uniformemente distribuidas, limitada a un área circular del porta-objetos que albergan un número aproximado de 50.000-70.000 células. Las células se disponen en una fina capa, homogénea, libres de moco, sangre y células inflamatorias

Las ventajas e inconvenientes de la citología en fase líquida sobre la convencional según documentos de consenso de la Sociedad Española de Citología (SEC), Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y Asociación Española contra el Cáncer (AECC).

Ventajas:

- Muestras más representativas
- Mejor conservación de la muestra
- Disminuye las muestras no satisfactorias
- Aumenta el número de lesiones precursoras (En controversia)
- Disminuye el número de ASC-US y AGC (En controversia)
- *En el cribado y diagnóstico en patología cervical:*
 - Disminuye el tiempo de lectura
 - Utilización del material restante para análisis ADN-VPH

Inconvenientes:

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

En gran parte, la citología de base líquida es capaz de corregir las distintas fuentes responsables de los falsos negativos. En este sentido, casi la totalidad de las células recogidas son transferidas al medio conservante (de acción mucolítica y hemolítica), fijándose inmediatamente. El proceso automatizado de filtración dispersa y homogeneiza la muestra celular obteniéndose como resultado una capa fina de células representativas y libres de artefactos.⁸³

Los estudios de comparación en muestras divididas (*Split-sample*), directos y de meta-análisis documentados en la bibliografía concluyen que la citología líquida mejora la calidad de la muestra en todos los casos, disminuye el número de muestras no satisfactorias, ASC-US y células glandulares atípicas (AGC), aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de SIL de bajo y alto grado y disminuye el tiempo de lectura.

La formación especializada para la interpretación de los estudios y la necesidad de un periodo de adaptación para la lectura, recogida en el documento consenso como inconveniente de la citología líquida, podría ser cuestionada puesto que la adaptación a una citología de mayor calidad, sin elementos enmascaradores (moco, sangre, inflamación) y sin artefactos de desecación debe ser extraordinariamente rápida o instantánea.⁸⁴

No hay duda que existe un aumento del costo por proceso cuando se compara aisladamente la citología de base líquida con la convencional. Sin embargo, la significativa disminución de muestras no satisfactorias, la disminución del tiempo de lectura, el aumento en la identificación de lesiones precursoras, la disminución de diagnósticos de ASC-US, AGC y la posibilidad de detección y tipificación del ADN-VPH utilizando la misma muestra y, por tanto, evitando una segunda consulta, reducen sustancialmente los costes y ayudan a equilibrar la relación coste-eficacia.

En resumen la citología de base líquida disminuye significativamente la pérdida de células con respecto a la citología convencional (muestras más representativas) y mejora la calidad con la consecuente disminución del número de muestras insatisfactorias o inadecuadas.

La uniformidad celular y la eliminación de artefactos aumenta la detección de la enfermedad o sensibilidad y disminuye el número de ASC-US (en controversia) y el tiempo de rastreo.

La citología de base líquida aumenta la cantidad de celularidad disponible, permitiendo la repetición de la muestra y la aplicación de técnicas complementarias (detección del ADN del VPH y otras técnicas), ahorrando segundas consultas y la ansiedad de la paciente.

La citología líquida facilita el desarrollo de programas de diagnóstico precoz de cáncer de cérvix. La relación costo-efectividad debe valorarse de

forma global sumando los costes directos e indirectos que se derivan a corto y a largo plazo con la aplicación de la citología de base líquida.⁸⁵

b. Métodos de detección del VPH

La detección de la infección por VPH puede realizarse mediante métodos indirectos como son el diagnóstico morfológico y la identificación de proteínas del VPH y aquellas relacionadas con el estado celular tras la infección (métodos inmunohistoquímicos) y métodos directos de detección de secuencias genómicas del VPH (técnicas de biología molecular).

b.1 Métodos de detección indirecta

- Diagnóstico morfológico

El diagnóstico de infección por VPH se realiza, habitualmente, mediante la identificación morfológica de las alteraciones citopáticas producidas por dichos virus en las células escamosas, las cuales pueden observarse tanto en el examen citológico como en el estudio histológico.

Clásicamente se ha considerado la coilocitosis o atipia coilocítica como el signo morfológico característico de la infección por VPH. Esta alteración se caracteriza por la presencia de aumento del tamaño de los núcleos, hipercromasia e irregularidad del contorno de la membrana nuclear, junto con una peculiar vacuolización perinuclear.⁸⁶ Actualmente sabemos que estas alteraciones son la traducción de una infección viral productiva con presencia de gran cantidad de viriones en el interior de estas células. Los cambios coilocíticos pueden detectarse en todas las lesiones premalignas del cérvix uterino pero son mucho más frecuentes en las lesiones de bajo grado que en las de alto grado. Sin embargo, aunque la presencia inequívoca de coilocitos indica infección vírica productiva con una gran especificidad, es un método muy poco sensible puesto que la mayoría de las lesiones escamosas de alto grado, los carcinomas escamosos invasores y todas las lesiones glandulares

(adenocarcinomas *in situ* e invasores) no contienen habitualmente coilocitos, mientras que técnicas más sofisticadas de biología molecular demuestran la infección en prácticamente el 100% de los casos.

- *Detección de proteínas del VPH (método inmunohistoquímico)*

La demostración de la infección por VPH puede efectuarse mediante la detección inmunohistoquímica de la cápside del virus. Este método presenta en la actualidad grandes limitaciones y aporta escasos datos adicionales sobre la morfología. La detección del antígeno de la cápside se correlaciona muy estrechamente con la presencia de coilocitosis y tiene, por tanto, la misma baja sensibilidad del examen morfológico. Dado que la producción de la cápside tiene lugar únicamente en las células maduras superficiales, la proporción de casos positivos para dicho antígeno es inversamente proporcional al grado de la lesión, es decir, es positivo con relativa frecuencia en casos de SIL de bajo grado, habitualmente negativo en los casos de SIL de alto grado y casi constantemente negativo en los carcinomas invasores. Se empiezan a disponer de anticuerpos específicos de tipo, e incluso es posible detectar serológicamente anticuerpos contra antígenos específicos de la cápside.⁸⁷

- *Métodos de detección de lesión celular*

La **sobreexpresión de p16** está ligada a la transformación oncogénica provocada por la infección persistente por VPH-AR.

En concreto la p16INK4a, es una proteína codificada por el gen supresor CDKN2 (MSTK, INK4) situado en el cromosoma 9p21, inhibidora de la quinasa dependientes de ciclinas, cdk4 y cdk6, que participan en la regulación de la fase G1 del ciclo celular, y en concreto regula la proteína del retinoblastoma (pRb). La proteína E7 de los VPH de AR es capaz de interferir con la pRb y la E6 con la p53. La ubiquitina las marca rápidamente y, por consiguiente, anula su función y se consigue una célula que se

multiplica constantemente en ausencia de actividad de pRb, que no compruebe el buen estado del su ADN con el objeto de buscar mutaciones y repararlas (ausencia de actividad de p53). Cuando en la célula existe mucha cantidad de pRb, p16INK4a aumenta. Por lo tanto, la detección de p16INK4a tanto en células como en tejido, podría relacionarse con la existencia de una infección de VPH de alto riesgo y con una alteración de la maduración epitelial de grado variable (fig.16).

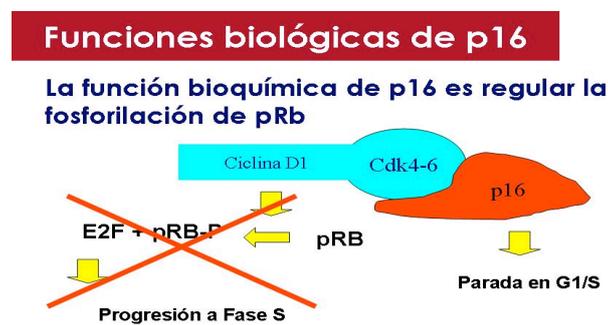


Fig. 16 Función de p16

El Ki-67 también conocido como MIB-1, promueve la proliferación celular que es un factor importante de la biología de muchos tumores, y entre ellas las neoplasias de origen cervical .

Este anticuerpo fue descubierto por Gerdes J en 1983, realiza un marcaje de patrón nuclear de las células que están en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto la fase G0, reflejando así la tasa de proliferación celular⁸⁸.

Respecto al mecanismo de oncogénesis, la expresión de Ki-67 sería mayor en las alteración de 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. La expresión de Ki-67 detectada mediante métodos inmunohistoquímicos no tiene valor pronóstico.⁸⁹ Diversos estudios

han comprobado que la progresión tumoral se asocia a un aumento de proliferación celular⁹⁰ y que la expresión de Ki-67 constituye un potencial indicador pronóstico en el carcinoma cervical.⁹¹

Se utilizan en la actualidad anticuerpos identificados como MIB-1, que permiten su uso en tejidos fijados en parafina, sin riesgo de degradación, cómo ocurría antaño con los anticuerpos monoclonales.⁹²

El uso de la inmunomarcación de Ki-67, usando MIB-1 ha permitido demostrar en los últimos años el uso como indicador de proliferación celular en carcinomas de mama, de cérvix uterino y neoplasia cervical intraepitelial.

Estudios practicados en citología en fase líquida demuestran que p16INK4a es un buen marcador de lesión intraepitelial, e incluso en ASCUS indica la posibilidad de lesión de alto grado confirmado en histopatología.⁹³ Se ha demostrado también la eficacia de p16 como biomarcador en lesiones de alto grado en citología convencional con resultados de ASCUS o SIL, utilizando una evaluación cuantitativa contando el número de células positivas para p16 y comparándolas con biopsias.⁹⁴

En la citología líquida y biopsias también se ha demostrado la utilidad de p16INK4a , en la ayuda a clarificar la confusa definición de lesión displásica de bajo grado y a distinguir las verdaderas lesiones displásicas con alto riesgo de progresión de aquellas que más bien podrían ser definidas con el término mas general de “efecto citopático inducido por VPH”.^{95;96} Otro estudio también defiende un mayor valor predictivo positivo con una futura reducción del número de colposcopias.⁹⁷

Los análisis realizados en biopsias, demuestran la utilidad de p16INK4a para marcar displasias tanto del cuello de útero como alteraciones en la maduración epitelial relacionadas con la infección de VPH.⁹⁸

En el año 2005, se publicaron los primeros resultados del valor en citología de Ki-67, en concreto junto con la expresión de p16INK4a, y estos concluyeron que había que realizar estudios a largo plazo incluyendo test moleculares para VPH de alto riesgo.⁹⁹ Recientemente, Galgano et al. han realizado un estudio poblacional valorando la utilidad real de estos dos marcadores en una serie consecutiva de más de 1500 biopsias de cuello uterino.¹⁰⁰ En sus conclusiones remarcan la utilidad de la detección inmunohistoquímica de p16 para diferenciar biopsias CIN2 no aportando la ausencia o presencia de tinción con Ki-67 ningún valor adicional. Con lo cuál, hoy en día todavía se requieren de marcadores adicionales para la diferenciación de lesiones.¹⁰¹

De forma reciente se está probando el uso de una técnica inmunocitoquímica de expresión dual Ki-67 y P16, cuyo uso en citología convencional o en fase líquida, permite identificar aquellas células que expresen la doble tinción, como células con disregulación del ciclo celular por infección por VPH y con capacidad para progresar a lesión intraepitelial.¹⁰²

Ganancias 3q en cáncer de cérvix.^{103;104} Representa una alteración genética esencial en la transición desde displasia severa/CIS a carcinoma invasivo. Es una alteración genética recurrente en carcinomas de cérvix, menos frecuentemente reconocida en lesiones precursoras premalignas. La región 3q contiene porción RNA del gen hTERT (gen de la telomerasa humana responsable de la inmortalización de células tumorales).

Los datos publicados sugieren que la adquisición de ganancia 3q aparece en las primeras etapas del desarrollo de las lesiones epiteliales malignas y que por tanto su detección en muestras clínicas de rutina positivas para el virus HPV, podría servir como un test de “*screening*” específico y sensible para predecir lesiones displásicas de bajo grado que van a evolucionar a HSIL o carcinoma invasivo.¹⁰⁵ Es necesaria la ganancia 3q

para la progresión desde lesiones de bajo grado a alto grado-carcinoma invasivo. La presencia de ganancia 3q predice la progresión de la lesión con una sensibilidad del 100%. La adquisición de ganancias 3q puede preceder a las alteraciones fenotípicas apreciables por el análisis morfológico. La detección de tales ganancias genómicas en extensiones citológicas de rutina podría incrementar la sensibilidad de los “*screening*” citológicos individuales y podría por tanto servir como un marcador precoz y específico, reduciendo la posibilidad de falsos negativos (Fig17 y 18).

Algoritmo de estudio de ganancias 3q en muestras de rutina

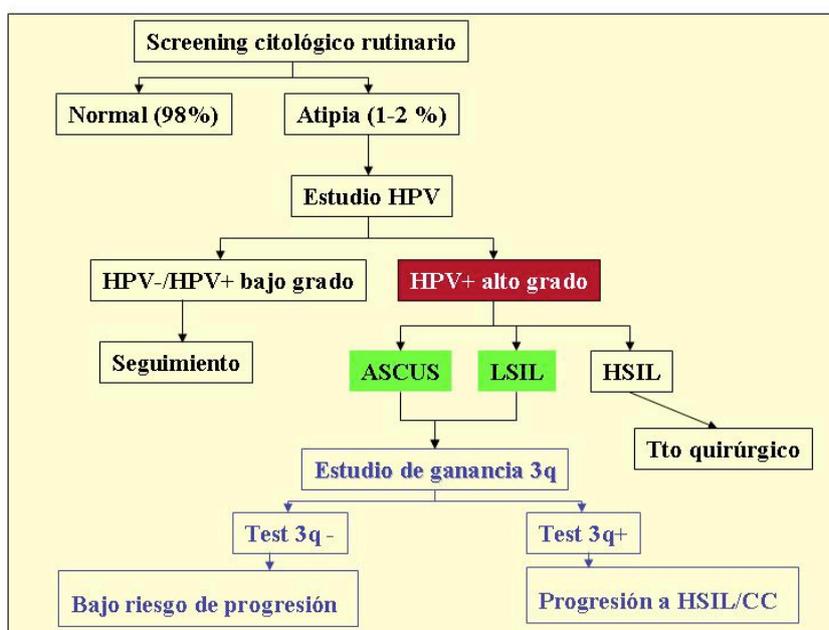


Fig 17. Estudios de ganancia 3q

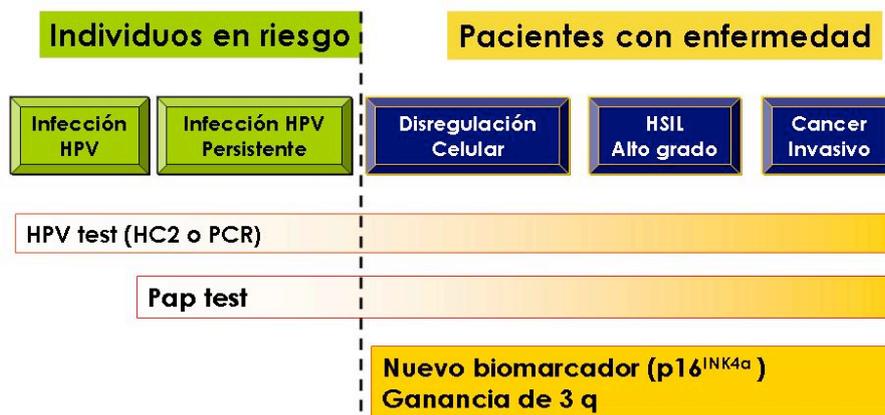


Fig.18. Estudios individuos en riesgo-pacientes con enfermedad

b.2. Métodos de detección directa. Detección de secuencias genómicas del VPH (técnicas de biología molecular).

Estas técnicas consisten en un análisis cualitativo del ADN. Todas ellas se basan en la detección específica de secuencias de ADN del VPH en tejido o bien en tomas de material procedente del área a estudiar (cérvix), y permiten, por tanto, identificar el tipo de virus presente en la lesión.

Básicamente, todas ellas consisten en enfrentar el ADN de una determinada muestra con un fragmento conocido de un ácido nucleico cuya secuencia es complementaria de la secuencia de ADN que intentamos detectar. Dicho fragmento conocido se denomina sonda y el proceso hibridación.

Existen numerosas técnicas de análisis cualitativo del ADN y una gran diversidad de variaciones y modificaciones de estas técnicas. Estas diferentes técnicas presentan diferencias en cuanto a su sensibilidad, complejidad, y reproductibilidad. Algunas de ellas se encuentran disponibles comercialmente. A continuación se discuten brevemente las técnicas de biología molecular más empleadas en el estudio del virus del papiloma.¹⁰⁶

- Hibridación *in situ*
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Captura de híbridos
- Determinación del genotipo mediante hibridación por “*flow-through*”.

Hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* consiste en aplicar sondas complementarias marcadas con sustancias radioactivas o con colorantes que permitan su posterior visualización sobre un corte del tejido problema o sobre una extensión citológica. Esta técnica se puede aplicar tanto en tomas citológicas, como en biopsias, tras su procesamiento habitual. Existen varios tests de detección de VPH por hibridación *in situ* comercializados. Estos tests pueden ser de cribado, los cuales incluyen un cóctel de sondas que permite detectar a un amplio grupo de tipos sin diferenciarlos, o de tipificación. Los tests de tipificación comercializados incluyen tres sondas cada una de las cuales detecta a dos o más tipos de virus agrupados según el riesgo de desarrollo de neoplasia (sonda 6-11 de virus de bajo riesgo, sonda 16-18 de virus de alto riesgo, y sonda 31-33-51 o de riesgo intermedio).

