

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

UTILIDAD DEL GENOTIPADO DEL VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO CON EL MÉTODO COBAS  
4800 EN LAS LESIONES INTRAEPITELIALES  
ESCAMOSAS DE BAJO GRADO (LSIL)

Doctorando: Josep M Solé Sedeño

Directores: Prof. Francisco Alameda Quitllet

Prof. Gemma Mancebo Moreno

Prof. Ramon Carreras Collado

Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia i de

Medicina Preventiva

Octubre 2013

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA

UTILIDAD DEL GENOTIPADO DEL VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO CON EL MÉTODO COBAS  
4800 EN LAS LESIONES INTRAEPITELIALES  
ESCAMOSAS DE BAJO GRADO (LSIL)

Tesis Doctoral presentada por  
Don Josep M Solé Sedeño, para optar al grado de Doctor en  
Medicina y Cirugía

Barcelona, Octubre 2013

Dedicado a

Xavier Medina por su estímulo constante a la realización de este trabajo

A mis padres por hacer posible la consecución de mis sueños

A mis amigos Arantxa, Laura y Alexis por sus ánimos en los momentos *blue*

A Gemma Mancebo no sólo por su amistad, sino también por su inestimable ayuda,  
comprensión y apoyo para el desarrollo científico de mi carrera profesional

A Misericòrdia Soronellas, mi profesora de biología en el Insituto Gaudí de Reus que me  
descubrió el apasionante mundo de la ciencia

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Profesor Ramon Carreras Collado, Jefe de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital del Mar, por su labor en la dirección de esta tesis doctoral.

Al Profesor Francisco Alameda Quillet, Jefe de Sección de Anatomía Patológica del Hospital del Mar, por su especial apoyo e inestimable ayuda desde mi incorporación a la Unidad Funcional de Tumores Ginecológicos del Hospital del Mar.

A Sílvia Agramunt, compañera y médico del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital del Mar, por su ayuda metodológica en momentos difíciles y a horas intempestivas.

A mis compañeros del PASSIR (Programa d'Atenció Sanitària a la Salut Sexual i Reproductiva), por su importante trabajo sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

A Beatriz Bellosillo Paricio, Jefa de Sección de Biología Molecular del Hospital del Mar, por su labor y gestión para la consecución de los resultados Cobas de esta tesis.

A Sergi Mojal, responsable del departamento de asesoramiento en investigación biomédica en IMIM, por su imprescindible soporte en el análisis estadístico de esta tesis.

A mis compañeros del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital del Mar, por su ayuda y comprensión durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Enric Genover Llimona, Jefe de Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de Mataró, por sus ánimos para la elaboración de esta tesis.

Al Profesor Jordi Xercavins Montosa, Catedrático de la Universitat Autònoma de Barcelona, por sus consejos y sus enseñanzas durante mi época de residente y posterior.

Al Profesor Antonio Gil Moreno, Jefe de Servicio de Ginecología del Hospital Universitari Vall d'Hebron, por haber sido un excepcional mentor en mi formación como ginecólogo oncólogo.

## SUMARIO

<b>1. Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Cáncer de cérvix .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Displasias de cérvix.....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Alteraciones citológicas .....	11
1.2.1.1. LSIL .....	11
1.2.1.2. HSIL.....	12
1.2.1.3. ASCUS y ASC-H.....	12
1.2.2. Alteraciones histológicas .....	12
1.2.3. Historia natural de las displasias cervicales.....	13
<b>1.3. El Virus del Papiloma Humano.....</b>	<b>14</b>
1.3.1. Estructura del virus .....	14
1.3.2. Genotipos virales.....	14
1.3.3. Historia natural de la infección por HPV .....	15
<b>1.4. Genotipos del HPV y su relación con las lesiones .....</b>	<b>16</b>
1.4.1. Distribución de los genotipos según el tipo de lesión.....	16
1.4.2. Genotipo y pronóstico de la infección por HPV .....	22
<b>1.5. Métodos de genotipado del HPV .....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Métodos basados en la amplificación de una señal.....	28
1.5.2. Métodos basados en técnicas de PCR .....	30
1.5.3. Consideraciones finales.....	33
<b>1.6. Breve reseña del manejo actual de las displasias escamosas cervicales .....</b>	<b>34</b>
1.6.1. Manejo de las lesiones de alto grado.....	34
1.6.2. Manejo de las lesiones de bajo grado y ASCUS.....	35
<b>1.7. Triage de las lesiones escamosas de bajo grado (LSIL) y ASCUS .....</b>	<b>35</b>
1.7.1. Triage mediante detección de HPV.....	36
1.7.1.1. Detección de HPV de alto riesgo mediante HC2.....	36
1.7.1.2. Detección de genotipos específicos .....	40
1.7.1.2. Detección de mRNA E6/E7 .....	43
1.7.2. Métodos inmunohistoquímicos .....	43
1.7.3. Consideraciones finales.....	44
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>46</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>48</b>