La principal ventaja de este método consiste en que es el único que permite visualizar la morfología de las células en las que se halla el VPH, mientras que el resto de técnicas se realizan en extractos de ADN, por lo que no permiten la valoración morfológica. Una segunda ventaja es su gran *especificidad*: la detección de VPH mediante esta técnica se asocia constantemente a la presencia de lesiones citológicas e histológicas. Las infecciones latentes (con epitelio normal) son casi constantemente negativas con esta técnica. Sin embargo, el gran inconveniente de esta técnica es su baja sensibilidad, puesto que necesita un número elevado de copias (entre 20 y 25 en cada célula) para ser positivo. Así, la hibridación *in situ* es capaz de detectar y tipificar el virus solamente en un 40-70% de las lesiones de

SIL. Aunque en algunos métodos más recientes la hibridación *in situ* se combina con una amplificación por PCR previa, su complejidad los ha hecho poco populares¹⁰⁷.

Técnicas basadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Su fundamento consiste en aplicar un proceso que multiplica el número de copias de un segmento de ADN si está presente en la muestra. Este proceso, que se conoce como amplificación se produce mediante la reacción en cadena de la polimerasa, hace que sea una técnica extraordinariamente sensible capaz de detectar la presencia de muy pocas copias de ADN del virus (entre 10 y 100 en una muestra), aunque estén presentes en una sola célula entre varios miles.

Se pueden utilizar diferentes estrategias, pero en la actualidad tienden a aplicarse métodos capaces de amplificar regiones muy conservadas del genoma del VPH (*primers* de consenso o generales) con lo que con una sola amplificación pueden detectarse gran parte de los diferentes tipos de VPH. Existen dos alternativas fundamentales para detección de VPH basadas en la PCR convencional. En primer lugar, y como método más utilizado, disponemos de la PCR de regiones consenso, en la cuál se amplifica una región con secuencia muy similar entre todos los VPHs para, posteriormente, por métodos de hibridación específica en membrana, enzimáticos o de secuenciación de ADN, realizar el genotipado específico del virus. El método consenso más popular es el que usa la región común L1, utilizando los “*primers*” MY09 y MY11. El amplificado generado es de aproximadamente 450 pares de bases y tiene ciertos inconvenientes como no permitir la detección del tipo 35. Por este motivo, se sintetizaron nuevos “*primers*” como PGMY09/11 con un relativo aumento de sensibilidad y espectro de detección viral, y otros como los GP5/GP6 o su variante mejorada GP5+/GP6+.

La PCR específica está basada en el diseño de “*primers*” específicos para tipos, subtipos o variantes virales y permite ajustar las condiciones de la reacción a sensibilidades de femtogramos, con especificidades que rondan el 100%. Por otra parte permite la realización de análisis de integración viral, detección de variantes, cuantificación normalizada frente a genes constitucionales, etc. (carga viral relativa al número de células)^{108;109}.

Captura de híbridos. En estas técnicas se utilizan sondas de RNA capaces de detectar varios tipos de VPH. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido RNA-DNA que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA que utiliza un compuesto quimioluminiscente para revelar la reacción y que proporciona incluso información sobre la cantidad de DNA viral presente en la muestra, que parece tener relación con la presencia de lesiones de alto grado. La técnica dispone de dos sondas, una para virus de bajo riesgo y otra para virus de alto riesgo, aunque una práctica habitual consiste en aplicar únicamente la sonda para detección de virus de alto riesgo con lo cual se reducen notablemente los costos. El test Hybrid Capture II permite detectar 5 virus de bajo riesgo (6,11,42,43,44) y 13 tipos de riesgo alto o intermedio (16,18,31,33,35,39,45, 51,52,56,58,59,68), involucrados en el 90% de casos de carcinoma de cérvix.

El Test Hybrid Capture II para VPH-AR es capaz de detectar con gran sensibilidad los casos de H-SIL o carcinoma con un 94,7% de casos positivos en nuestra experiencia (tabla 2). Aunque la mayor parte de los estudios publicados corresponden bien a análisis de casos de ASCUS o bien a cribado poblacional primario, la sensibilidad referida en los mismos es similar a la de la presente serie, variando entre el 83,9% y el 100%. Así, la sensibilidad de esta técnica para el diagnóstico de H-SIL es netamente superior a la sensibilidad de la citología convencional, que se sitúa en la mayoría de las

series alrededor del 70%. Resulta especialmente destacable el alto valor predictivo negativo de esta técnica para la existencia de H-SIL o carcinoma, que en nuestra serie se ha situado en el 96,5%, porcentaje similar al de las series publicadas (tabla 3). Por tanto, la detección de VPH-AR mediante Hybrid Capture II puede ser de utilidad en la evaluación de pacientes referidas por lesiones citológicas, puesto que su negatividad permite excluir con un elevado grado de certeza la existencia de una lesión premaligna de alto grado o de un carcinoma invasor y remitir de nuevo estas mujeres a la asistencia primaria.

La detección de VPH-AR usando esta técnica en los casos de L-SIL resulta en un elevado porcentaje de positividad, que es del 86%, porcentaje muy semejante al observado en el estudio ALTS (82,9%) y al de Bergeron y cols. Parece claro, por tanto, que la mayoría de los casos de L-SIL están causados por VPH-AR, y que esta técnica tiene una escasa utilidad en la práctica clínica para la selección de pacientes con L-SIL con riesgo de progresión.

Por último Hybrid Capture proporciona una cuantificación de VPH. Se observa incremento progresivo de carga viral evaluada en unidades lumínicas relativas (ULR), paralelo a la gravedad de la lesión. La presencia de niveles superiores a 100 ULR se asocian a lesión cervical en más del 90% de los casos y esta asociación fue prácticamente constante para niveles superiores a 1000 ULR. Por el contrario, un elevado porcentaje de casos con determinaciones inferiores a las 10 ULR, no presentan lesión cervical. Sin embargo, la presencia de una baja carga viral no debe considerarse excluyente de lesión grave, puesto que un porcentaje significativo de pacientes con diagnóstico de H-SIL o carcinoma presentan niveles de detección inferiores a 100 ULR (30% de H-SIL y 46% de carcinomas invasores) o incluso inferiores a las 10 ULR (solo un 8% de los H-SIL pero hasta un 15% de los carcinomas invasores). Es importante reseñar en este sentido que aunque los datos de carga viral obtenidos mediante la técnica

Hybrid Capture son indudablemente orientativos, esta cuantificación solamente indica un número de copias virales que no puede ser corregida en función del número de células obtenida en la misma, sobre el cual la técnica no aporta datos.¹¹⁰

Hibridación por “*flow-through*”. Se basa en una amplificación del ADN por PCR, seguida de la hibridación por “*flow-through*”, basándose en la técnica de “*reverse dot blot*”. En primer lugar, mediante la amplificación de parte del genoma del HPV por PCR utilizando cebadores biotinilados se generan amplicones biotinilados. Los amplicones se hibridan posteriormente con sondas de captura de oligonucleóticos específicos para cada tipo de HPV mediante hibridación “*flow-through*”. Al dirigir los amplicones hacia las sondas para formar dúplex, la hibridación “*flow-through*” cambia del proceso de canalización pasivo al activo, lo cuál permite que las reacciones de recombinación se realicen en segundos. Tras la hibridación le sigue una fase de lavado riguroso y revelado de la señal.¹¹¹

Secuenciación de ADN. La secuenciación de ADN, es decir la obtención de la secuencia de nucleótidos que conforma una determinada región del ADN viral, constituye sin duda el patrón de referencia para cualquiera de las técnicas anteriores. Mediante este método se puede amplificar o clonar cualquier fragmento del ADN viral y determinar su composición nucleotídica, de este modo enfrentándola a la base de datos que contiene todas las secuencias conocidas de VPHs determinar ante que tipo, subtipo o variante nos encontramos. Su principal inconveniente es el costo y la necesidad de contar con laboratorios de alto nivel que dispongan de esta metodología. La ventaja, aparte de suponer un tipaje directo e inequívoco, es que permite distinguir variantes y polimorfismos virales, que en este momento se están considerando una variable de riesgo de transformación neoplásica de gran importancia además de la presencia de nuevos tipos virales.¹¹⁰

c) Sensibilidad y especificidad. Eficacia de las distintas técnicas.

Numerosos estudios han establecido los límites de sensibilidad y especificidad de cada una de las técnicas y variantes descritas. Al igual que ocurre con la citología, la calidad del análisis de ADN está condicionado por una serie de factores técnicos y de conservación de la muestra que en ocasiones son determinantes para el resultado. Cada una de las técnicas descritas detecta un rango diferente de VPHs y para el grupo común de VPHs detectados por todas las técnicas, las diferencias en sensibilidad y especificidad son variables aunque equiparables a nivel clínico. La técnica de Captura de Híbridos requiere la utilización de una solución conservante específica y en aquellos casos en los que la muestra está degradada la reacción no tiene la especificidad adecuada. Del mismo modo la técnica de PCR consenso disminuye su sensibilidad en muestras con ADNs de baja calidad. La PCR específica es menos dependiente de la calidad del ADN y permite el análisis de muestras archivadas en parafina. La mejor relación entre sensibilidad y especificidad en captura de híbridos se obtiene aplicando un nivel de corte de 1pg de ADN, sin embargo para que la sensibilidad sea comparable a nivel clínico con la PCR, debe establecerse el nivel de corte de positividad en 0,2 pg de ADN, con la desventaja de que a este nivel de corte produce falsos positivos, especialmente en muestras con VPHs de bajo riesgo y carga viral elevada.

En lo que respecta a los métodos basados en PCR las técnicas consenso MY09/11 y GP5+/6+ consiguen una buena correlación en lo que respecta a los tipos detectados por ambas técnicas ($Kappa=0,79$), sin embargo ciertos tipos virales solamente son detectados por una de las dos técnicas. Sin duda, la combinación de alguna de estas técnicas con la detección específica de los tipos más implicados en carcinogénesis como VPH16 y VPH18, genera unos niveles de sensibilidad y especificidad óptimos a nivel clínico.^{55;110}

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

Las infecciones por el virus del papiloma humano (VPH) representan una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en la mayoría de los países. El interés de la investigación sobre el VPH reside en el potencial oncogénico de algunos genotipos de alto riesgo (fundamentalmente 16, 18 y 31) y en la asociación etiológica con el carcinoma de cérvix y otras neoplasias del tracto anogenital, tanto femenino como masculino.¹

La adquisición del VPH al inicio de las relaciones sexuales es muy alta.¹¹² La tasa de transmisibilidad es la mayor de todas las infecciones de transmisión sexual no bacterianas. Y así, en mujeres que inician las relaciones sexuales en edad temprana (15-19 años), se advierte que el riesgo acumulado de presentar una infección VPH positiva a los 5 años es del 50%. Este riesgo va disminuyendo con la edad, pero se mantiene con rangos altos: 21% para mujeres entre 30-44 años y 14% para mujeres de 45 años o más.⁸ En España, se estima que la prevalencia de VPH en mujeres de la población general, es aproximadamente del 9%, con un descenso gradual asociado a la edad, hasta llegar a valores inferiores al 4% en mujeres perimenopáusicas.⁸

En condiciones de inmunocompetencia, el VPH produce cambios citológicos propios de lesión de bajo grado (LSIL), que se corresponden histológicamente como neoplasia intraepitelial leve (CIN 1). No obstante, estas alteraciones desaparecen generalmente de manera espontánea, antes de 24 meses, por lo que no deben considerarse necesariamente como lesiones preneoplásicas.¹¹³

La duración media de las infecciones suele ser de 8 a 10 meses, pero los casos en los que el ADN viral es persistente forman esencialmente un grupo de alto riesgo para la progresión neoplásica.¹¹⁴ En la infección por VPH

existen aspectos claves, tales como: a) el proceso de transformación neoplásica pasa necesariamente por el desarrollo de lesiones precursoras, que pueden ser fácilmente identificadas y curadas; b) sólo una pequeña proporción de mujeres infectadas de forma persistente desarrollará lesiones precursoras, de las cuales tan sólo una pequeña proporción de éstas progresaran a cáncer cervical.¹¹⁴

Los programas de detección precoz actuales -basados en la citología exfoliativa convencional (Papanicolau)- son responsables de la reducción del cáncer escamoso cervical durante las dos últimas décadas. No obstante, este método tiene algunas limitaciones, ya que sólo permite identificar a aquellas mujeres con signos aparentes de lesión cervical, pero no a las que tienen infección latente. Actualmente, la incorporación y utilización de las técnicas biomoleculares para identificación del ADN vírico, en el cribado que permítanla detección y genotipado del VPH, están justificadas por su elevado valor predictivo negativo, así como por la mejora e incremento en la sensibilidad de la citología del cuello uterino, para identificar mujeres con lesión celular CIN 2/3 o carcinoma.

De todos modos, hay que señalar que la demostración de infección por VPH no es sinónimo de lesión cervical: que es una alteración morfológica (como manifestación de un proceso biológico atípico) que pueden regresar o no. La utilización de marcadores celulares de predicción de transformación neoplásica, como son la inmunoexpresión dual de p16/Ki-67, en mujeres con citología negativa y VPH positiva, van a permitir identificar pacientes con mayor riesgo de progresión a cáncer cervical.¹⁰²

Por todo lo anterior, en el contexto del Proceso Asistencial Integrado (PAI) de Cáncer de Cérvix-Cáncer de Útero de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, implantado en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga desde el año 2006, y seleccionando todas las pacientes que se incluyeron en el mismo durante los años 2008 y 2009, se ha planteado la realización de este trabajo con los objetivos siguientes:

a) Objetivos principales

- Conocer y valorar en nuestro medio los genotipos más frecuentes de VPH, así como comparar y establecer las posibles diferencias existentes con otras series en la prevalencia de genotipos de alto riesgo.
- Correlacionar en las categorías cito-morfológicas (ASCUS; LSIL; HSIL,..) con la variabilidad de genotipos VPH de alto y bajo riesgo.
- Determinar la prevalencia y el papel de los genotipos conocidos actualmente como alto riesgo y su persistencia en el proceso de oncogénesis y progresión de las lesiones intraepiteliales.
- En el seguimiento de pacientes con lesiones de alto grado, conocer la persistencia del genotipo de VPH en el tejido cervical biopsiado.

b) Objetivo secundario

Analizar la utilidad y conveniencia del marcador inmunohistoquímico dual p16/Ki-67, así como su implementación en la citología convencional, cuando existen hallazgos citopatológicos de ASCUS/LSIL con PCR positiva.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

Ámbito de estudio

Las muestras recogidas tanto de citología convencional, muestra para estudio molecular y tejido histológico, pertenecen a mujeres de la población de Málaga y provincia incluidas en el Proceso Asistencial Integrado (PAI) de Cáncer de Cérvix-Cáncer de Útero de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, implantado en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga (HUVVM) en el año 2006 del que se ha efectuado la primera evaluación y revisión en diciembre del año 2010.

Este proceso se define como Proceso de atención a pacientes susceptibles de diagnóstico precoz de lesiones precursoras y/o cáncer invasivo de cuello uterino. El conjunto de actividades van encaminadas al diagnóstico precoz, confirmación diagnóstica, tratamiento integral (quirúrgico, médico, radioterápico y apoyo psicológico) de mujeres con lesiones precursoras y/o cáncer invasivo de cérvix uterino atendidas en Centros de Atención Primaria pertenecientes al Área de Salud del HUVVM así como de las consultas de ginecología en atención especializada de dicho Hospital.

Las muestras citológicas y biopsias generadas han sido valoradas y diagnosticadas por el Sº de Anatomía Patológica del mismo hospital. El estudio molecular de *screening* y genotipado del VPH ha sido realizado en la Unidad de Apoyo a la Investigación Oncopatológica UMA-AECC vinculado con el Servicio de Anatomía Patológica del HUVVM para la implatación y realización de técnicas moleculares.

Población diana

- Mujeres que de forma oportuna acudieron a la consulta de Atención Primaria.
- Mujeres con signos/síntomas clínicos: hemorragia genital, leucorrea sanguinolenta, coitorragia.
- Mujeres que, tras exploración ginecológica realizada en cualquier nivel asistencial presentaron signos de sospecha clínica y/o diagnóstico anatomopatológico (citología, biopsia) de lesiones precursoras/cáncer de cuello uterino.

Población de estudio

Mujeres incluidas en el PAI Cáncer de Cérvix, desde el 1 de enero del 2008 hasta el 31 de diciembre de 2009 que siguieron el esquema general establecido en la fig. 19.

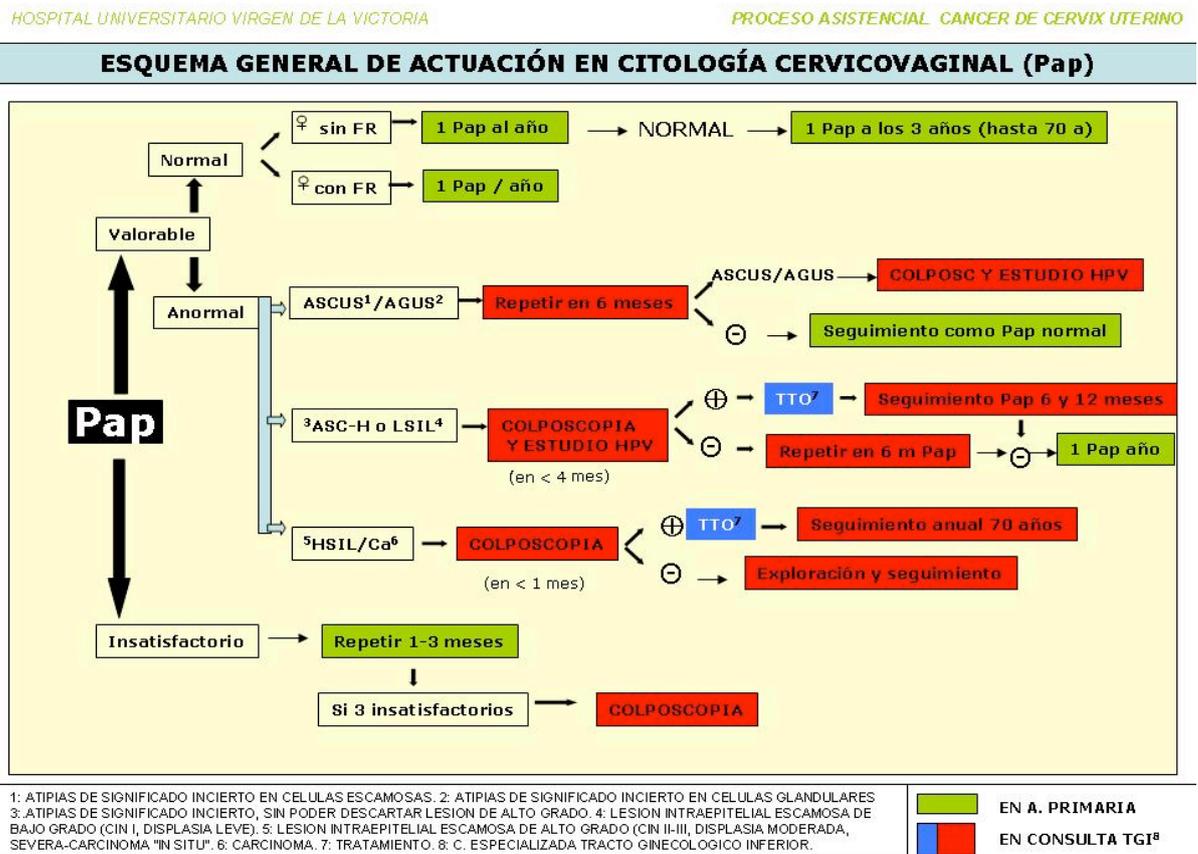


Fig. 19. Esquema general PAI Cáncer de Cérvix HUVV

2. Metodología de trabajo

En el estudio se han incluido 1400 muestras correspondientes al año 2008 y 1680 del año 2009. Todas ellas disponían de estudio citológico (previo o posterior) y estudio molecular para la determinación de ADN viral y en los casos positivos identificación de genotipo. Las lesiones de bajo grado (LSIL) y los ASCUS tuvieron un seguimiento por citología y control de ADN viral mediante técnicas biomoleculares durante estos dos años, a menos que hubiese evidencia de lesión colposcópica. En esos casos se realizaron biopsias. Las pacientes tras el diagnóstico citológico de lesión precursora de alto grado (H-SIL), se les realizó biopsia con fines diagnósticos, utilizando pinza de escisión fría. A aquellos casos con diagnóstico de CIN2-CIN3, se les realizó conización cervical mediante asa de escisión electroquirúrgica (LEEP, *Loop Electrosurgical Excision Procedure*). La conización se realizó como terapia de un diagnóstico previo por biopsia de CIN2 ó 3.

Además se realizó una selección posterior de 100 casos, correspondientes al año 2010, con lesión ASCUS y/o LSIL con VPH positiva y muestra de biopsia posterior para realizar el estudio de inmunexpresión de p16/ki-67 en muestras citológicas convencionales.

Los casos seleccionados se hicieron según los criterios de inclusión y exclusión siguientes :

Criterios de inclusión

- Pacientes pertenecientes al PAI cáncer de cérvix con diagnóstico de alteración morfológica en citología previa, que se le realizó estudio molecular, o estudio citológico con estudio molecular paralelo por sospecha clínica.

- Estudio histopatológico convencional posterior a la citología con diagnóstico confirmatorio de CIN 1, 2, 3 o carcinoma *in situ* o invasor.
- Muestra citopatológica adecuada para posible estudio de marcadores de lesión celular.

Criterios de exclusión

- En los HSIL no disponer de estudio histopatológico confirmatorio de lesión.
- Ausencia de citologías con Identificación molecular de VPH y genotipo.
- Aquellas citologías con anomalías glandulares ya que el estudio con citología convencional, es útil para screening de lesiones escamosas, pero no para las de etiología glandular.¹⁰

a) Estudio cito-histopatológico convencional

El diagnóstico se realiza mediante tres pruebas diagnósticas básicas. La primera es la citología, mediante una toma de exocérvix y endocérvix, ésta última preferiblemente con cepillo 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.

La repetición antes de ese intervalo aumenta el número de falsos negativos con lo cual dificulta o desorienta, antes de ser útil al diagnóstico de la CIN. 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 en el canal, y dirigir la biopsia de la lesión colposcópica (tercera prueba). Si la zona de transformación no es visible, está situada en el canal cervical, se realizaría una micro-colpohisteroscopia que permite su visualización en un 1cm, en su defecto, se realizará 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 será valorado con reservas.¹¹⁵

Las extensiones cervico-vaginales remitidas en portas fijados, desde las consultas de Atención Primaria y de Atención Especializadas, fueron registradas en el Servicio de Anatomía Patológica según datos de filiación (nombre y apellidos, edad, N° de Seguridad Social , NUSSA.....), tras ello se inició el procedimiento de tinción rutinaria con Papanicolau en equipo automatizado Leica y tras el montaje se realizó el screening por dos citotécnicos, con confirmación del patólogo. El informe anatomopatológico de la citología cervicovaginal se realizó siguiendo la clasificación Bethesda para interpretación de citología cervico-vaginal.¹⁰

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 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 3mm. 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 CIN.

b) Detección del ADN del HPV 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 DNA 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. El DNA extraído y purificado se utilizó como molde para detectar la presencia de ADN del HPV mediante amplificación por PCR usando cebadores Gp5-6 específicos de la región consenso L1 (Kit para screening de VPH. Máster Diagnóstica S. L. Granada). El resultado de la amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta, considerándose el caso como positivo si aparecía una banda de 150 pb. Todas las muestras se amplificaron por duplicado para disponer en todo momento de control de reproducibilidad del método. Como control de calidad del ADN extraído se amplificó un gen control (gen de p53) de 102 pares de bases. Se consideró el resultado como: 1 positivo, 2 negativo, (fig. 20).

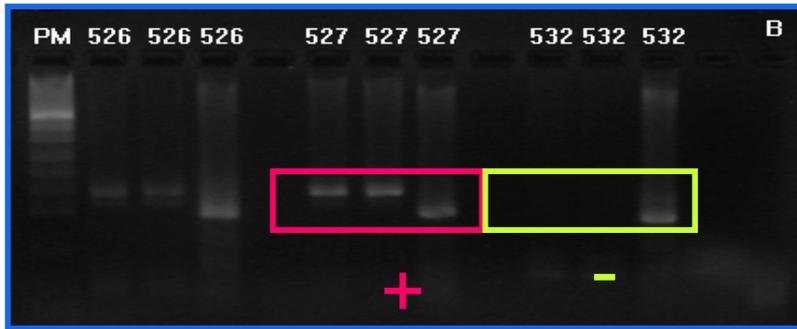


Fig 20. Productos de PCR en gel de agarosa

Identificación del genotipo. En los casos que resultaron positivos para VPH se llevó a cabo la identificación del tipo de virus con el kit GenoFlow Human Papilomavirus (HPV) Array Test (version 1) de DiagCor 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 (Kit VPH-GenoArray. Master Diagnóstica S. L. Granada).

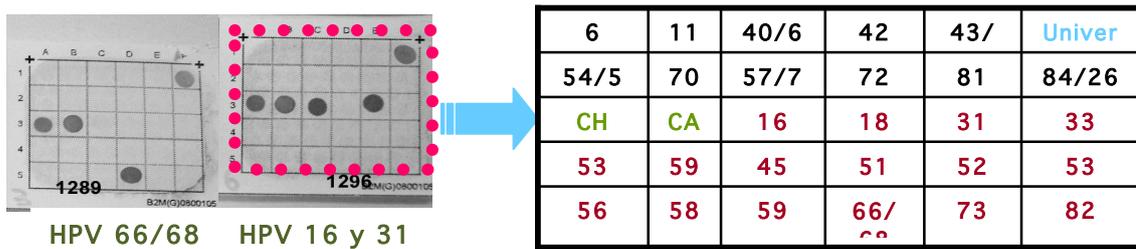


Fig 21. Identificación genotipo mediante PCR seguida de hibridación en membrana.

c) Determinación inmunohistoquímica de p16/ki-67 (Cintec® PLUS kit)

El estudio inmunohistoquímico se ha realizado en muestras citológicas previamente teñidas con Papanicolau. 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 la proteína p16^{INK4a} y ki-67 con el kit CINTec® Plus Cytology Kit (MTM Laboratories AG, Germany). El anticuerpo utilizado para la determinación de la proteína p16 fue el anticuerpo primario monoclonal prediluido de la clona E6H4TM y un anticuerpo primario de conejo monoclonal, clon 274-11 AC3 frente a la proteína humana ki-67. La inmunotinción se llevó a cabo en 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 el patólogo y se clasificaron dicotómicamente como p16/ki-67 positivas (tinción fuerte y difusa) (fig. 22) o p16/ki-67 negativas (ausencia de tinción).

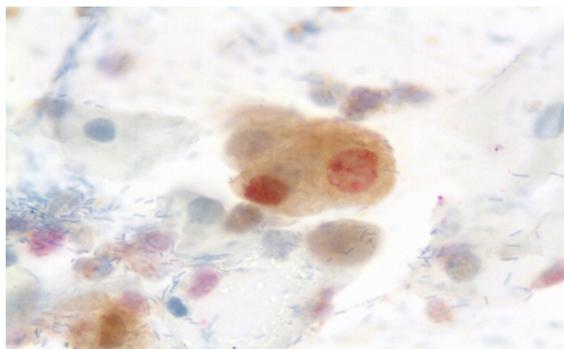


Fig 22. Patrón de inmunotinción p16/ki-67 positivo

3. Descripción de los parámetros estudiados

La base de datos confeccionada consta de:

Datos de identificación del paciente

- Número de historia clínica
- Identificación personal: DNI
- Número de la Seguridad Social
- Apellidos y nombre
- Edad. Se consideró la edad de las pacientes en el momento del diagnóstico. Para el estudio estadístico posterior se agruparon los casos en seis grupos etáreos: <25, 25-34, 35-44, 45-54, 55-64, >64 años usando el mismo criterio que en otros trabajos recientes.¹¹⁶

Datos relativos a las muestras

- Número de citología
- N° de estudio molecular

Interpretación de informes citológicos

- *Clasificación de cambios morfológicos en la citología*

El estudio de las citologías ginecológicas se realizó mediante cribado

previo por dos citotécnicos, y con posterior revisión por un citopatólogo, en aquellos casos de dificultad diagnóstica, datos de sospecha clínica, sintomatología, o bien presencia de células atípicas escamosas.

Las diferentes grupos de lesión se agruparon siguiendo la nomenclatura Bethesda para interpretación de estudios citológicos descritos en 2002¹⁰ pero completando la información clínico integrando las siguientes opciones:

1. Células escamosas atípicas (ASC)
 - De significado indeterminado (ASCUS)
 - No se puede descartar HSIL (ASC-H)
2. Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
 - a. (LSIL)(incluye VPH/displasia leve /CIN1)
 - b. Persistencia de células epiteliales escamosas con cambios coilocíticos asociados a VPH.
3. Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL)(incluye displasia moderada y grave CIN2- CIN3)
4. Citología normal
5. Control citológico postconización
6. Carcinoma escamoso

Interpretación de Informes histológicos

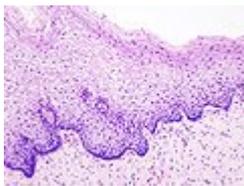
- Clasificación histológica

Los cambios microscópicos iniciales que corresponden al desarrollo de una neoplasia cervical intraepitelial (CIN) son las displasias del epitelio, es decir, la superficie que recubre el cuello uterino, lo cual es indetectable y asintomático en la mujer. Los cambios celulares asociados con una infección por el VPH, tales como los coilocitos —una célula epitelial superficial escamosa—son encontrados comunmente en los CIN.

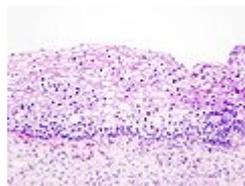
Los CIN tienen tres grados distintivos, basados en el espesor de la invasión por parte de las células escamosas:

- **CIN1** (Grado I), es el tipo de menor riesgo, representa solo una displasia leve o crecimiento celular anormal y es considerado una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. Se caracteriza por estar confinado al 1/3 basal del epitelio cervical.
- **CIN2** (Grado II), es considerado una lesión escamosa intraepitelial de alto grado y representan una displasia moderada, confinada a los 2/3 basales del epitelio cervical.
- **CIN3** (Grado III): en este tipo de lesión, considerada también de alto grado, la displasia es severa y cubre más de los 2/3 de todo el epitelio cervical, en algunos casos incluyendo todo el grosor del revestimiento cervical. Esta lesión es considerada como un carcinoma *in situ*.

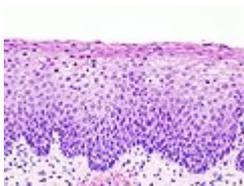
Fig. 23 Cambios histológicos en CIN



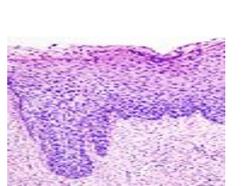
Epitelio normal



CIN grado 1



CIN grado 2



CIN grado 3

Recientemente, la clasificación de las lesiones precancerosas ha sido reformulada, agrupándose las lesiones en solo dos tipos, de acuerdo con las dos posibles decisiones terapéuticas (observación o intervención quirúrgica). Según el nuevo sistema:

- las lesiones NIC-1 (CIN-1) se han renombrado como **LSIL** (por *low grade squamous intraepithelial lesion*, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado).
- las lesiones NIC-2 y 3 (CIN-2 y 3) se denominan **HSIL** (por *high grade SIL*).

La mayoría de las LSIL se curan espontáneamente, y sólo un pequeño porcentaje progresan a HSIL, por lo que las LSIL no se tratan como una lesión premaligna. La frecuencia de las HSIL es una décima parte de la frecuencia de LSIL.

Parámetros derivados del estudio molecular de identificación de VPH y genotipado

En la base de datos se incluyeron los genotipos obtenidos para cada caso positivo. Para el estudio estadístico posterior generamos distintas variables:

- ***VPH*** : 1 Positivo 2 Negativo
- ***Genotipo VPH en citología y en su caso en biopsia***
- ***Número de genotipos VPH en citología y en biopsia:***
identificado por números ordinales de 1 a 9.
- ***Patrón de infección VPH en muestras de citología y en biopsia:***

- 1 Infección simple. Cuando la muestra mostró infección para un único genotipo de alto o bajo riesgo
 - 2 Infección múltiple. Cuando se observó por más de un genotipo de bajo y/o alto riesgo.
- ***Tipo de infección VPH en muestras de citología y en biopsia:***
- 1 VPH alto riesgo. Infección por virus de alto riesgo
 - 2 VPH bajo riesgo. Infección por virus de bajo riesgo
 - 3 VPH de alto y bajo riesgo. Infección por virus de alto y bajo riesgo.

Con todas las pacientes con VPH positivos en ambos años hemos intentado realizar un **estudio de seguimiento** para valorar la **persistencia o aclaramiento de la infección por VPH** en citologías hasta el día 31 de diciembre de 2010. Además en aquellas pacientes que por la lesión fueron sometidas a conización se valoró si el genotipo asociado era el mismo observado en la citología. Se han identificado 448 muestras correspondientes a 360 pacientes.