<b>4. Pacientes y Métodos</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1. Pacientes</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2. Definiciones</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3. Detección del Virus del Papiloma Humano</b> .....	<b>54</b>
<b>4.4. Análisis estadístico</b> .....	<b>54</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1. Población de estudio</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2. Patología cervical previa de la muestra</b> .....	<b>59</b>
<b>5.3. Datos del episodio de diagnóstico</b> .....	<b>61</b>
<b>5.4. Descripción de los resultados del método Cobas 4800</b> .....	<b>62</b>
5.4.1. Resultados globales.....	62
5.4.2. Análisis por grupos de edad .....	64
<b>5.5. Comparativa resultados HC2 versus Cobas</b> .....	<b>67</b>
<b>5.6. Evolución y resultado final de la lesión LSIL</b> .....	<b>68</b>
5.6.1. Resultados globales.....	68
5.6.2. Análisis por grupos de edad .....	69
5.6.3. Análisis según el método anticonceptivo y tabaco .....	73
<b>5.7. Distribución de los genotipos del HPV según el resultado final de la LSIL</b> .....	<b>77</b>
<b>5.8. Riesgo de los distintos grupos de genotipos para CIN2+</b> .....	<b>79</b>
5.8.1. Riesgos absolutos.....	79
5.8.1.1. Resultados globales.....	79
5.8.1.2. Resultados por grupos de edad .....	80
5.8.1.2.1. Punto de corte en los 30 años.....	80
5.8.1.2.2. Punto de corte en los 40 años.....	81
5.8.2. Riesgos relativos .....	83
5.8.2.1. Resultados Globales.....	83
5.8.2 Análisis por grupos de edad .....	85
5.8.2.1. Punto de corte en los 30 años.....	85
5.8.2.2. Punto de corte en los 40 años.....	86
<b>5.9. Riesgo de los distintos grupos de genotipos para curación de la LSIL</b> .....	<b>87</b>
5.9.1. Riesgos absolutos.....	88
5.9.1.1. Resultados globales.....	88
5.9.1.2. Resultados por edades.....	88
5.9.1.2.1. Punto de corte en los 30 años.....	88
5.9.1.2.2. Punto de corte en los 40 años.....	89
5.9.2. Riesgos relativos .....	90
5.9.2.1. Resultados globales.....	90

5.9.2.2. Análisis por grupos de edad.....	91
5.9.2.2.1. Punto de corte en los 30 años.....	91
5.9.2.2.2. Punto de corte en los 40 años.....	92
<b>5.10. Resultado del tratamiento exerético de las lesiones CIN2+ según el genotipo.....</b>	<b>94</b>
<b>5.10. Análisis del tiempo en progresar a CIN2+ .....</b>	<b>95</b>
5.10.1. Resultados globales.....	95
5.10.2. Análisis por edades .....	96
<b>5.11. Análisis del tiempo de curación de LSIL.....</b>	<b>98</b>
5.11.1. Resultados por genotipos .....	98
5.11.2. Análisis por grupos de edad .....	100
<b>6. Discusión .....</b>	<b>102</b>
<b>6.1. La muestra .....</b>	<b>103</b>
<b>6.2. Distribución de los genotipos del HPV .....</b>	<b>105</b>
<b>6.3. Comparación método Cobas con HC2 .....</b>	<b>107</b>
<b>6.4. Evolución y resultado final de la lesión LSIL .....</b>	<b>108</b>
<b>6.5. Riesgos para progresión a CIN2+ .....</b>	<b>110</b>
6.5.2. Riesgos por grupos de edad.....	115
<b>6.6. Riesgos para curación .....</b>	<b>117</b>
<b>6.7. Tiempos de evolución de las lesiones .....</b>	<b>118</b>
<b>6.8. Limitaciones del estudio.....</b>	<b>120</b>
6.9. Líneas de futuro.....	120
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>123</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>127</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>134</b>
<b>9.1. Índice de Tablas.....</b>	<b>135</b>
<b>9.2 Índice de Gráficos.....</b>	<b>138</b>
<b>9.3. Índice de Ilustraciones .....</b>	<b>139</b>

**Lista de Abreviaturas y Acrónimos**

ACO: Anticonceptivos Orales

AEPCC: Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia

ALTS: estudio para el triage de las lesiones ASCUS-LSIL(ASCUS-LSIL Triage Study)

ARC: Agencia para la investigación del cáncer (Agency for Research of Cancer)