Se valoró en cada una de estas muestras si:

- 1 Persiste la infección por al menos un genotipo VPH
- 2 Persiste la infección pero por VPH diferentes
- 3 Negativo VPH /aclaramiento

Parámetros derivados del estudio de la inmunexpresión de la p16/Ki-67

La interpretación de la inmunexpresión de p16/Ki-67 se valoró en:

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

4. Descripción de los parámetros estudiados

El análisis estadístico de los datos ha sido implementado, en un ordenador ASUS con sistema operativo Windows XP, con SPSS 17.00 para Windows.

a) Estudio descriptivo

Todas las variables clínico-patológicas fueron sometidas previamente a un estudio estadístico descriptivo básico. Las variables cuantitativas fueron evaluadas por su valor numérico real, tomando como valores representativos la media (M) y la desviación típica (DT). Las variables cualitativas se distribuyeron en 3 a 10 categorías calculando las frecuencias absolutas y relativas.

b) Estadística analítica

Se han realizado las siguientes valoraciones

- En muestras citológicas:
 - Relación edad e infección viral
 - Genotipo VPH y tipo de lesión
 - Papel de las multiinfecciones en la progresión de lesiones pre-invasivas
 - Estudio de la persistencia/aclaramiento de genotipos en citología
 - Positividad p16/ki-67 y tipo de lesión en citología

- En muestras de biopsias:
 - Infección viral o multiinfección relacionado con el tipo de lesión.
 - Estudio de persistencia de genotipo VPH

IV. RESULTADOS

A. Descripción de las variables clínico-patológicas

1. Edad de las pacientes en el momento del diagnóstico

La media de edad de las 1349 pacientes del año 2008 fue de 35,38 años y la de las 1553 del año 2009 fue de 35,02 años. En 51 casos (3,6%) del año 2008 y 127 (7,6%) del año 2009 no se tenía constancia de la edad de las pacientes en el momento del diagnóstico (tabla 1)

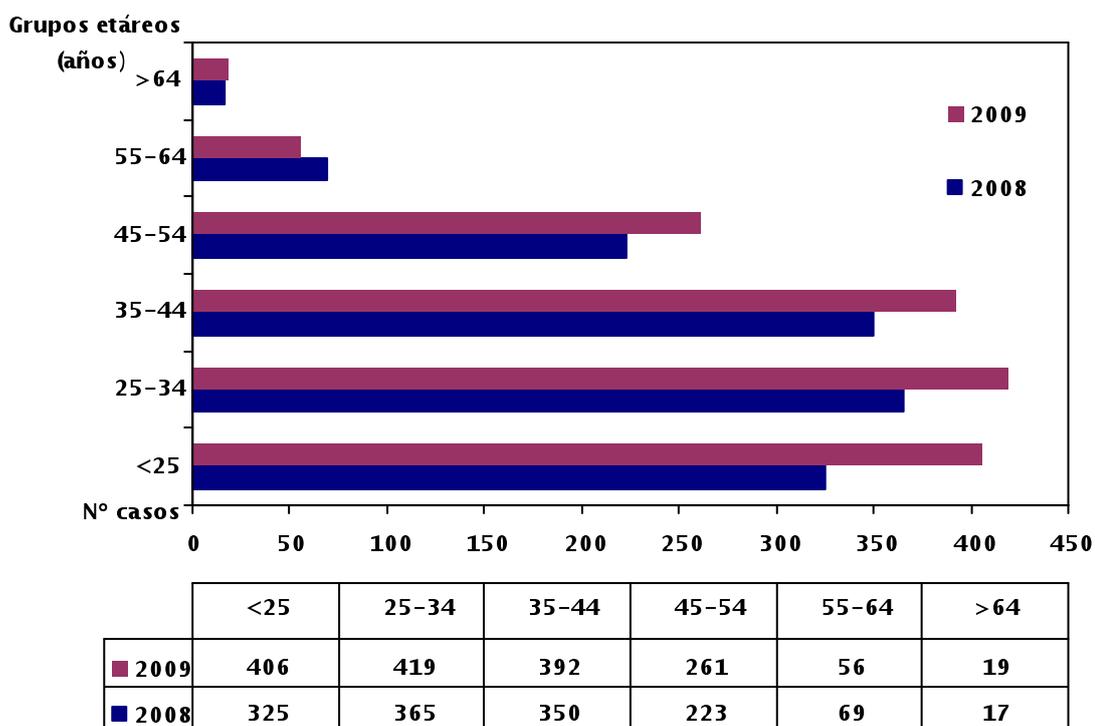
Tabla 1. Media de edad y desviación típica por años

Año	Nº casos	Rango de edad (años)	Media (años)	DT
2008	1349	15-76	35,38	11,655
2009	1553	14-77	34,58	11,458

En el año 2008 el 26,1% de las muestras correspondían a pacientes de menos de 25 años, 27% estaban incluidas en el grupo de 25-35 años, 25,2% de 35-44 años, 16,8% de 45-54 años, 3,6% en el grupo 55-64 años y 1,2% mayores de 64 años (fig. 24). El 93,6% de los casos corresponden a pacientes menores de 55 años.

En el año 2009 el 24,1% de las muestras correspondían a pacientes de menos de 25 años, 27,1% estaban incluidas en el grupo de 25-35 años, 25,9% de 35-44 años, 16,5% de 45-54 años, 5,1% en el grupo 55-64 años y 1,3% mayores de 64 años (fig. 24). El 95,2% de los casos corresponden a pacientes menores de 55 años.

Fig. 24. Frecuencia de casos por años y grupos de edad

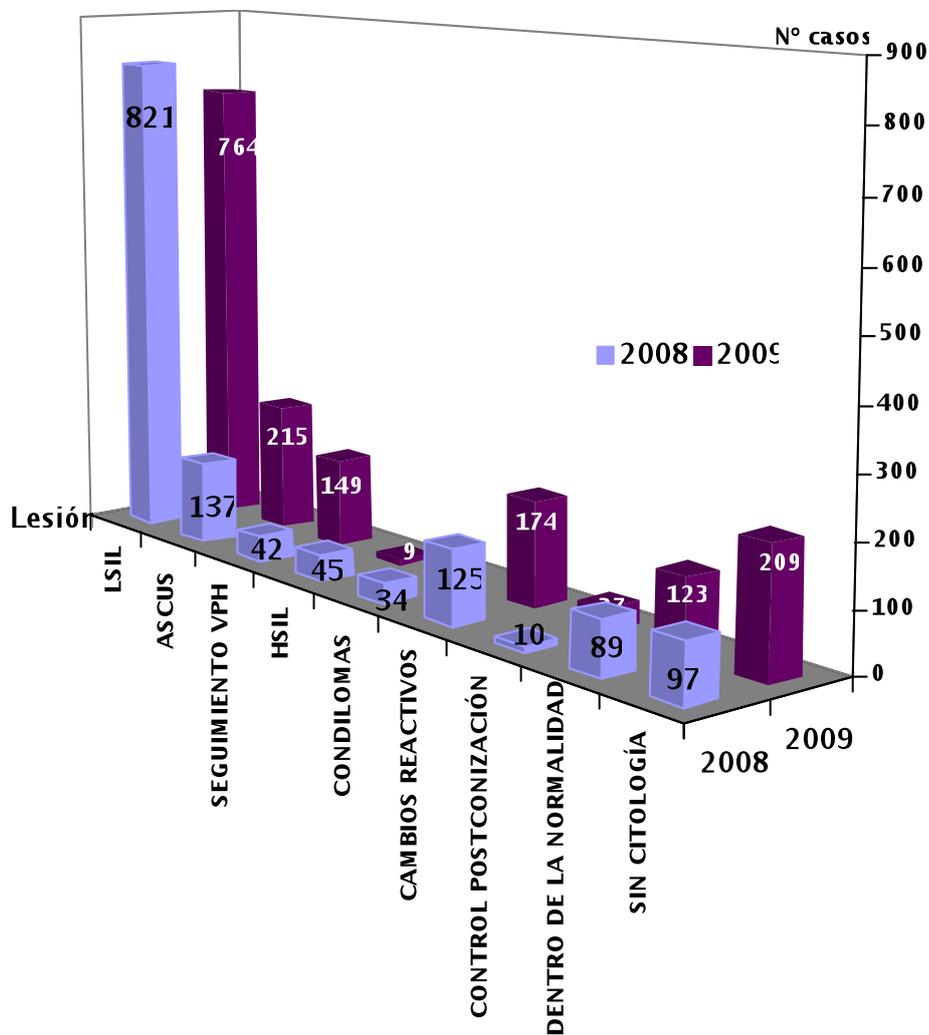


2. Tipo de lesión

El número de muestras totales sometidas a screening citológico en los años 2008-2009 han sido 48.950, de las cuáles 44.750 (91,53%) correspondieron a citologías normales o inflamatorias.

Las citologías que presentaron algún tipo de alteración celular o sospecha clínica acompañadas siempre de estudio molecular fueron un total de 4.080 (1400 en 2008 y 1680 en 2009), de las cuales, la mayor parte correspondieron a lesiones de bajo grado (fig. 25).

Fig. 25. Citología y tipo de lesión por años



3. Distribución de los tipos de lesión citológica en función de la edad

Se observa un predominio de las lesiones de bajo grado, persistencia de células escamosas, ASCUS y lesiones condilomatosas en pacientes jóvenes de menos de 35 años. Las lesiones de alto grado (HSIL), en el año 2008 se observan en pacientes de 35 a 54 años; en el año 2009 observamos un

aumento notable de la frecuencia en mujeres mayores de 64 años (fig. 26 y 27).

Fig. 26. Distribución de casos por lesión y grupos etáreos (año 2008)

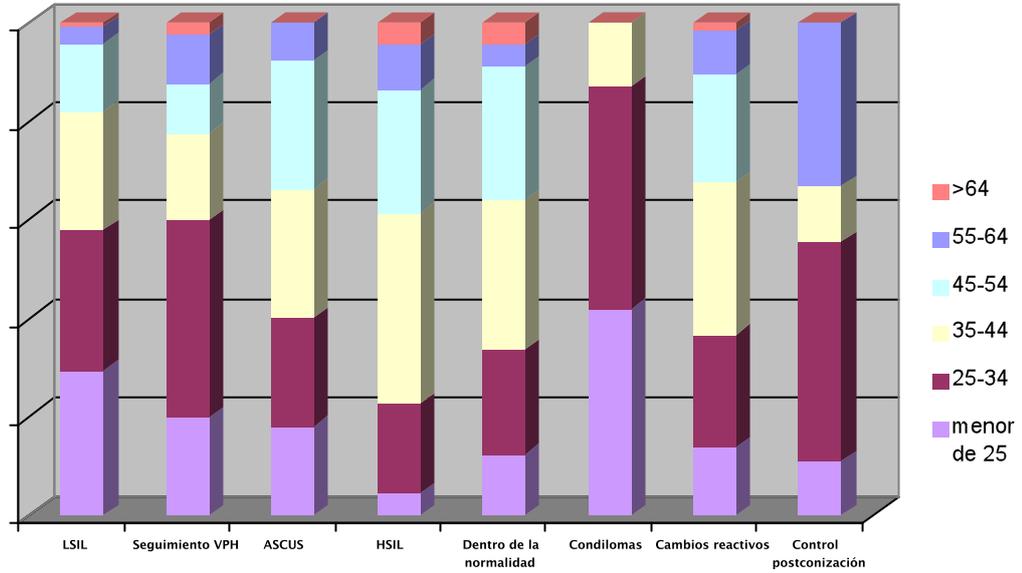
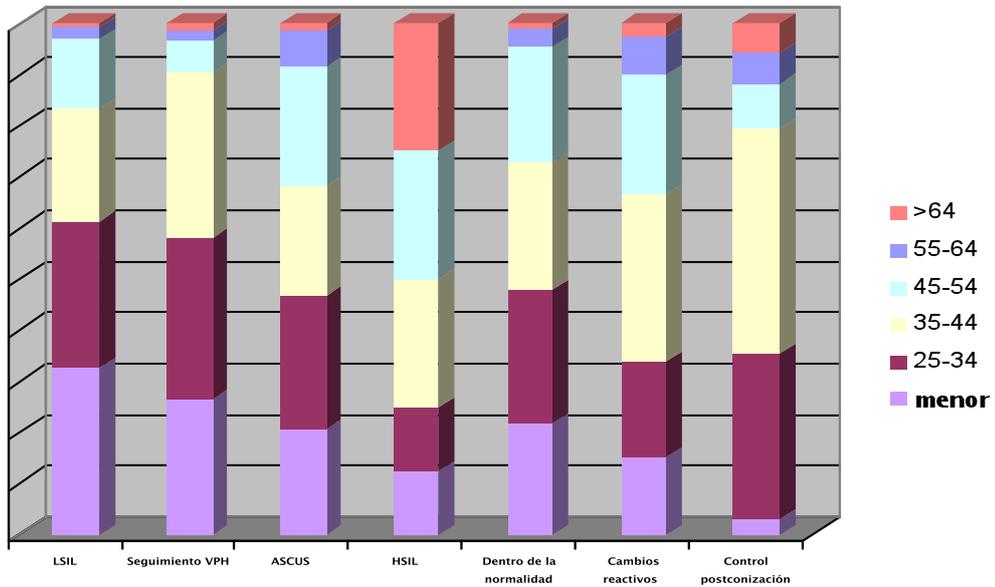


Fig. 27. Distribución de casos por lesión y grupos etáreos (año 2009)



B. Identificación y genotipado de VPH en muestras citológicas

- Citologías VPH negativas/positivas

En el total de las citologías con lesión, 3080 casos, se realizó estudio molecular por PCR. En 2008 el 34,9% mostraron infección por VPH, observándose un ligero incremento en el año 2009 en el que la tasa de positividad fue del 35,8% (tabla 3).

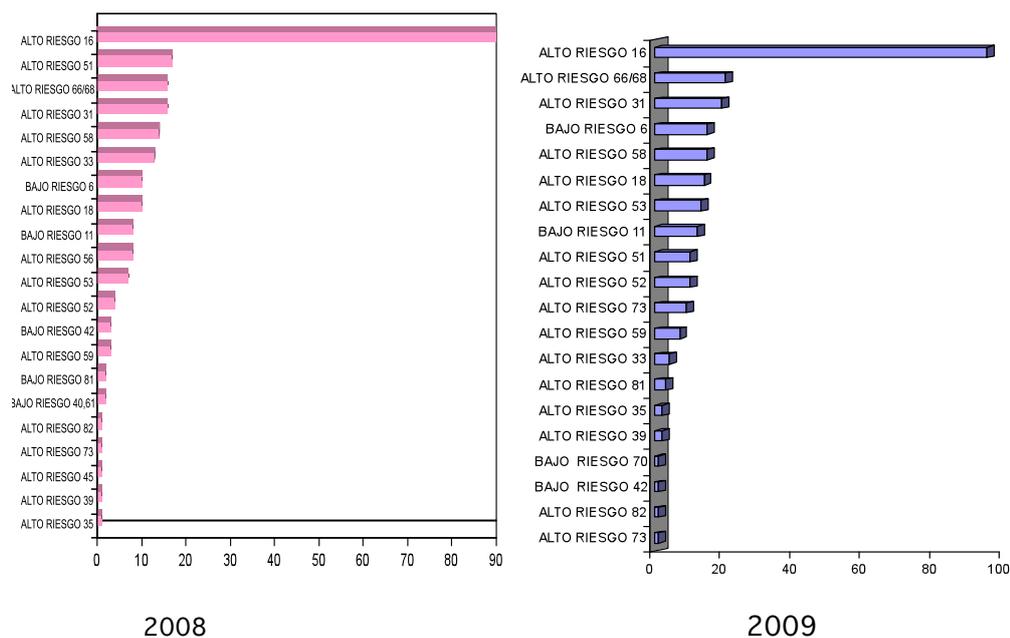
Tabla 3. Distribución de los casos por años según infección por VPH

Año	VPH	Nº casos	%
2008	Negativos	912	65,1%
	Positivos	488	34,9%
2009	Negativos	1079	64,2%
	Positivos	601	35,8%

- Frecuencia de genotipos VPH

En el año 2008 los genotipos por orden de frecuencia fueron: 16, 51, 66/68, 31,58, 33, 6, 18,11, 56, 53, 52, 42. En el año 2009, la distribución de genotipos se modifica siendo los más frecuentes: 16, 66/68, 31,6, 58, 18, 53, 11, 51, 52, 73, 59,33, 81, 35, 42, 82, 73 (fig.28).

Fig. 28. Frecuencia genotipos VPH en el año 2008 y 2009



- Frecuencia de genotipos de alto/bajo riesgo

La mayoría de los casos mostraron infecciones por genotipos de alto riesgo: 67% en el año 2008 y 62,4% en el año 2009. El número de casos con co-infecciones por genotipos de alto y bajo riesgo fue del 25,6% (2008) y 26,9% (2009) (tabla 4).

Tabla 4. Genotipo VPH de alto y/o bajo riesgo

Año	Genotipo VPH	Nº casos	Porcentaje (%)
2008	Alto riesgo	327	67,0
	Bajo riesgo	35	7,2
	Alto riesgo + bajo riesgo	125	25,6
	Total	488	100
Año	Genotipo VPH	Nº casos	Porcentaje (%)
2009	Alto riesgo	375	62,4
	Bajo riesgo	64	10,6
	Alto riesgo + bajo riesgo	162	26,9
	Total	601	100,0

- Frecuencia de infecciones simples y múltiples en citología

En nuestro medio, observamos que la proporción de infecciones simples, es decir, por un único genotipo de bajo o alto riesgo fue del 45,5% en 2008 y 44,4% en 2009. Las infecciones múltiples, entendidas como infecciones por más de un genotipo de alto o bajo riesgo o infecciones mixtas por genotipos de alto y bajo riesgo, fueron del 37,5% en el año 2008 y del 49,1% en el año 2009 (tabla 5). Si analizamos estos datos, observamos, que la mayoría de las infecciones múltiples son causadas por 2-4 genotipos. Los casos con más de 5 genotipos son poco frecuentes (tabla 6).