ASSCP: Sociedad Americana de Patología Cervical y Colposcopia (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology)

ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)

ASC-H: células escamosas atípicas sugestivas de lesión de alto grado (Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL)

CI: intervalo de confianza

CIN1: neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (cervical intraepithelial neoplasia 1)

CIN2: neoplasia intraepitelial cervical grado 2 (cervical intraepithelial neoplasia 2)

CIN2+: neoplasia intraepitelial cervical grado 2 o superior

CIN3: neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (cervical intraepithelial neoplasia 3)

CIN3+: neoplasia intraepitelial cervical grado 3 o superior

DNA: ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

E6: gen de expresión temprana número 6 del virus del papiloma humano

E7: gen de expresión temprana número 7 del virus del papiloma humano

FDA: agencia de drogas y alimentos (Food and Drug Administration)

HC2: captura de híbridos 2 (Hybrid Capture 2)

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana (Human Immunodeficiency Virus)

hrHPV: virus del papiloma humano de alto riesgo (high-risk human papillomavirus)

HPV: virus del papiloma humano (human papillomavirus)

HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

IMAS: Instituto Municipal de Atención Sanitaria

IC: intervalo de confianza

lrHPV: virus del papiloma humano de bajo riesgo (low-risk human papillomavirus)

L1: gen de expresión tardía número 1 del virus del papiloma humano

L2: gen de expresión tardía número 2 del virus del papiloma humano



LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

mRNA: ácido ribonucleico mensajero (message Ribonucleic Acid)

OR: razón de posibilidades (odds ratio)

p53: proteína 53

PASSIR: Programa d'Atenció Sanitària a la Salut Sexual i Reproductiva

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

pRb: proteína del Retinoblastoma

SCC: cáncer de células escamosas (squamous cell cancer)

SEC: Sociedad Española de Citología

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

# 1. Introducción

## **1.1. Cáncer de cérvix**

El cáncer de cérvix o cuello uterino es la segunda neoplasia más frecuente entre las mujeres a nivel mundial, sobretodo por su alta incidencia en los países en vías de desarrollo, donde causa más muertes que cualquier otro cáncer (1).

Previamente a la aparición del cáncer, acontecen alteraciones citológicas e histológicas en el cérvix que permitieron a Papanicolau (2) en 1928 describir un método de cribado, la citología cérvico-vaginal con la tinción que lleva su nombre, que ha demostrado eficacia en la disminución de la incidencia del cáncer de cérvix (3). Fue este método el que permitió describir por primera vez las displasias de cérvix, cuya importancia viene dada por ser lesiones con cierto potencial de desarrollar neoplasias invasoras.

## **1.2. Displasias de cérvix**

El diagnóstico de la displasia de cérvix puede llevarse a cabo tanto a través de la citología cervical como de la biopsia de cérvix. Existe una gradación de las mismas según su gravedad la cual es útil para saber su evolución y decidir por lo tanto el manejo de las mismas. La nomenclatura citológica e histológica difieren pese a que existe una clara correlación. Describiremos en primer lugar sus características morfológicas para abordar su importancia pronóstica en el siguiente apartado. Así mismo, existen otras lesiones precursoras del adenocarcinoma de cérvix como el adenocarcinoma in situ. Nos limitaremos a describir las lesiones escamosas dado el objetivo de nuestro estudio.

### **1.2.1. Alteraciones citológicas**

Las alteraciones citológicas las clasificamos en LSIL, HSIL, ASCUS y ASC-H.

#### ***1.2.1.1. LSIL***

Acrónimo de Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado). Incluye las alteraciones patológicas de coilocitosis y CIN1. Los núcleos

celulares se encuentran aumentados de tamaño, más del triple que los de las células escamosas intermedias, con hipercromasia, cromatina compactada i contornos nucleares irregulares. No se suelen observar nucleolos. La bi y multinucleación son comunes. Además se observa un halo perinuclear amplio que da a la célula una sensación de vacío, característica denominada coilocitosis (del griego *Koilos*, que significa vacío) (4).

#### **1.2.1.2. HSIL**

Acrónimo de High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (lesión intraepitelial escamosa de alto grado). Incluiría las alteraciones CIN2 y CIN3. Se observan células escamosas parabasales o metaplásticas inmaduras. La células muestran una relación núcleo-citoplasma elevada debido al agrandamiento nuclear y a la disminución del citoplasma. Los núcleos son al menos el doble de grandes que los de las células intermedias y ocupan más del 50% de la célula. Son hipercromáticos con cromatina densa y membranas nucleares irregulares. Hay un grado considerable de anisonucleosis, pero los nucleolos son infrecuentes. El citoplasma es cianofílico (4).