Tabla 5. Patrón de infección en citología

	Patrón de infección	Nº de casos	Porcentaje (%)
2008	Infección simple	222	45,5
	Infección múltiple	183	37,5
	Genotipo no definido	83	17,0
	Total	488	100
	Patrón de infección	Nº de casos	Porcentaje (%)
2009	Infección simple	267	44,4
	Infección múltiple	295	49,1
	Genotipo no definido	38	6,3
	Total	601	100,0

Tabla 6. Número de genotipos VPH en el año 2008 y 2009

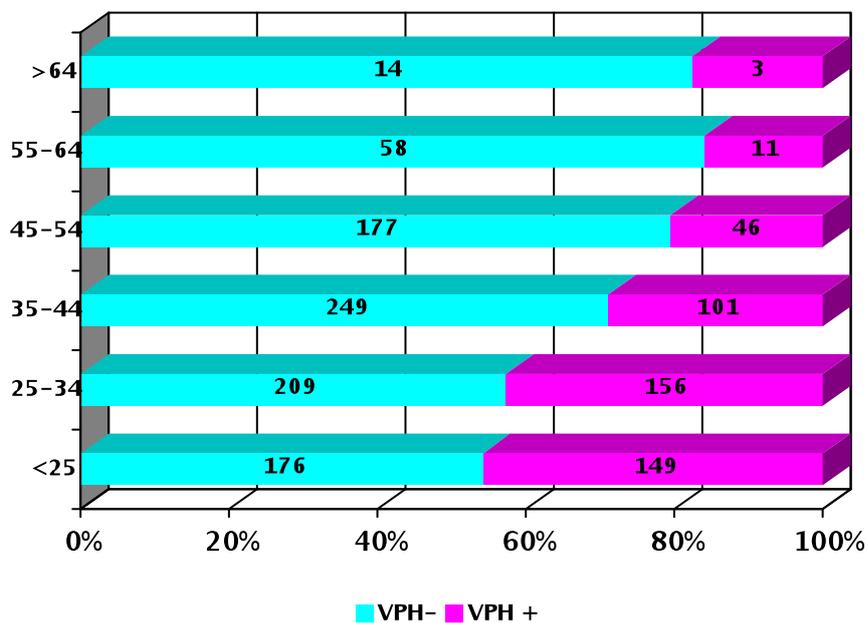
Año	Nº genotipos	Nº casos	Porcentaje (%)
2008	1 genotipo	222	45,5
	2 genotipos	103	21,1
	3 genotipos	45	9,2
	4 genotipos	24	4,9
	5 genotipos	7	1,4
	6 genotipos	1	,2
	7 genotipos	1	,2
	8 genotipos	1	,2
	9 genotipos	1	,2
	No definido	83	17,0
Total	488	100,0	
Año	Nº genotipos	Nº casos	Porcentaje (%)
2009	1 genotipo	267	44,4
	2 genotipos	152	25,3
	3 genotipos	74	12,3
	4 genotipos	32	5,3
	5 genotipos	22	3,7
	6 genotipos	12	2,0
	7 genotipos	2	,3
	8 genotipos	1	,2
	9 genotipos	1	,2
	No definido	38	6,3
Total	601	100,0	

- Distribución de los casos en función del estado de la infección por VPH y la edad

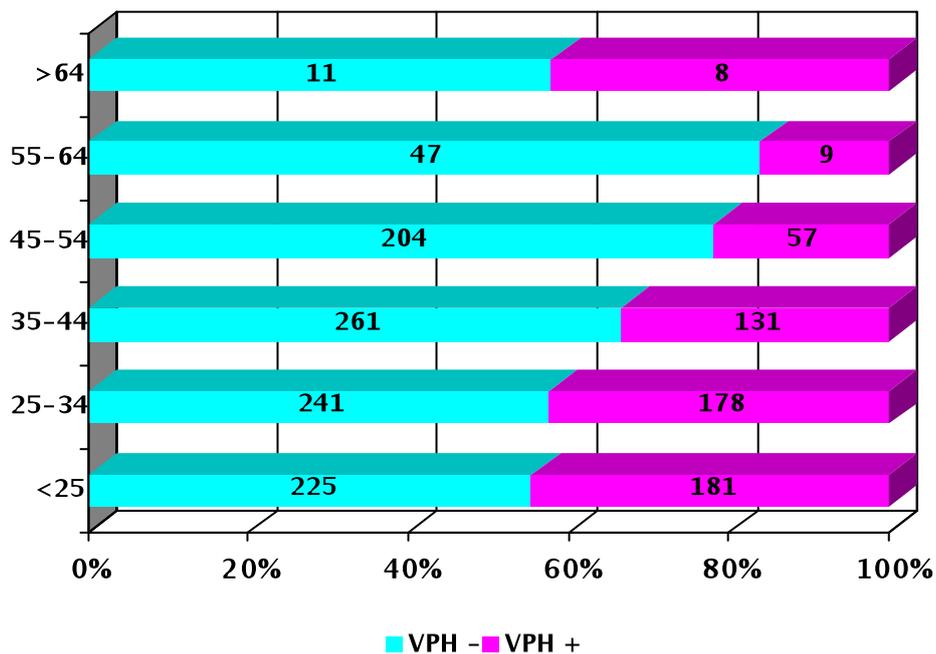
Con los resultados obtenidos por año observamos que la infección por HPV se produce, fundamentalmente, en pacientes jóvenes menores de 35 años (fig. 29).

Fig. 29. Distribución de casos negativos/positivos HPV por año y grupos etáreos

Año 2008



Año 2009



- Edad media de casos VPH positivos/negativos

La edad media de las pacientes que presentaron PCR negativas fue en el año 2008 de 37,30 y en el año 2009 de 36,10, mientras que los casos con PCR positivas la media de edad fue discretamente inferior, 31,74 en el año 2008 y 31,93 en el año 2009 (tabla 7).

Tabla 7. Media de edad en casos VPH positivos y negativos

Año	VPH	Nº casos	Media	DT	Rango
2008	Negativos	883	37,30	11,903	15-76
	Positivos	466	31,74	10,235	16-69
	Total	1349	35,38	11,655	15-76
Año	VPH	Nº casos	Media	DT	Rango
2009	Negativos	989	36,10	11,679	14-74
	Positivos	564	31,93	10,557	15-77
	Total	1553	34,58	11,458	14-77

- Distribución de los casos en función del estado de la infección por VPH y el tipo de lesión citológica.

La positividad para la infección de VPH, en los dos años de estudio 2008-2009, estaban asociadas, a lesiones de alto grado (HSIL), seguimiento de VPH, lesiones de bajo grado (LSIL) y condilomas, y en control post conización. Con mucha menor frecuencia, se observó positividad para VPH en los ASCUS y en las citologías normales y con cambios reactivos (tabla 8 y 9).

Tabla 8. Lesión citológica e infección VPH positiva/negativa en 2008

Año 2008		VPH		Total
Lesión		NEGATIVO	POSITIVO	
LSIL	Nº casos	483	338	821
	%	58,8%	41,2%	100%
Seguimiento de VPH	Nº casos	15	27	42
	%	35,7%	64,3%	100%
ASCUS	Nº casos	110	27	137
	%	80,3%	19,7%	100%
HSIL	Nº casos	23	22	45
	%	51,1%	48,9%	100%
Condilomas	Nº casos	14	20	34
	%	41,2%	58,8%	100%
C. normal	Nº casos	79	10	89
	%	88,8%	11,2%	100%
S. Citología	Nº casos	75	22	97
	%	77,3%	22,7%	100%
Cambios reactivos	Nº casos	108	17	174
	%	86,4%	13,6%	100%
C. postconización	Nº casos	5	5	10
	%	50%	50%	100%
Total	Nº casos	912	488	1400
	%	65,1%	34,9%	100,0%

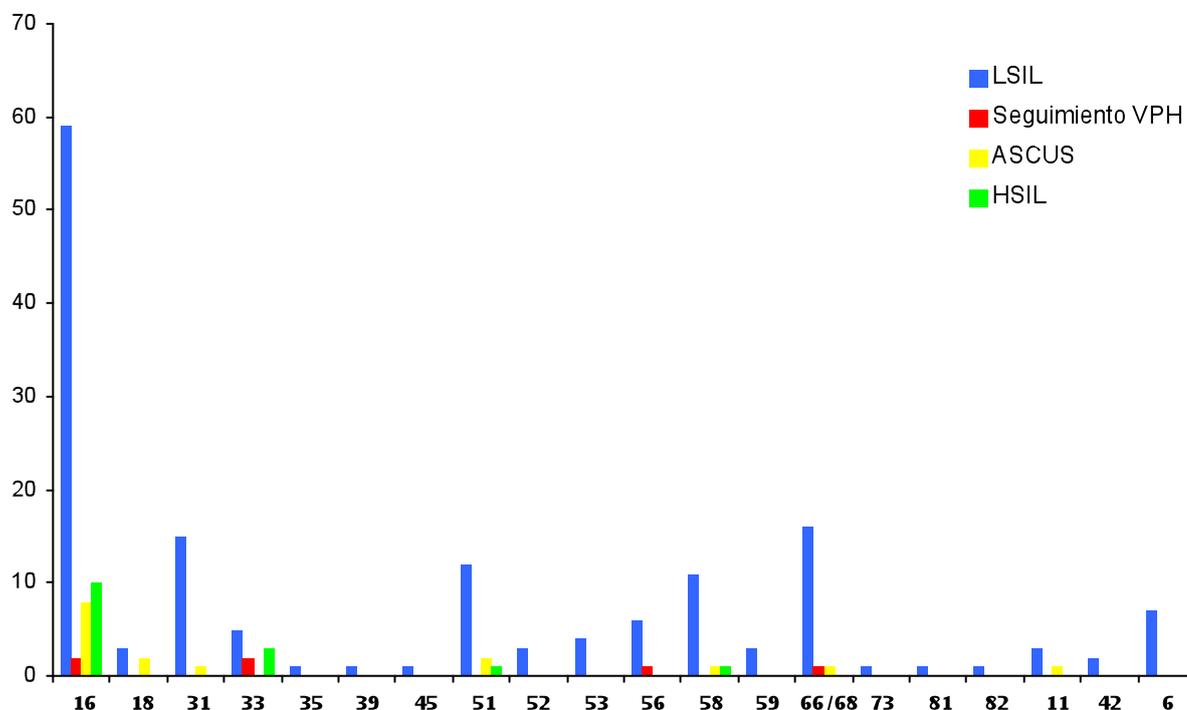
Tabla 9. Lesión citológica e infección VPH positiva/negativa en 2009

Año 2009		VPH		Total
Lesión		NEGATIVO	POSITIVO	
LSIL	Nº casos	420	344	764
	%	55,0%	45,0%	100%
Seguimiento de VPH	Nº casos	72	77	149
	%	48,3%	51,7%	100%
ASCUS	Nº casos	170	45	215
	%	79,1%	20,9%	100%
HSIL	Nº casos	1	8	9
	%	11,1%	88,9%	100%
C. normal	Nº casos	94	29	123
	%	76,4%	23,6%	100%
S. Información	Nº casos	154	55	209
	%	73,7%	26,3%	100%
Cambios reactivos	Nº casos	145	29	174
	%	83,3%	16,7%	100%
C. postconización	Nº casos	23	14	37
	%	62,2%	37,8%	100%
Total	Nº casos	1079	601	1680
	%	64,2%	35,8%	100,0%

- Genotipos más frecuentes en cada tipo de lesión

Observamos que, durante el bienio estudiado, los genotipos que se asocian con mayor frecuencia a LSIL son los genotipos de alto riesgo 16, 66/68, 31, 51 y 58 y mientras que en ASCUS y HSIL es el VPH 16 el más asociado (fig. 30).

Fig. 30. Genotipos más frecuentes según tipo de lesión



- Distribución de los casos según la lesión y patrón de infección

En las lesiones de bajo grado (LSIL), persistencia de VPH y patrones normales observamos mayor proporción de infecciones múltiples mientras que en las lesiones de alto grado (HSIL) y control postconización son más comunes las infecciones por un único genotipo (tabla 10 y 11). En cuanto a los ASCUS, en el año 2008 se observó mayor número de infecciones simples mientras que en el año 2009 se observa un cambio a favor de lesiones múltiples (tablas 10 y 11).

Tabla 10. Patrón de infección y lesión en 2008

	Año 2008		PATRÓN DE INFECCIÓN		Total
			INFECCIÓN SIMPLE	INFECCIÓN MULTIPLE	
Lesión	LSIL	Nº de casos	149	189	338
		%	44,1%	55,9%	100,0%
	SEGUIMIENTO DE HPV	Nº de casos	7	20	27
		% I	25,9%	74,1 %	100,0%
	ASCUS	Nº de casos	15	12	27
		%	55,6%	44,4%	100,0%
	HSIL	Nº de casos	17	5	22
		%	77,3%	22,7%	100,0%
	DENTRO DE NORMALIDAD	Nº de casos	6	4	10
		%	60%	40%	100,0%
	SIN CITOLOGÍA	Nº de casos	7	15	22
		%	31,8%	68,2%	100,0%
	CAMBIOS REACTIVOS	Nº de casos	11	6	17
		%	64,7%	35,3%	100,0%
	CONTROL POSTCONIZACION	Nº de casos	3	2	5
		%	60%	40%	100,0%
	Total	Nº de casos	222	266	488
		%	45,5%	54,5%	100,0%

Tabla 11. Patrón de infección y lesión en 2009

	Año 2009		PATRÓN DE INFECCIÓN		Total
			INFECCIÓN SIMPLE	INFECCIÓN MULTIPLE	
Lesión	LSIL	Nº de casos	148	196	344
		%	43,0%	57,0%	100,0%
	SEGUIMIENTO DE VPH	Nº de casos	34	43	77
		% I	44,2%	55,8%	100,0%
	ASCUS	Nº de casos	22	23	45
		%	48,9%	51,1%	100,0%
	HSIL	Nº de casos	5	3	8
		%	62,5%	37,5%	100,0%
	DENTRO DE NORMALIDAD	Nº de casos	14	15	29
		%	48,3%	51,7%	100,0%
	SIN CITOLOGÍA	Nº de casos	26	29	55
		%	47,3%	52,7%	100,0%
	CAMBIOS REACTIVOS	Nº de casos	10	19	29
		%	34,5%	65,5%	100,0%
	CONTROL POSTCONIZACION	Nº de casos	8	6	14
		%	57,1%	42,9%	100,0%
	Total	Nº de casos	267	334	601
		%	44,4%	55,6%	100,0%

- Distribución de casos por tipo de lesión y genotipos de alto/bajo riesgo

En el año 2008 observamos que los genotipos de alto riesgo son más frecuentes en los LSIL, ASCUS y HSIL; los genotipos de bajo riesgo son más frecuentes en los casos de control postconización y en los condilomas, mientras que las coinfecciones por genotipos de alto y bajo riesgo predominan en los casos de seguimiento de VPH, lesiones condilomatosas y citologías normales. En el año 2009, se observa un cambio en relación con los casos de seguimiento postconización en las que predominan genotipos de alto riesgo, así como en los casos de citologías normales, en los que se reparten en partes iguales los casos de bajo riesgo y los de bajo y alto riesgo (tablas 12 y 13).

Tabla 12. Lesión citológica e infección por genotipos VPH de alto y bajo riesgo en 2008.

Año 2008		Genotipos			Total
Lesión citológica		Alto riesgo	Bajo riesgo	Alto riesgo+ bajo riesgo	
LSIL	Nº de casos	239	23	75	337
	%	70,9%	6,8%	22,3%	100%
Seguimiento de VPH	Nº de casos	15	1	11	27
	%	55,6%	3,7%	40,7%	100%
ASCUS	Nº de casos	19	1	7	27
	%	70,4%	3,7%	25,9%	100%
HSIL	Nº de casos	17	0	5	22
	%	77,3%	,0%	22,7%	100%
C. normal	Nº de casos	6	0	4	10
	%	60,0%	,0%	40,0%	100%
Sin citología	Nº de casos	9	4	9	22
	%	40,9%	18,2%	40,9%	100%
Condilomas	Nº de casos	6	4	10	20
	%	30,0%	20,0%	50,0%	100%
Cambios reactivos	Nº de casos	14	0	3	17
	%	82,4%	,0%	17,6%	100%
Control postconización	Nº de casos	2	2	1	5
	%	40,0%	40,0%	20,0%	100%
Total	Nº de casos	327	35	35	487
	%	67,1%	7,2%	7,2%	100,0 %

Tabla 13. Lesión citológica e infección por genotipos VPH de alto y bajo riesgo en 2009.

Año	2009	Genotipos			Total
		Alto riesgo	Bajo riesgo	Alto riesgo + bajo riesgo	
LSIL	Nº casos	229	29	86	344
	%	66,6%	8,4%	25,0%	100%
Seguimiento de VPH	Nº casos	52	8	17	77
	%	67,5%	10,4%	22,1%	100%
ASCUS	Nº casos	27	2	16	45
	%	60,0%	4,4%	35,6%	100%
HSIL	Nº casos	7	0	1	8
	%	87,5%	,0%	12,5%	100%
C. normal	Nº casos	13	8	8	29
	%	44,8%	27,6%	27,6%	100%
S. citología	Nº casos	24	10	21	55
	%	43,6%	18,2%	38,2%	100%
Cambios reactivos	Nº casos	13	7	9	29
	%	44,8%	24,1%	31,0%	100%
Control postconización	Nº casos	10	0	4	14
	%	71,4%	,0%	28,6%	100%
Total	Nº casos	375	64	162	601
	% del total	62,4%	10,6%	27,0%	100,0%

C. Estudio de la persistencia de la infección por VPH

a) En muestras citológicas

Se observó aclaramiento de la infección en el 40,7% de los casos. En los casos con persistencia de la infección de VPH 34,7% se mantuvo el

mismo genotipo y en el 24,6% se mantuvo la infección por VPH pero con un genotipo diferente (tabla 14). En los casos que hemos podido valorar la persistencia de infección, la edad media de las pacientes -en cualquiera de los supuestos considerados- que se mantuviera un genotipo o con cambio de genotipo, es de 32 años (tabla15).