#### **1.2.1.3. ASCUS y ASC-H**

Acrónimo de Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (células escamosas atípicas de significado indeterminado), y de Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL (células escamosas atípicas sugestivas de lesión de alto grado). Son alteraciones citológicas que no permiten clasificarlas en los grupos anteriores porque cuantitativamente o cualitativamente son insuficientes para dar un diagnóstico de LSIL o HSIL (4). Su importancia radica en el hecho de que pueden ocultar una lesión de alto grado. Un 10-20% en el caso de los ASCUS y un 38-66% en los ASC-H esconden una lesión CIN2 o más grave (5).

### **1.2.2. Alteraciones histológicas**

Las lesiones preinvasoras del cérvix diagnosticadas en biopsia se clasifican en CIN1, CIN2 y CIN3. Su clasificación se basa en el grosor del epitelio cervical afectado por la lesión. Así hablamos de CIN1 cuando se limita el tercio más interno, CIN2 cuando afecta el tercio interno y el medio y CIN3 cuando se encuentra afectado todo el epitelio pero con la

membrana basal íntegra (si estuviese rota ya no hablaríamos de lesión preinvasora sino de invasora) (4).

### 1.2.3. Historia natural de las displasias cervicales

El interés de esta clasificación de la lesiones preinvasoras radica en que define entidades con una diferente probabilidad de curación, persistencia y progresión a cáncer invasor. Por lo tanto permiten adecuar el seguimiento y tratamiento a cada tipo de lesión, intentando no sobretratar ni infratatar.

En un clásico metaanálisis Ostor *et al.* (6) obtuvieron los resultados reflejados en la tabla 1 en cuanto a la evolución de los distintos tipos de displasias cervicales.

**Tabla 1:** Evolución de las displasias cervicales según Ostor *et al.*

	Regresión	Persistencia	Progresión	Invasión
CIN1	57%	32%	11%	1%
CIN2	43%	35%	22%	5%
CIN3	33%	<56%	-	>12%

Melnikow *et al.* (7) hizo lo mismo con los diagnósticos citológicos de ASCUS, LSIL y HSIL, con los resultados de la tabla 2 a los dos años.

**Tabla 2:** Evolución de las displasias cervicales según Melnikow *et al.*

	Regresión	Persistencia	Progresión	Invasión
ASCUS	68.19%	sin datos	7.13%	0.25%
LSIL	47.39%	sin datos	20.81%	0.15%
HSIL	35.03%	23.37%	-	1.44%

### 1.3. El Virus del Papiloma Humano

El virus del Papiloma Humano (a partir de ahora HPV) es un virus DNA que fue relacionado por primera vez con el cáncer de cérvix por zur Hausen *et al.* (8), quienes consiguieron aislarlo en el laboratorio en 1983 por primera vez (9). Desde entonces se han acumulado las evidencias de que el HPV se encuentra implicado en la génesis del cáncer de cérvix, siendo condición necesaria aunque no suficiente para su desarrollo.

#### 1.3.1. Estructura del virus

Se compone de dos partes, el DNA circular de doble cadena y una cápside que lo envuelve. El DNA codifica las proteínas que conforman la cápside (L1 y L2<sup>1</sup>) y otras proteínas que intervienen en la replicación del DNA del virus. Dos de estas últimas, E6 y E7<sup>2</sup>, son las responsables de interaccionar con las proteínas pRb y p53, evitando la apoptosis de la célula infectada y desregulando su ciclo celular (10).

#### 1.3.2. Genotipos virales

La proteína L1 de la cápside se ha utilizado para clasificar el HPV en más de 80 tipos distintos, de los cuales unos 40 pueden infectar el tracto genital (11).

A su vez estos genotipos se agrupan en virus de alto riesgo (hrHPV) o de bajo riesgo (lrHPV). Los de alto riesgo estarían relacionados con el cáncer de cérvix, mientras que los de bajo riesgo con los condilomas acuminados.

Esta clasificación se realiza en función de la presencia o no de los distintos tipos de HPV en las lesiones de alto grado y carcinoma invasor, tal como describieron en 2003 el grupo de Xavier Bosch (11).

Actualmente se utiliza la clasificación de la Agency for Research of Cancer (ARC) para los distintos tipos de HPV que se muestra en la tabla 3 (12).

---

<sup>1</sup> L del inglés *late*, ya que son proteínas de expresión tardía

<sup>2</sup> E del inglés *early*, proteínas de expresión temprana

**Tabla 3:** Clasificación de los genotipos de HPV según la ARC

<b>Alto Riesgo</b>	<b>Genotipo HPV</b>
Carcinógenos	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Probablemente carcinógenos	68
Posiblemente carcinógenos	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82
<b>Bajo Riesgo</b>	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89

### 1.3.3. Historia natural de la infección por HPV

La adquisición de la infección del HPV es habitualmente por vía sexual, si bien la vía vertical también es posible (12). Una vez infectada, el 50% de mujeres se negativizarán para HPV a los 6 meses, 70% al año y 80-92% a los dos años, gracias a su propio sistema inmunitario (1). Estas infecciones transitorias se manifestarían en forma de lesiones LSIL. A los cuatro meses de la infección ya es posible observar estas lesiones debidas al VPH.

Algunas de estas infecciones no obstante no pueden ser eliminadas por el sistema inmune, dando lugar a una infección persistente que es la que puede provocar en última instancia un cáncer de cérvix invasor, produciendo previamente las lesiones preinvasoras CIN. Hasta el 22-27% de CIN3 no tratados progresarían a cáncer invasor a los 20 años, con una tasa anual de 1-2%. En global, el 5% de infecciones producidas por HPV de alto riesgo progresan a cáncer en poblaciones sin cribado, mientras que en poblaciones cribadas la progresión disminuye a 1-2% (1).

Sabemos según los estudios de Maucort-Boulch *et al.* (13) y Rodriguez *et al.* (14) que a mayor persistencia de la infección, menor probabilidad de que la infección pueda ser aclarada (hablamos de aclaramiento de la infección como la incapacidad de detectar lesión o HPV en la paciente, asumiendo por tanto su curación). Las pacientes mayores de 30 años tienen menores tasas de aclaramiento precisamente por ser seguramente infecciones de más larga duración (10).

Se han estudiado múltiples factores que puedan influir en la tasa de curación o progresión, pero hasta el momento los únicos claramente involucrados son la inmunodeficiencia (mujeres trasplantadas, infección por HIV) y el genotipo viral (10). Otros factores con una relación no tan establecida podrían ser los hábitos sexuales, factores reproductivos, uso de anticonceptivos orales, tabaco o la infección por *Chlamidia trachomatis* (10).

## **1.4. Genotipos del HPV y su relación con las lesiones**

Como hemos visto, el genotipo del HPV que produce la infección es un factor decisivo en la evolución de la misma. Este hecho hace pensar que la distribución de los distintos genotipos en según nos encontremos ante una LSIL o HSIL sea también distinta.

### **1.4.1. Distribución de los genotipos según el tipo de lesión**

Existen muchos estudios que demuestran precisamente que la distribución de los genotipos según la lesión, es decir, CIN1, CIN2, CIN3 o carcinoma invasor, es diferente.

Entre ellos destaca el artículo de Clifford *et al.* (15) de 2003. En dicho trabajo realizó un meta-análisis de los distintos trabajos publicados con información sobre los genotipos del HPV y su presencia en HSIL (n=4338) o carcinoma invasor de cérvix (n=8550), detectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la tabla 4 observamos dichos datos, en la que una relación SCC/HSIL superior a 1 indicaría que el virus es más frecuente en el cáncer escamoso que en la lesión de alto grado. Observaron que los genotipos 16, 18 y 45 eran los únicos que se encontraban con más frecuencia en las neoplasias invasoras que en las lesiones de alto grado (ratio SCC/HSIL superior a 1). El HPV16 fue el más frecuente tanto para HSIL como SCC (*squamous cell cancer*, cáncer de células escamosas), pero para los otros genotipos hubo cambios en la posición, siendo el HPV31 el segundo más frecuente en las HSIL mientras que en el SCC fue el HPV18.

En esa misma línea, Zuna *et al.* (16) un año más tarde presentó datos sobre la distribución de los diferentes genotipos de HPV determinados mediante PCR en muestras de citología líquida, de pacientes con lesiones de alto grado (n=55) y carcinoma escamoso (n=47).



Observaron que a mayor gravedad de la lesión el HPV16 era más frecuente, llegando en el caso del carcinoma invasor al 62%, mientras que en el CIN2 era del 26%.

**Tabla 4:** Distribución en % de los genotipos de HPV en HSIL y SCC según Clifford *et al.*

Genotipo	HSIL	SCC	SCC/HSIL ratio
16	45.0	54.3	1.21
18	7.1	12.6	1.79
33	7.2	4.3	0.59
45	2.3	4.2	1.85
31	8.8	4.2	0.48
58	6.9	3.0	0.43
52	5.2	2.5	0.48
35	4.4	1.0	0.22
59	1.5	0.8	0.55
56	3.0	0.7	0.23
51	2.9	0.6	0.20
68	1.0	0.5	0.50
39	1.1	0.4	0.35
66	2.1	0.2	0.10

**Tabla 5:** Distribución en % del HPV16 y otros hrHPV en distintas lesiones de alto grado según Zuna *et al.*

	HPV16	HPV16 y otros hrHPV	HPV16 total	hrHPV+ no 16
CIN2	15	11	26	74
CIN3	46	21	68	28
CIN2 y CIN3	31	16	47	53
Carcinoma	53	9	62	32

En los años siguientes ambos grupos de investigadores (17) (18) añadieron información estudiando esta vez las lesiones de bajo grado (LSIL) y la distribución de los genotipos en las mismas, tal como podemos observar en las siguientes tablas 6 y 7, con conclusiones muy similares.