Las infecciones persistentes son fundamentalmente por genotipos de alto riesgo donde el 16 es el genotipo prevalente, seguido del 31, 66/68 y por coinfecciones de alto y bajo riesgo donde el genotipo 16 está presente de forma predominante (fig. 31 y tabla 16).

Tabla 14. Persistencia/aclaramiento de la infección VPH

Persistencia/aclaramiento	Nº de pacientes	%
Persistencia de al menos un genotipo	131	34,7
Positivo pero con cambio de genotipo	93	24,6
Aclaramiento	154	40,7
Total	378	100,0

Tabla 15. Persistencia de infección VPH y edad media de las pacientes

Persistencia de infección VPH	Nº de pacientes	Media	DT	Rango
Persistencia de al menos un genotipo	124	32,29	11,278	15-65
Positivo pero con cambio de genotipo	91	32,67	9,978	16-65
Aclaramiento	145	32,45	10,134	16-69
Total	360	32,45	10,476	15-69

Fig. 31 Genotipos VPH más frecuentes en pacientes con persistencia

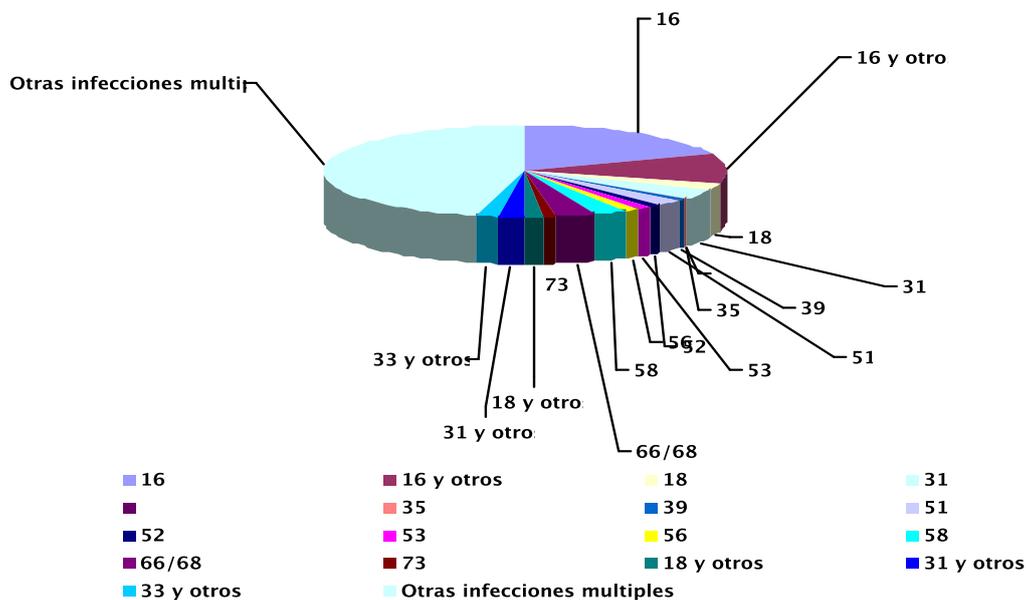


Tabla 16. Tipos de genotipos

Genotipo	Nº de casos	Porcentaje (%)
Alto riesgo	289	64,5
Bajo riesgo	37	8,3
Alto + bajo riesgo	64	14,3
Genotipo no definido	58	12,9
Total	448	100,0

b) En muestras histológicas

- Frecuencia de lesiones en biopsias

En los 296 casos que se realizó biopsia las lesiones diagnósticas con más frecuencia fueron CIN2 y CIN3 (tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia de lesiones en biopsias

Lesión	Nº casos	%
CIN1	50	16,9
CIN2	73	24,7
CIN3	142	48
Ca invasor	30	10
Otros	1	0,3
Total	296	100

- Patrón de infección por VPH en biopsias

Del total de los casos con citología y biopsia sólo 52 casos tenían realizada la tipificación y genotipado del VPH.

El patrón de infección fue, en el 75% de los casos, por más de un genotipo de VPH (tabla 18).

Tabla 18. Patrón de infección en biopsias

Patrón de infección	Frecuencia	Porcentaje (%)
Infección simple	13	25,0
Infección múltiple	39	75,0

-Frecuencia de genotipos en biopsias

El genotipo identificado en la mayoría de los casos (80,8%) ha sido el genotipo 16 con un patrón de infección simple o coinfección (fig. 32 y tabla 19). Los genotipos que acompañaron de manera más frecuente al VPH 16 en las biopsias fueron: VPH 18, 56, 66 y 35 (fig. 32).

Fig. 32 . Genotipos más frecuentes en biopsias

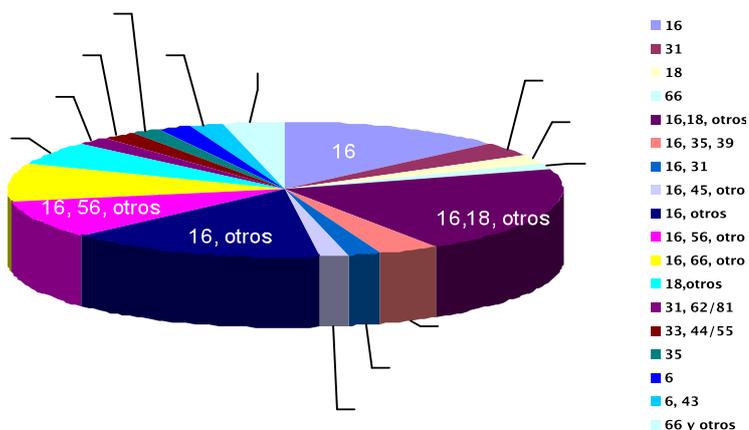


Tabla 19. Frecuencia de casos con infección por VPH 16

VPH 16	Nº de casos	Porcentaje (%)
Si	42	80,8
No	10	19,2
Total	52	100

- Frecuencia de genotipos de alto riesgo y bajo riesgo

El 32,7% de los casos mostró infección por uno o más genotipos de alto riesgo mientras que la forma más común fue la coinfección por genotipos de alto y bajo riesgo (63,5%) (tabla 20).

Tabla 20. Frecuencia de casos con genotipos de alto y bajo riesgo

Genotipo	Nº de casos	%
Alto riesgo	17	32,7
Bajo riesgo	2	3,8
Alto riesgo+ bajo riesgo	33	63,5
Total	52	100,0

D. Estudio de la inmunexpresión de p16/ki-67

De los 99 casos evaluadas el 60, 6% de los casos mostraron negatividad para la tinción dual frente al 39, 4% de positividad (tabla 21). De estos 99 casos, 12 correspondían a lesiones etiquetadas como ASCUS y 87 a LSIL (tabla 22).

Tabla 21. Frecuencia de casos positivos y negativos a p16/ki-67

p16/ki-67	Nº casos	Porcentaje (%)
Negativa	60	60,6
Positiva	39	39,4

Tabla 22. Relación entre lesión citológica e inmunexpresión de p16/ki-67

Lesión		p16/ki-67	
		Negativo	Positivo
ASCUS	Nº casos	6	6
	%	10,0%	15,4%
LSIL	Nº casos	54	33
	%	90,0%	84,6%

En el estudio molecular, por PCR, todos los casos fueron positivos. Los genotipos más frecuentes, en los casos positivos para la p16/ki-67, fueron el 16 (84, 6% de los casos) mientras que en los casos negativos para p16/ki-67 el 16 estaba presente en el 28,3% seguido, en segundo lugar, por un grupo de casos con genotipos no definidos (15%) (tabla 23).

Tabla 23. Relación entre genotipo y p16/ki-67

Genotipo		p16/ki-67		Total
		Negativo	Positivo	
16	Nº casos	17	33	50
	%	28,3%	84,6%	50,5%
18	Nº casos	6	1	7
	%	10,0%	2,6%	7,1%
Genotipo no definido	Nº casos	9	0	9
	%	15,0%	,0%	9,1%
31	Nº casos	5	1	6
	%	8,3%	2,6%	6,1%
33	Nº casos	2	1	3
	%	3,3%	2,6%	3,0%
35	Nº casos	1	0	1
	%	1,7%	,0%	1,0%
4	Nº casos	1	0	1
	%	1,7%	,0%	1,0%
42	Nº casos	1	0	1
	%	1,7%	,0%	1,0%
51	Nº casos	1	0	1
	%	1,7%	,0%	1,0%
52	Nº casos	1	1	2
	%	1,7%	2,6%	2,0%
53	Nº casos	2	0	2
	%	3,3%	,0%	2,0%
54	Nº casos	2	0	2
	%	3,3%	,0%	2,0%
58	Nº casos	5	1	6
	%	8,3%	2,6%	6,1%
59	Nº casos	1	0	1
	%	1,7%	,0%	1,0%
6	Nº casos	2	0	2
	%	3,3%	,0%	2,0%
66	Nº casos	1	0	1
	%	1,7%	,0%	1,0%
66/68	Nº casos	1	1	2
	%	1,7%	2,6%	2,0%
73	Nº casos	2	0	2
	%	3,3%	,0%	2,0%

Al correlacionar el patrón de inmunexpresión p16/ki-67 en la citología convencional con la lesión en biopsia observamos que conforme aumenta el grado de displasia cervical también lo hace la frecuencia de expresión del marcador, pasando el 5,9% de los casos con CIN1 al 66,7% de las lesiones CIN3. El cambio mas importante se advierte en el paso de lesiones de CIN2 a CIN3 (tabla 24).

Tabla 24. Relación entre lesión histológica e inmunexpresión de p16/ki-67

Lesión biopsia		p16/ki-67		Total
		Negativo	Positivo	
CIN 1	N ^a de casos	16	1	17
	%	94,1%	5,9%	100%
CIN 2	N ^a de casos	26	6	32
	%	81,3%	18,8%	100%
CIN 3	N ^a de casos	17	30	47
	%	36,2%	63,8%	100%
Ca. invasivo	N ^a de casos	1	2	3
	%	33,3%	66,7%	100%
Total	N ^a de casos	60	39	99
	%	66,6%	39,4%	100%

V. DISCUSIÓN

El cribado mediante citología cervical, introducido hace más de 50 años, ha representado uno de los mayores éxitos de la historia de la prevención del cáncer. En países desarrollados, su implantación ha permitido una reducción, en las últimas décadas, del 70-80% de la incidencia del cáncer de cérvix.¹¹⁷ Actualmente, la prevención de cáncer de cuello uterino se realiza aunando la detección y categorización de anomalías morfológicas celulares y la identificación VPH de alto riesgo por métodos moleculares.

En España, resulta difícil cuantificar de forma precisa el número de mujeres que participan en los programas de detección precoz de cáncer de cérvix, ya que la captación de pacientes para la realización de citología cervico-vaginal se hace de forma oportunista en la mayoría de las comunidades autónomas, lo que en cierta medida le resta eficiencia y calidad al procedimiento, dificultando a su vez, el poder recoger, establecer y tabular de forma adecuada todos los factores asociados a la incidencia.¹¹²

La historia natural de la infección por VPH, incluido el modelo de transmisión, desarrollo de la infección, persistencia, aclaramiento e interacción con el sistema inmune, se conoce de forma parcial aunque se ha estudiado extensamente. De ahí que, establecer pautas, para conocer en qué momento hay infección por VPH, predecir la evolución de la enfermedad, y en concreto, el momento de inicio de infección, es un reto importante en la medicina actual.¹¹⁸

Es evidente que respecto a las lesiones intraepiteliales cervicales asociadas al VPH, uno de los temas con más relevancia son el seguimiento y tratamiento para evitar la progresión de la lesión a cáncer. La duración de la

infección es difícil de determinar, varía según se considere la infección incidente (de adquisición reciente) o prevalente (cuando se desconoce el momento de la adquisición). Además, se debe añadir la opción de posibles reinfecciones,³⁷ así como otros factores dependientes del genotipo viral y del huésped. No obstante, en España, la SEGO en el año 2010 publicó unas recomendaciones en este sentido.

Son múltiples las revisiones bibliográficas que han tratado de valorar la exactitud del cribado con citología convencional comparándola con el diagnóstico histológico¹²³. Sin embargo, uno de los problemas para la comparación de series de casos de diferente procedencia es la variabilidad que existe en el tipo de estudio (prospectivo/retrospectivo, de cohorte, transversal,...), proceso de selección de los casos, la reproducibilidad en diagnóstico citológico de los ASCUS así como los sesgos relacionados con el proceso de revisión.

Esta variabilidad afecta también al estudio epidemiológico de la infección por VPH que está limitado, en parte, debida a la heterogeneidad de las poblaciones de estudio y en menor medida -pero no carente de importancia- a una ausencia de consenso en el uso de protocolos y métodos de detección de VPH universales que permitan evaluar y obtener datos comparables. No obstante, en el momento actual, la citología cervico-vaginal -tanto convencional como en fase líquida- asociada a estudios de identificación de VPH son los que aportan una información más completa de la prevalencia de la infección por VPH en las diferentes lesiones.¹¹⁹

El Proceso Asistencial Integrado (PAI) de Cáncer de Cérvix, iniciado por el Sistema Andaluz de Salud en el año 2006,² se puso en marcha en el año 2007 en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV) de

Málaga. En este trabajo, del total de 48.967 de mujeres que acudieron a centros de atención primaria o especializada pertenecientes al Área sanitaria del HUVV, desde el 1 de enero del 2008 hasta el 31 de diciembre de 2009, para estudio mediante citología cérvico-vaginal, se han seleccionado 3080 pacientes con anomalías morfológicas en el estudio citológico y estudio molecular para la determinación de VPH. En estos dos años se realizan en 298 pacientes biopsia para confirmar lesión de alto grado y conización posterior, determinando conjuntamente la presencia o ausencia de ADN viral en tejido cervical e indentificando el genotipo.

La edad media de las pacientes con anomalías en el estudio citológico fue de 35 años, siendo el grupo etáreo más representativo el de pacientes entre 25-34 años seguido por el representado por pacientes de 35 a 44 años. Estos datos, son similares a los publicados en los meta-análisis de Sanjosé et al.⁸ y Bruni et al.¹¹⁶ En este último, se valoran los resultados correspondientes a 194 estudios realizados en 59 países diferentes con una casuística total de 1.016.719 mujeres con citologías cervico-vaginales y valoración con métodos moleculares de la infección viral.

La distribución mundial de la edad en mujeres con infección por VPH puede presentar una curva bimodal en algunas regiones, con un primer pico en edades mas tempranas (coincidiendo con el inicio de relaciones sexuales), una menor prevalencia en edades medias, y un ligero aumento en edades más maduras (≥ 45 años). En nuestro estudio, este grupo de mujeres mayores de 45años (rango de edad 45-54) con citología atípica es de 223 (16,5%) en el año 2008 y 261(16,8%) en el año 2009. Estos resultados, oscilan entre el 20% publicado en series de América Central dónde este segundo pico de mujeres con infección por VPH es semejante al primero constituido por mujeres menores de 25 años⁶⁶ y el 12% observado en el

resto de Europa y en Norte América (12%), quizás debido a la instauración de programas de cribado efectivos desde hace décadas⁶⁴.

La prevalencia de la infección por VPH, en este segundo pico es realmente multifactorial y tendríamos que pensar en nuevas conductas sexuales, características virales como tipos y variantes, susceptibilidad del huésped y tipo cribado previo en estas paciente. Aunque, autores como Althoff et al.¹³¹, sugieren que la existencia de diferencias geográficas, en este segundo pico, podría explicarse, en parte, por los cambios en patrones hormonales durante la menopausia, en los cuales se produciría una posible interacción de las hormonas con el ciclo vital del VPH.

En el estudio citológico, independientemente de la edad, las lesiones más frecuentes fueron las lesiones LSIL. Concretamente, durante el año 2008, han sido diagnosticados 821 LSIL (58,64%), y en 2009 764(45,47). Las atipias de significado incierto (ASCUS), en 2008 fueron 173 (9,4%) y en 2009 215 (12,7%). Por último, las lesiones de alto grado HSIL en 2008 representaron el 3,2%, en 2009 sólo alcanzaron un 0,53%.

Esta distribución de lesiones en mujeres que participan en programas de cribado nacional sigue un patrón de distribución similar al resto de Comunidades Autónomas de España y al resto de países europeos, donde los casos de LSIL rondan el 41% y los HSIL el 1,2%.^{1;39;113}

En cuanto al porcentaje de ASCUS, que representa en esta serie un 9-12% de todas las mujeres con anomalías citológicas, observamos diferencias comparado con otros estudios europeos, en el que número de ASCUS es próximo al 25%¹²⁰. La prevalencia del ASCUS en nuestra casuística,

considerando, el número de ASCUS en relación al total de los estudios citológicos realizados es del 5%, sensiblemente superior a los datos establecidos en el año 2003 por el “American College of Pathologists surveys” donde la cifra es del 4,65%¹²¹ o con estudios más recientes, como el ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostic) HPV study, donde se describen porcentajes del 4,1%.¹²²

Los ASCUS, en nuestra serie y en otros trabajos publicados, se reconocen como una categoría cuya interpretación en citología cervico-vaginal es controvertida. El predominio de ASCUS se observó en mujeres entre 25-45 años, de forma similar a los hallazgos del estudio ATHENA realizado por Stoler et al. (2010)¹²², en el que se estudiaron 47208 mujeres americanas mayores de 21 años, con una edad media de las pacientes con diagnóstico de ASCUS de 37 años.