**Tabla 6:** Distribución de los genotipos de HPV en LSIL y SCC según Clifford *et al.*

<b>Genotipo</b>	<b>LSIL</b>	<b>Carcinoma</b>	<b>SCC/LSIL ratio</b>
16	26.6	54.3	2.06
18	8.6	12.6	1.47
45	4.9	4.2	0.85
33	7.6	4.3	0.58
31	11.7	4.2	0.36
58	8.5	3.0	0.36
52	8.8	2.5	0.28
35	5.9	1.0	0.17
59	6.0	0.8	0.13
6	8.1	0.6	0.08
56	9.7	0.7	0.07
51	10.9	0.6	0.06
39	7.8	0.4	0.05
66	8.5	0.2	0.02
52	10.1	0.1	0.01

Es de destacar en los datos de Clifford *et al.* de la tabla 6 que si bien el HPV16 sigue siendo el genotipo más prevalente en LSIL, el HPV18 deja su puesto a muchos otros, siendo el segundo más frecuente el HPV33 (11.7%). Además, los únicos genotipos más frecuentes en el SCC que en la LSIL son el HPV16 y HPV18 (ratios SCC/LSIL superiores a 1).

**Tabla 7:** Distribución de los genotipos en % en distintas lesiones cervicales según Zuna *et al.*

Tipo HPV		CIN1	CIN2	CIN3	SCC
Alto riesgo	16	14.9	19.0	65.6	55.9
	18	7.5	10.3	10.9	24.7
	31	9.0	13.8	6.2	4.3
	45	4.5	6.9	3.1	4.3
Riesgo Intermedio	33	1.5	6.9	3.1	3.2
	35	4.5	13.8	9.4	3.2
	39	11.9	12.1	12.5	1.1
	51	19.4	19.0	3.1	1.1
	52	9.0	15.5	14.1	1.1
	56	14.9	5.2	4.7	1.1
	58	7.5	6.9	4.7	0
	59	7.5	12.1	3.1	2.2
	68	4.5	1.7	1.6	1.1
	82	3.0	0	0	1.1
	83	1.5	3.4	1.6	1.1
	73	4.5	3.4	1.6	2.2
Bajo riesgo	6	13.4	1.7	1.6	0
	11	6.0	0	1.6	0
	26	0	0	1.6	0
	40	1.5	1.7	0	0
	42	3.0	0	1.6	0
	43	0	0	0	0
	44	0	0	0	0
	53	16.4	12.1	6.2	0
	54	9.0	5.2	3.1	2.2
	55	4.5	5.2	4.7	1.1
HPV neg	66	16.4	6.9	4.7	0
	84	3.0	8.6	4.7	0
	-	6	1.7	1.6	6.5

Los datos presentados por Zuna *et al.* (18) en la tabla 7 corroboran la importancia de HPV16 y HPV18 en el SCC, mientras que en las lesiones de bajo grado es mucho menor, y en el caso particular de HPV18 cede su segundo puesto en el orden de frecuencia a otros genotipos.

Podemos observar algunas discrepancias en las dos tablas, pero ambas coinciden en el papel principal del HPV16 en el cáncer invasor, mientras que en las displasias de bajo grado la participación de los distintos genotipos está mucho más repartida.

Un meta-análisis aparecido en 2008 (19) analiza la presencia de los genotipos de HPV en el cáncer invasor de cérvix diferenciando la histología del carcinoma escamoso de la del adenocarcinoma de cérvix. En los anteriores trabajos, Clifford sólo contempló los carcinomas escamosos, mientras que Zuna mezcló los dos tipos histológicos. Los datos de este meta-análisis de Bosch *et al.* (19) se recogen en la tabla 8.

**Tabla 8:** Distribución de los genotipos HPV (%) en el SCC y el Adenocarcinoma, según Bosch *et al.*

Genotipo	Normal	HSIL	SCC	Adenocarcinoma
16	2.6	45.3	55.2	48.4
18	0.9	6.9	12.8	36.3
31	0.6	8.6	3.8	0.7
45	0.4	2.3	4.6	5.8
33	0.5	7.3	3.7	2.0
52	0.9	5.1	2.9	0
58	0.9	7.0	2.8	0.7
Otros	6.8	23.9	7.6	7.7

Se confirmó con estos datos la mayor proporción de HPV16 en el carcinoma escamoso de cérvix independientemente de la histología, pero más interesante es el importante aumento del HPV18 en el adenocarcinoma.