Los métodos moleculares para identificación del VPH tienen como objeto detectar la presencia de secuencias de ADN viral, basándose en la especificidad y complementariedad entre las bases nitrogenadas que componen los ácidos nucleicos. Una secuencia de ADN solamente hibrida de un modo muy específico con otra secuencia de ADN o ARN complementario. La forma en que se ponen de manifiesto estos híbridos, la composición de las sondas de ADN y la existencia o no de amplificación marcan las diferencias entre las distintas técnicas. En la actualidad, se dispone técnicas moleculares, sensibles, fiables y reproducibles que han mejorado notablemente los resultados que se obtenían con las técnicas iniciales ^{78;108-110}.

En nuestro trabajo, hemos utilizado la amplificación mediante PCR con iniciadores de regiones consenso (GP5+/6+), para realizar la identificación

del HPV, en la cuál se amplifica la región L1 con secuencia muy similar entre todos los HPVs, altamente conservada de 150 pb, que por su mayor sensibilidad está refrendada en diversas publicaciones^{27;127;128}.

La hibridación con sondas específicas sin amplificar previamente tiene una baja sensibilidad, y además sólo detecta VPH de alto o bajo riesgo oncogénico. La amplificación con iniciadores específicos de tipo, al amplificar un solo biotipo, resulta muy laboriosa, siendo complicado distinguir los 35 genotipos, ya que además debe ser validada para cada uno de ellos.^{127;128} Por tanto, parece mejor amplificar una zona del genoma que esté conservada en la mayoría de los genotipos que infectan mucosas, como L1, y proceder después a la tipificación^{129;130}, por métodos de hibridación en array/membrana u otros.

En el estudio ALTS publicado en 2005, se comparan datos de sensibilidad y especificidad de la PCR y la captura de híbridos (HC2). Los resultados obtenidos mostraron que la amplificación, con primer consenso PGMY09/11, tenía una sensibilidad y una especificidad clínica del 84% y el 55% mientras que con HC2 éstas fueron del 92,5% y el 51,1% respectivamente.

En nuestra casuística, de todos los casos a los que se realizó estudios de identificación de VPH por PCR en 2008 resultaron positivas 448 (34.9%) y 912 (65.1%) negativas. En el año 2009, los datos fueron similares: 601 positivas (35. 8%) y 912 negativas (65.1%). Estas frecuencias están en el rango de las publicadas en el estudio descriptivo efectuado a nivel nacional, de forma reciente y aún pendiente de publicación de Alameda et al. ¹²⁶. En este trabajo, los autores analizan los datos resultantes de una encuesta realizada a 48 hospitales nacionales, acerca del método que utilizaron para la identificación de VPH, VPH positivos y negativos así como el genotipo/os prevalentes en función del tipo de lesión citológica. Estos autores describen unos porcentajes de muestras negativas para VPH del 41 al 95% y de

positivas del 5 al 59%, donde la heterogeneidad en los métodos utilizados para valorar el VPH ha sido elevada (citología convencional, citología líquida, PCR, captura de híbridos, métodos caseros...).

Cuando relacionamos el tipo de lesión citológica con la presencia/ausencia de VPH, observamos que el mayor porcentaje de PCR positivas fueron para aquellas muestras en las que -en el estudio citológico- se refirió la persistencia de cambios coilocíticos atribuidos a VPH (64%), seguido de HSIL (48,9% en 2008, 88% en 2009), en LSIL (41% en 2008, 45% en 2009). Con mucha menor frecuencia, se identificó VPH en los ASCUS (20%) así como en las citologías normales y aquellas con cambios reactivos. El notable incremento de la tasa de HSIL con VPH, en el año 2009 se debe, fundamentalmente, a la realización de una nueva PCR con un primer consenso diferente, cuando el resultado de la interpretación citológica es de HSIL y el estudio por PCR es negativo.

Si volvemos a comparar nuestros datos con los de Alameda et al. ¹²⁶ (tabla 26), observamos que en los ASCUS y LSIL estamos en el límite inferior del rango mientras que en los HSIL, sobre todo en el 2009 estamos más próximos al límite superior.

Tabla 26. Comparación de estudios PCR positivos en las distintas lesiones

Estudio	ASCUS	LSIL	HSIL
Alameda et al. ¹²⁶	12-79%	41 -93%	36-100%
HUVV 2008	19,70%	41,2%	48,9%
HUVV 2009	20,90%	45,0%	88,0%

El 20% de VPH en ASCUS de nuestro trabajo, es una frecuencia bastante menor al 50% descrito en el estudio ALTS(ASCUS/LSIL Triage

Study).¹²⁴ Si comparamos con el trabajo de Alameda et al. ¹²⁶, aquí los VPH en ASCUS oscilaban entre el 12 al 79%. Este rango tan amplio pone de manifiesto la variabilidad existente en los criterios citológicos para caracterizar esta entidad. Quizás la categoría ASCUS, en muchas ocasiones, responda a la necesidad de identificar el VPH para poder discriminar -en citologías con rasgos cito-morfológicos semejantes- los causados por este agente y otros cambios reactivos.

En nuestra serie de casos del 2008, los genotipos más frecuentes en orden decreciente correspondieron a: 16, 51, 31, 6, 18, mientras que en el año 2009: 16, 66/68, 31, 6, 58, 18. Si comparamos estos datos con los publicados por Muñoz et al²⁷ en el año 2003 (que realiza una clasificación epidemiológica de VPH a partir de 11 estudios caso-control, de países de los cinco continentes), o con el trabajo de Bruni et al¹¹⁶ en 2010 (que analiza 194 estudios de mujeres pertenecientes a programas de cribado poblacional, estudios casos-control o bien otras pertenecientes a estudios transversales , todas con infección por VPH) y con los datos, todavía en prensa de Alameda et al. ¹²⁶ partiendo de mujeres que pertenecen al programa de cribado poblacional, observamos las siguientes similitudes y diferencias (tabla 25).

En todos los estudios revisados el genotipo 16 sigue en primer lugar como genotipo más frecuentes en las infecciones por VPH, independientemente de la edad. Pero respecto al genotipo VPH18, ha pasado de ocupar el segundo lugar en los estudios de Muñoz et al²⁷ (tabla 25) y de Bruni et al¹¹⁶ (tabla 25), a un sexto lugar en año 2008 y séptimo en el año 2009, datos similares a los del trabajo realizado por Alameda F et al¹²⁶ en 2011 en la población española (tabla 25).

Tabla 25. Comparación de frecuencia genotipos en distintos trabajos

Muñoz et al. 2003 ²⁷	Bruni et al. (dic. 2010) ¹¹⁶	Alameda F. 2011 ¹²⁶	HUVV 2008	HUVV 2009
16	16	16	16	16
18	18	31	51	66/68
45	52	58	31	31
31	31	6	6	58
52	58	52	18	18

La revisión de la bibliografía extranjera y nacional más reciente pone de manifiesto que VPH 16 es el genotipo que se repite y aparece en primera posición en todo el espectro de lesiones citológicas (ASCUS; LSIL; HSIL) (tablas 28, 29, 30). Se observa una elevada heterogeneidad para ocupar el segundo puesto, existiendo notables diferencias de genotipos entre las series atendiendo al tipo de lesión (tablas 28, 29, 30). No obstante, es preciso destacar, que el genotipo 18 no es el segundo en frecuencia -al menos en la causística española- lo cuál sugiere que será necesario disponer de una segunda generación de vacunas donde se incluyan otros genotipos de alto riesgo diferentes⁸.

Tabla 26. Datos comparativos de frecuencia de genotipos en ASCUS

Referencia	Genotipos más frecuentes
Perrons J Clin Virol 2002	16,33,35,38
Alameda et al 2011	16,58,52,31,51,6,18,66,33,56
HCVV	16, 51, 18, 31, 58, 66/68, 11

Tabla 27. Datos comparativos de frecuencia de genotipos en LSIL

Referencia	Genotipos más frecuentes
Clifford Cancer E. Biom 2005	16,31,51,53,56,52,18,58,66,6
WHO 2010	16,51,66,31,58,33,56,52,18,39
Ili, J Med Virol 2011	16,11,18,31,33,51,52,56,6
Alameda et al 2011	16,51,56,58,6,31,66,8,52, 33
HUVV	16, 66/68, 31, 51, 58, 6, 33, 53,52,59,18

Tabla 28. Datos comparativos de frecuencia de genotipos en HSIL

Referencia	Genotipos más frecuentes
Perrons J Clin Virol 2002	16,31,51,33,18,58,62
WHO 2010	16,51,31,66,33,58,52,56,18,39
Ili J Med Virol 2011	16,18,31,45,51,53,58,35,42,56
Alameda et al 2011	16,58,31,18,52,51,6,53,66,35v
HUVV	16, 33, 51, 58

Hay una gran proporción de infecciones por VPH que están producidas por múltiples genotipos. La identificación de genotipos como agente causal de las lesiones, se complica cuando se producen coinfecciones por VPH. Estudios realizados sobre la historia natural del VPH, no aportan evidencias de que exista competencia entre los diferentes genotipos de VPH que pueden colonizar el epitelio cervical, ya que el riesgo de adquirir nuevas infecciones parece no relacionarse, directamente, con la existencia de infecciones previas¹³². Quizás cuando empecemos a disponer de series amplias en casos con VPH, en población vacunada, podamos identificar los nuevos genotipos de VPH responsables de estas nuevas infecciones.

En nuestro trabajo, las mujeres con infecciones simples, es decir, por un único genotipo de bajo o alto riesgo fue del 45,5% en 2008 y 44,4% en 2009; datos similares los encontramos en mujeres con infecciones múltiples, (entendidas como infecciones por más de un genotipo de alto o bajo riesgo o infecciones mixtas por genotipos de alto y bajo riesgo), se expresaron con un 37,5% en el año 2008 y del 49,1% en el año 2009. Estos resultados contrastan, con los publicados recientemente en la revisión de Bruni et al¹¹⁶, en el que la presencia de infecciones múltiples por VPH era sólo de un 20%.

De todos los estudios moleculares realizados identificamos el 67% y el 62% de genotipos de alto riesgo, durante los años 2008y 2009 respectivamente. Los genotipos de bajo riesgo se presentaron en un 7,2% de mujeres en 2008, y un 10% en 2009. Las infecciones por genotipos de alto y bajo riesgo fueron de 25,6% en el año 2008 y de un 26,9% en el año 2009.

La prevalencia de infecciones de VPH de alto riesgo en mujeres diagnosticadas de ASCUS en el estudio ATHENA fue de 32%, mientras que en el estudio ALTS, la asociación de ASCUS con genotipos de alto riesgo fue del 48%.^{64;122} Estas variaciones en la prevalencia podrían justificarse por la metodología utilizada para la determinación del ADN viral. De estos casos sólo menos del 0.4% progresaron a lesión de alto grado confirmado por estudio histológico. Es decir, son muy pocas las lesiones atípicas que esconden, una lesión de alto grado.

En la serie de casos del HUVV, observamos una mayor proporción de multiinfecciones, en LSIL (55,9% en 2008, y 57% en 2009) y persistencia de células escamosas con atipias coilocíticas (74% en 2008 y 55,8% en

2009). Los HSIL se asociaron de manera más frecuente a infecciones por un único genotipo (77,3% en 2008 y 62% en 2009) al igual que el grupo de mujeres tratadas con conización cervical y que tras ello se le realizó un control por PCR (60%).

En la literatura los datos son controvertidos, cuando se intentan asociar las lesiones de alto o bajo grado con la infección simple o multiinfección. Trottier et al⁶³ tras un estudio basado en el cálculo del riesgo acumulado de coinfecciones tras cuatro años de seguimiento, refieren que la coinfección está relacionada de forma más importante con los HSIL que con LSIL, siempre y cuando se excluyeran las infecciones transitorias; no obstante, aún no existen evidencias claras que verifiquen que las coinfecciones generen una sinergia para la progresión de infección a lesión.⁶³

En nuestro estudio, en los casos con diagnóstico HSIL el 77,3% presentaron infección por VPH. Estas infecciones fueron simples por genotipos de alto riesgo, resultados comparables a los publicados por Kjaer et al.¹³³ Estos autores, en un estudio con 8656 mujeres VPH16 estiman la probabilidad de desarrollar una lesión de alto grado: 40% cuando el responsable era un VPH de alto riesgo o 36,4% si había infección múltiple por VPHs de alto o bajo riesgo.

Otro tema relevante en la historia natural de la infección es el significado real que tiene la presencia repetida en el tiempo de uno o varios genotipos. Algunos trabajos claves reconocen la importancia del VPH 16 y en cierta medida de los VPH 18 y 45 como responsables de persistencia y progresión. No existe consenso para determinar el tiempo necesario que debe transcurrir para definir persistencia. En este sentido, datos recientes del estudio ALTS sugieren que las mujeres afectadas por ASCUS/LSIL y

positividad persistente de ADN del VPH durante un periodo de 24 meses o más podrían ser susceptibles, con una probabilidad clínicamente significativa, de progresar a una lesión de alto grado.

En nuestro trabajo, el 40,7% de las mujeres incluidas presentaron aclaramiento de la infección viral. La edad media de las mujeres cuya infección era persistente (60,3%) fue de 32 años. En los casos con persistencia de la infección por VPH, el 34,7% mantuvo el mismo genotipo y en el 24,6% había VPH pero de diferente genotipo.

En esta serie del HUVV, las infecciones persistentes se produjeron principalmente por genotipos de alto riesgo, donde el 16 es el genotipo prevalente, seguido de 31, 66/68. Estos resultados, si los comparamos con otros estudios de persistencia publicados como el de Kjaer et al¹³³, coinciden los VPH16 y VPH 31 que según la clasificación por géneros y especies de Villiers et al¹¹ son dos tipos distintos de una misma especie (Alfa 9); pero, el genotipo VPH18 aparece en una proporción muy pequeña de pacientes.

La frecuencia de persistencia fue mayor cuando la infección era simple y por el genotipo VPH 16. En el metaanálisis de Sanjosé et al⁸, observaron que aquellas lesiones con persistencia por infecciones simples, habían progresado a lesión de alto grado o carcinoma cervical, sobre todo cuando la infección persistente era producida por VPH 45 sin otras coinfecciones. A este respecto, Vinokurova et al⁷¹ publican que los genotipos VPH 16, 18 y 45 están más integrados en el genoma humano que otros genotipos y favorece que la progresión a cáncer se produzca en menos tiempo.

De todas las pacientes con estudios citológicos realizados durante 2008 y 2009 , se les realizaron estudios histológicos a 296 mujeres, dónde 50 mujeres (16,9%) se diagnosticaron de CIN1, 73 (24,7%) de CIN2, 142(48%) de CIN3 y carcinoma invasor 30 (10%). En nuestro trabajo, el patrón de infección por VPH en biopsia en nuestro trabajo fue de un 75% para multiinfecciones y de un 25% de infección simple. Las infecciones más frecuentes en lesión histológica fueron por VPH16 como infección simple e infecciones múltiples del VPH 16 con 18, 56, 35,... sin poder precisar el número de otros genotipos de alto riesgo, y la asociación entre el número y clases de tipos virales.

Cuando se valorón la persistencia del genotipo en muestras tisulares, en relación con el que se había observado en citología, en el 80% estaba presente el genotipo 16 con un patrón de infección simple o como coinfección, siendo los genotipos acompañantes VPH18, 56, 66 y 35. Un 48% de las lesiones fueron diagnosticadas como CIN3, dato semejante a los publicados en otras series, como las Mosciki et al. ³⁴ y Schiffman et al. ¹³⁶, dónde refieren que las lesiones CIN 2 tienen una tendencia a la regresión de forma espontánea , mientras que hay un mayor porcentaje de progresión a CIN 3 cuando hay persistencia de genotipos de alto riesgo, principalmente si están presentes en la infección VPH 16 y/o VPH18.

Sanjosé et al. ¹³⁴ en 2007 realizaron un estudio retrospectivo de la relación del genotipos que puede asociarse a carcinoma cervical, dónde los genotipos 18 y 45 no se suelen asociar estudios con diagnóstico de ASCUS y es poco frecuente en LSIL, pero si que en carcinomas de aparición temprana y sobre todo en mujeres jóvenes hay una alta incidencia de casos con VPH 45, como infección simple. Los genotipos 45, 39, y 35 aparecen en lesiones de alto grado. En relación con este hecho, la proteína E7 del VPH 45 es una potente transformadora *in vitro*, datos que avalan los estudios de Muñoz et al 2003²⁷ y Clifford et al 2006⁶⁷. El VPH 45 es el tercer genotipo

de alto riesgo más prevalente que se encuentra en el carcinoma cervical con una incidencia mundial que oscila entre el 4-9% ^{27|67} y una prevalencia significativamente mayor en Sudamérica.¹³⁵

El efecto del número de genotipos de VPH de alto riesgo y CIN 2 o CIN3, es significativamente mayor, siempre que se excluyan las biopsias negativas y se considere CIN1 como una referencia categórica. Ambas comparaciones demuestran que el riesgo lineal aumenta con el número de genotipos que producen la infección independientemente de la clase oncogénica. Un aumento del riesgo se observa, no sólo en infecciones producidas por varios genotipos de alto riesgo, sino también cuando hay un infecciones producidas por genotipos de alto y bajo riesgo. Hallazgos similares se han obtenido considerando la clasificación filogenética en vez de los tipos de virus o clasificación oncogénica . Esta observación supone la noción de que infecciones adicionales contribuyen como factor de riesgo para SIL/CIN y no la infección simple, principal agente oncogénico ^{63;133}

Quizás uno de los retos actuales sea la posibilidad de tipificar aquellas lesiones de cérvix uterino que tengan mayor probabilidad de progresar a lesión intraepitelial.¹⁰² Son numerosos los marcadores celulares que se han asociado al respecto, pero hoy en día se apuesta por el uso de una técnica inmunocitoquímica con expresión dual de dos marcadores: uno de proliferación celular como es Ki-67 y un controlador del ciclo celular como es la proteína p16. La utilización de esta doble tinción, en citología convencional o en fase líquida, permite identificar aquellas células con disregulación del ciclo celular, en relación con la integración del ADN viral en la célula huésped epitelial.