Estos datos ofrecidos hasta ahora son completamente comparables a los de nuestro medio. Con una serie mucho más reducida (n=106), Delgado *et al.* (20) estudiaron la distribución genotípica en el País Vasco. Como aspecto novedoso destacaríamos el hecho de que incluyeron al análisis la categoría de ASCUS que no se había contemplado en los anteriores estudios, sin embargo no diferenciaron los resultados de las displasias de alto grado con las del carcinoma, restando potencia al trabajo, ni reportaron si entre sus datos se encontraba algún adenocarcinoma. Sus datos se encuentran reflejados en la tabla 9.

**Tabla 9:** Distribución genotipos HPV en el País Vasco según Delgado *et al.*

Genotipo	ASCUS	LSIL	HSIL/SCC
16	22.8	31.3	57.1
51	17.1	21.9	0
53	14.3	21.9	0
42	8.6	25	14.2
52	8.6	18.7	0
39	14.3	9.4	0
18	11.4	9.4	0
58	5.7	15.6	0
66	2.9	12.5	14.2

Y ya para finalizar, se ha observado que la distribución genotípica varía también según el tipo histológico del cáncer invasor. En un trabajo reciente publicado, Alemany *et al.* (21) estudiaron 1043 casos de carcinoma de cérvix de seis regiones españolas (ocurridos entre el 1940 y el 2007) observando dichas diferencias, tal como se refleja en la tabla 10.

El genotipo 16 del HPV sigue siendo el más frecuente en todas las histologías, pero la proporción del resto varía de manera interesante. El genotipo 18 es mucho más frecuente en aquellas variedades con componente de adenocarcinoma, y algunos genotipos que se hallan en el carcinoma escamoso no se han encontrado en los otros tipos.

**Tabla 10:** Distribución de genotipos de HPV en el cáncer de cérvix invasor según el tipo histológico, según Alemany *et al.*

Total		SCC	Adenocarcinoma		Adenoescamoso		Otros	
HPV	Total	%	HPV	%	HPV	%	HPV	%
<b>16</b>	66.5	66.3	<b>16</b>	71.9	<b>16</b>	46.7	<b>16</b>	83.3
<b>18</b>	5.9	6.4	<b>18</b>	22.0	<b>18</b>	20.0	<b>58</b>	16.7
<b>33</b>	5.8	4.3	<b>45</b>	3.1	<b>31</b>	6.7		
<b>31</b>	3.4	3.7	<b>35</b>	1.5	<b>35</b>	6.7		
<b>45</b>	3.4	3.4	<b>51</b>	1.5	<b>45</b>	6.7		
<b>35</b>	2.5	2.6			<b>52</b>	6.7		
<b>52</b>	2.2	2.3			<b>68</b>	6.7		
<b>56</b>	1.7	1.8						
<b>51</b>	1.5	1.6						
<b>39</b>	1.2	1.3						
<b>58</b>	1.1	1.1						
<b>73</b>	1	1.0						

(modificada de Alemany, se muestran sólo los genotipos con presencia superior al 1%)

#### 1.4.2. Genotipo y pronóstico de la infección por HPV

Todos los trabajos expuestos en el anterior apartado apoyan la idea de que algunos genotipos tienen mayor capacidad para hacer progresar la lesión. De ahí se planteó la hipótesis de que las infecciones producidas por algunos determinados genotipos (sobre todo el 16) conllevarían mayor riesgo de progresión a carcinoma invasor, mientras que otros genotipos serían más fácilmente aclarados por lo que no se encuentran, o en mucha menor proporción, en las neoplasias invasoras.

Muchos estudios han explorado esta hipótesis. Algunos han calculado odds ratio (OR) a través de estudios de casos-controles, y otros han llevado a cabo estudios prospectivos. Entre ellos destacaríamos el de Muñoz *et al.* (11), quienes calcularon la odds ratio para cáncer invasor para distintos genotipos, cuyo objetivo real era permitir la clasificación de genotipos poco frecuentes en alto o bajo riesgo. Utilizaron para ellos datos de 11 estudios caso-control, de 9 países distintos, con 1918 casos de cáncer de cérvix y 1928 controles. Definieron como virus de alto riesgo aquellos con una OR de 5 o superior, y que el valor

inferior del intervalo de confianza fuera al menos de 3, u aquellos detectados en casos pero no en controles. Sus resultados se recogen en la tabla 11.