En nuestra casuística, en los 100 casos de lesiones ASCUS y LSIL con estudio molecular por PCR y biopsia, hemos podido correlacionar aquellos con inmunotinción dual positiva con la progresión a lesión a CIN2+ .

Observamos co-expresión de p16 y Ki-67 en un 39,7% de las lesiones LSIL y un 50% de ASCUS. Datos publicados recientemente por Schmidt et al¹⁰² refieren cifras del 18,8% de inmunoeexpresión en ASCUS y 27,9% en LSIL. Cuando se correlacionaron estos resultados con las lesiones en biopsia, observamos un 76,9% de las citologías que progresaron a CIN3, datos similares al estudio de Schmidt et al.¹⁰²

Es necesario comentar que esta técnica de doble tinción, realizada en citología exfoliativa convencional previamente teñida con Papanicolau, presenta algunos inconvenientes. Uno de los más importantes, es el derivado del procesado previo de la muestra: es preciso retirar el cubreobjetos para proceder a la técnica de inmunohistoquímica. Este proceso requiere de, al menos, 4-5 días, en el que la muestra está sumergida en xilol. Durante este tiempo, se produce una importante pérdida de material celular, que pudiera ser de relevancia en la interpretación diagnóstica, sobre todo en muestras con escaso material lo cuál le resta rentabilidad al método. De hecho, en la literatura los trabajos están realizados fundamentalmente en material obtenido a partir de muestras de citología líquida, donde nos consta que los resultados son mucho más alentadores.

En la literatura los trabajos recientemente publicados, han evaluado la utilidad de la detección inmunocitoquímica de biomarcadores de p16/Ki67 (CINtec plus ®) como marcador potencial de displasia en preparaciones citológicas y ha demostrado¹⁰¹ un valor predictivo positivo para CIN2+ del 96% en mujeres con citología negativa / prueba de VPH positiva. La determinación de la expresión de p16 especialmente en la selección de conducta para los casos de ASCUS¹²⁶ pero también para los de LSIL, está demostrando alta rentabilidad predictiva para CIN2 +, por lo que podría incorporarse en los algoritmos de cribado. En resumen, los resultados de los estudios publicados presentan el uso de la técnica dual p16/Ki-67 en

citología cuando el diagnóstico de la citología sea dentro de la normalidad, pero se ha identificado presencia de VPH. Se ha demostrado en estudios observacionales longitudinales^{125;133;137} sobre todo en mujeres mayores de 30 años, dónde se ha demostrado un mayor número de lesiones de alto grado al realizar el estudio colposcópico, quizás se deba a el tiempo de desarrollo de lesión que puede oscilar entre 5-7 años porque existe un rango de latencia hasta de 8 años desde la infección inicial hasta la aparición del cáncer.

VI. CONCLUSIONES

1ª) En el grupo de pacientes estudiados, el genotipo 16 del virus del papiloma humano (VPH) es el más frecuente en muestras citológicas, y se presenta como infección simple o acompañado de otros genotipos.

2ª) El genotipo 18 de VPH, considerado como el segundo en importancia en la mayoría de los trabajos internacionales, en nuestra casuística ocupa un sexto o séptimo lugar (dependiendo del año), por lo que pierde relevancia epidemiológica.

3ª) Observamos una evidente asociación entre la categoría citológica de lesión y la infección por virus del papiloma humano. La presencia de VPH se advirtió en mayor proporción y, en orden decreciente, en: lesiones escamosas cervicales de alto grado (HSIL), lesiones con persistencia de cambios citopáticos compatibles con infección por VPH, lesiones de bajo grado (LSIL), en controles citológicos de pacientes con tratamiento previo por conización y cuando se observaban células escamosas atípicas de significado incierto (ASCUS).

4ª) En lesiones HSIL y ASCUS son más comunes las infecciones simples por genotipos de alto riesgo, mientras que en las lesiones LSIL observamos una mayor frecuencia de infecciones múltiples, sobre todo por genotipos de alto riesgo.

5ª) Tras dos años de seguimiento de las lesiones por VPH en muestras citológicas, encontramos una elevada frecuencia (60,3%) de casos en los que persiste la infección, que generalmente se corresponden con genotipos de alto riesgo, especialmente el VPH 16.

6ª) A la vista de la correspondencia cito-histológica, se puede inferir que el genotipo VPH 16 es el principal responsable -en nuestro medio- de las lesiones escamosas de alto grado y carcinoma incipiente.

7ª) En citología exfoliativa convencional, la valoración de lesión celular mediante la inmunexpresión de p16/Ki-67 no ha cumplido todas nuestras expectativas, quizás por problemas inherentes a la propia metodología: que conlleva una importante pérdida de material celular, que puede ser relevante para la interpretación final. No obstante, aunque el índice de inmunexpresión en el total de las lesiones fue inferior al 40%, en los ASCUS, observamos un 50% de coexpresión y en LSIL el 39,7%.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. 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;127:2893-917.
2. Consejería de Salud.Junta de Andalucía. Procesos Asistenciales Integrados. Cáncer de Cérvix. 2011.
3. Arbyn M, Cuzick J. International agreement to join forces in synthesizing evidence on new methods for cervical cancer prevention. *Cancer Lett.* 2009;278:1-2.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J.Clin.* 2005;55:74-108.
5. Lopez-Beltran A, Escudero AL, Vicioso L, Munoz E, Carrasco JC. Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients. *Br.J.Cancer* 1996;73:124-27.
6. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J.Pathol.* 1999;189:12-19.
7. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL *et al.* Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002;325:572.
8. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11:1048-56.
9. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1969;105:386-93.
10. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M *et al.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-19.

11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
12. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J.Clin.Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
13. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 2009;143:195-208.
14. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79.
15. Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;11:2101-11.
16. Shin MK, Balsitis S, Brake T, Lambert PF. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 2009;69:5656-63.
17. Hinds PW, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 1992;70:993-1006.
18. Francis DA, Schmid SI, Howley PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J.Virol.* 2000;74:2679-86.
19. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP *et al.* The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J.Virol.* 1993;67:6413-23.
20. Stoppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 1996;223:251-54.
21. Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70:2924-31.

22. Maufort JP, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2007;67:6106-12.
23. Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner 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. Halpern AL. Comparison of papillomavirus and immunodeficiency virus evolutionary patterns in the context of a papillomavirus vaccine. *J.Clin.Virol.* 2000;19:43-56.
25. Myers G, Lu H, Calef C, Leitner T. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin.Cancer Biol.* 1996;7:349-58.
26. Ong CK, Chan SY, 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.
27. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N.Engl.J.Med.* 2003;348:518-27.
28. Smith J, Herrero R, Erles K, Grimm D, Munoz 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.
29. Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez 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.
30. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int.J.Cancer* 2006;118:3030-44.
31. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3-11-S3/25.

32. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am.J.Med.* 1997;102:3-8.
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. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S *et al.* Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet.Gynecol.* 2010;116:1373-80.
35. 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.
36. de Sanjose S, Alejo M, Combalia N, Culubret M, Tarroch X, Badal JM *et al.* [Screening history in women with infiltrating uterine cancer]. *Gac.Sanit.* 2006;20:166-67.
37. Gonzalez C, Ortiz M, Canals J, Munoz L, Jarrin I, de la Hera MG *et al.* Higher prevalence of human papillomavirus infection in migrant women from Latin America in Spain. *Sex Transm.Infect.* 2006;82:260-62.
38. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P *et al.* Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357:1831-36.
39. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella 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;366:991-98.
40. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat.Rev.Immunol.* 2004;4:46-54.
41. zur HH. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:342-50.

42. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24 Suppl 1:S16-S22.
43. 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:S65-81, quiz.
44. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F *et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10:321-22.
45. Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, Vu HL, Andradi J *et al.* Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol.Oncol.* 2005;96:452-61.
46. Padilla-Paz LA. Human papillomavirus vaccine: history, immunology, current status, and future prospects. *Clin.Obstet.Gynecol.* 2005;48:226-40.
47. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S *et al.* Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N.Engl.J.Med.* 2002;346:1105-12.
48. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK *et al.* Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:2645-54.
49. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S *et al.* Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ.* 2003;168:421-25.
50. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, 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;358:1782-83.
51. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev.Med.Virol.* 2006;16:83-97.

52. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W *et al.* A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J.Infect.Dis.* 2005;191:182-92.
53. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J.Clin.Pathol.* 2002;55:244-65.
54. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr* 2003;3-13.
55. 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;362:1871-76.
56. 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.
57. 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.
58. Thomas DB, Ray RM, Qin Q. Risk factors for progression of squamous cell cervical carcinoma in-situ to invasive cervical cancer: results of a multinational study. *Cancer Causes Control* 2002;13:683-90.
59. Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol.Oncol.* 2008;110:S4-S7.
60. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002;89:191-99.
61. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. *Int.J.Mol.Med.* 2001;7:261-64.
62. Madkan VK, Cook-Norris RH, Steadman MC, Arora A, Mendoza N, Tying SK. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. *Br.J.Dermatol.* 2007;157:228-41.

63. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006;24 Suppl 1:S1-15.
64. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J.Natl.Cancer Inst.* 2005;97:1066-71.
65. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC *et al.* The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337:76-84.
66. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J *et al.* Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J.Infect.Dis.* 2005;191:1796-807.
67. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3-26-S3/34.
68. Clifford G, Franceschi S. Immunity, infection, and cancer. *Lancet* 2007;370:6-7.
69. Kovacic MB, Castle PE, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Wacholder S *et al.* Relationships of human papillomavirus type, qualitative viral load, and age with cytologic abnormality. *Cancer Res.* 2006;66:10112-19.
70. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int.J.Cancer* 2007;120:885-91.
71. 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.
72. Moreno V, Bosch FX, Munoz 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.

73. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005;6:204.
74. 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.
75. Silins I, Avall-Lundqvist E, Tadesse A, Jansen KU, Stendahl U, Lenner P *et al.* Evaluation of antibodies to human papillomavirus as prognostic markers in cervical cancer patients. *Gynecol.Oncol.* 2002;85:333-38.
76. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J.Clin.Virol.* 2005;32 Suppl 1:S16-S24.
77. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
78. Pagliusi SR, Dillner J, Pawlita M, Quint WG, Wheeler CM, Ferguson M. Chapter 23: International Standard reagents for harmonization of HPV serology and DNA assays--an update. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3-193-S3/200.
79. Molano M, Van den BA, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A *et al.* Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am.J.Epidemiol.* 2003;158:486-94.
80. Puig-Tintore LM, Torne A, Alonso I. Current techniques in screening for cervical cancer in Spain: updated recommendations. *Gynecol.Oncol.* 2008;110:S8-S10.
81. Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol.Oncol.* 2003;90:137-44.
82. Bolick DR, Hellman DJ. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep cervical cancer screening system. *Acta Cytol.* 1998;42:209-13.
83. Bernstein SJ, Sanchez-Ramos L, Ndubisi B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies

comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2001;185:308-17.

84. Monsonego J, Autillo-Touati A, Bergeron C, Dachez R, Liaras J, Saurel J *et al.* Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-centre study. *Br.J.Cancer* 2001;84:360-66.

85. Hutchinson M, Farber FL. Cost-effectiveness of new cytology technologies. *Am.J.Clin.Pathol.* 2000;113:149-51.

86. Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA *et al.* Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res.* 2002;62:6959-65.

87. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2003;127:940-45.

88. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol* 2000;182:311-22.

89. Alameda F, Fuste P, Boluda S, Ferrer L, Baro T, Marinoso L *et al.* The Ki-67 labeling index is not a useful predictor for the follow-up of cervical intraepithelial neoplasia 1. *J.Low Genit.Tract.Dis.* 2004;8:313-16.

90. Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Bol MG, Kjellevold KH, Fianne B *et al.* Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *J.Pathol.* 2003;199:462-70.

91. Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY *et al.* Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur.J.Cancer* 2001;37:1104-10.

92. Mimica M, Tomic S, Kardum G, Hofman ID, Kaliterna V, PejkoVIC L. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Int.J.Gynecol.Cancer* 2010;20:116-19.

93. Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K. Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay: correlation with biopsy follow-up results. *Cancer* 2007;111:83-92.

94. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel DM. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 2007;111:58-66.
95. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer* 2004;102:100-08.
96. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S *et al.* p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004;445:616-20.
97. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, Becattini V, Cariaggi MP, Pontenani G *et al.* Role of P16(INK4a) expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer* 2006;108:119-23.
98. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suarez H *et al.* p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am.J.Surg.Pathol.* 2006;30:1347-56.
99. Longatto FA, Utagawa ML, Shirata NK, Pereira SM, Namiyama GM, Kanamura CT *et al.* Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 2005;24:118-24.
100. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am.J.Surg.Pathol.* 2010;34:1077-87.
101. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Luthge A, Bergeron C *et al.* Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol.Oncol.* 2011.

102. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/ki-67 dual-Stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: Results from the european equivocal or mildly abnormal papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.* 2011.
103. Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A. Functional biomarkers in cervical precancer: an overview. *Diagn.Cytopathol.* 2010;38:618-23.
104. Seppo A, Jalali GR, Babkowski R, Symiakaki H, Rodolakis A, Tafas T *et al.* Gain of 3q26: a genetic marker in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of the uterine cervix. *Gynecol.Oncol.* 2009;114:80-83.
105. Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N *et al.* Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am.J.Pathol.* 2005;166:1229-38.
106. Wright TC, Bosch FX, Franco EL, Cuzick J, Schiller JT, Garnett GP *et al.* Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3-251-S3/261.
107. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reynies A, Rickman D, Thomas E *et al.* Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int.J.Cancer* 2010;126:1882-94.
108. De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J.Clin.Virol.* 2007;38:7-13.
109. Jiang M, Baseman JG, Koutsky LA, Feng Q, Mao C, Kiviat NB *et al.* Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR. *J.Clin.Microbiol.* 2009;47:521-26.
110. Ginocchio CC, Barth D, Zhang F. Comparison of the Third Wave Invader human papillomavirus (HPV) assay and the digene HPV hybrid capture 2 assay for detection of high-risk HPV DNA. *J.Clin.Microbiol.* 2008;46:1641-46.

111. Mehes G, Speich N, Bollmann M, Bollmann R. Chromosomal aberrations accumulate in polyploid cells of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). *Pathol.Oncol.Res.* 2004;10:142-48.

112. de Sanjose S, Cortes X, Mendez C, Puig-Tintore L, Torne 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.

113. Trottier H, Mahmud SM, Lindsay L, Jenkins D, Quint W, Wieting SL *et al.* Persistence of an incident human papillomavirus infection and timing of cervical lesions in previously unexposed young women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2009;18:854-62.

114. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:11-22.

115. Hatch KD, Shingleton HM, Orr JW, Jr., Gore H, Soong SJ. Role of endocervical curettage in colposcopy. *Obstet.Gynecol.* 1985;65:403-08.

116. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose 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.

117. Informe global de U.S Preventive Services Task Force (USP-STF). disponible en: <http://www.ahrq.gov/clinic/3rduspstf/cervcan//cervcanrr/.htm#clinica>). <http://www.ahrq.gov> . 2011.

Ref Type: Electronic Citation

118. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol.Oncol.* 2010;117:S5-10.

119. Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A *et al.* Long-term persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *J.Infect.Dis.* 2011;203:814-22.

120. Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, Roccio M, Dacco' MD, Silini EM. Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol.Oncol.* 2009;113:115-19.
121. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, Mody DR. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2004;128:1224-29.
122. Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am.J.Clin.Pathol.* 2011;135:468-75.
123. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD *et al.* Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann.Intern.Med.* 2000;132:810-19.
124. Franco EL, Trottier H. A new window into the natural history of human papillomavirus infection: a view from the ALTS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study) trial. *J.Infect.Dis.* 2007;195:1560-62.
125. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J.Cell Mol.Med.* 2009;13:648-59.
126. Alameda F, Marinoso ML, Bellosillo B, Muset M, Pairet S, Soler I *et al.* Detection of HPV by in situ hybridization in thin-layer (ThinPrep) cervicovaginal samples. *Tumour.Biol.* 2011;32:603-09.
127. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J.Clin.Virol.* 2005;32 Suppl 1:S43-S51.
128. van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 2001;1:394-402.

129. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J.Clin.Microbiol.* 2000;38:357-61.
130. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM *et al.* A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J.Infect.Dis.* 2001;183:8-15.
131. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L *et al.* Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10:K1-16.
132. Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J.Infect.Dis.* 2001;184:1508-17.
133. Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J.Natl.Cancer Inst.* 2010;102:1478-88.
134. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect.Dis.* 2007;7:453-59.
135. Munoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M *et al.* Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J.Infect.Dis.* 2004;190:2077-87.
136. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A *et al.* A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res.* 2010;70:3159-69.
137. Arbyn M, Simoens C, Van Oyen H, Foidart JM, Goffin F, Simon P *et al.* Analysis of 13 million individual patient records pertaining to Pap smears, colposcopies,

biopsies and surgery on the uterine cervix (Belgium, 1996-2000). *Prev.Med.* 2009;48:438-43.