**Tabla 11:** Riesgo de SCC según el genotipo de HPV, a partir de Muñoz *et al.*

<b>Genotipo HPV</b>	<b>OR</b>
<b>Ninguno</b>	1.0
<b>16</b>	434.5 (278.1-678.7)
<b>18</b>	248.1 (138.1-445.8)
<b>45</b>	196.6 (91.7-425.7)
<b>31</b>	123.6 (53.5-286.0)
<b>52</b>	200.0 (67.8-590.1)
<b>33</b>	373.5 (46.7-2985.8)
<b>58</b>	114.8 (45.1-292.6)
<b>35</b>	73.8 (26.4-206.5)
<b>59</b>	419.2 (54.2-3242.4)
<b>51</b>	66.5 (20.0-221.0)
<b>56</b>	45.1 (14.0-145.3)
<b>39</b>	-
<b>73</b>	106.4 (11.4-991.8)
<b>68</b>	53.7 (4.4-650.1)
<b>6</b>	4.3 (0.5-38.4)
<b>11</b>	11.2 (1.0-128.0)
<b>81</b>	-

En el 2005, Khan (22) utilizó los datos de la cohorte Kaiser Permanente de Portland para estudiar el riesgo de CIN3 o más (a partir de ahora CIN3+) a los 10 años. Dicha cohorte se componía de 20810 mujeres, reclutadas entre abril de 1989 y noviembre de 1990 para un estudio de cohortes sobre el HPV y el cáncer de cérvix. Se les realizó una determinación de la presencia de HPV con la técnica de captura de híbridos 2 (HC2), y a las que eran portadoras se estudiaron para HPV16 y 18. Se siguieron durante 10 años y se relacionó el resultado de la detección de HPV y de la citología inicial con la aparición de patología

cervical. Los resultados fueron más significativos un el subgrupo mayor de 30 años que analizaron, cuyos valores se reflejan en la tabla 12.

**Tabla 12:** Tasa de incidencia acumulada (en %) de CIN3+ a los 10 años, según el genotipo de HPV y el resultado de la citología al inicio del reclutamiento, en las pacientes de 30 años o más, según Khan *et al.*

Genotipo	CIR (tasa incidencia acumulada de CIN3+) (95% CI)			
	Normal	ASCUS	LSIL	Total
16	20.7 (8.6-32.8)	7.7 (0.0-22.2)	30.0 (1.6-58.4)	20.1 (9.7-30.6)
18	17.7 (0.0-36.0)	0.0	0.0	15.4 (0.0-31.7)
no16no18	1.5 (0.3-2.7)	6.4 (0.0-13.4)	4.0 (0.0-11.7)	1.8 (0.6-3.0)
hrHPV neg	0.5 (0.3-0.7)	3.3 (0.1-6.6)	9.1 (0.0-26.1)	0.5 (0.3-0.8)
Total	0.8(0.5-1.0)	4.2(1.3-7.1)	11.1(1.5-20.7)	

Observaron que el valor predictivo positivo para CIN3+ si el resultado de la prueba para HPV16 era positivo era de 20.1, mientras que dicho valor para el resultado citológico de LSIL era de 11.1. Es decir, el resultado HPV16 predice mucho mejor la futura aparición de una lesión CIN3+ que una citología LSIL. Combinando los resultados, observaron que una citología LSIL con HPV16 tenía 7.5 veces más probabilidades de evolucionar a CIN3+ que si la infección era de un virus de alto riesgo distinto al 16.

A similares conclusiones llega el estudio de Castle *et al.* (23) de 2005, si bien con un seguimiento más corto de 2 años, realizó. Muestras de 5060 mujeres con citología ASCUS o LSIL fueron testadas para HPV mediante HC2 y genotipadas con PCR para estudiar por separado las infecciones por HPV16, calculando la Odds Ratio para CIN3+. Como se recoge en la tabla 13, la OR para HPV16 es mayor que la de la citología LISL o la de otros virus de alto riesgo, confirmando los resultados previos de Khan *et al.* Así mismo, la edad de la paciente no parece influir en la evolución de la infección en este trabajo.



**Tabla 13:** Odds ratio para CIN3+ según distintos parámetros, según Castle *et al.*

OR (95% intervalos de confianza, IC)	
Según HPV	
HPV negativo	1.0 (referente)
lrHPV	2.6 (1.2-5.6)
hrHPV no16no18	7.4 (4.2-13)
HPV16	38 (22-68)
Según citología	
ASCUS	1.0 (referente)
LSIL	2.9 (1.1-7.7)
Edad al inicio	
<30 años	1.0 (referente)
≥30 años	0.86 (0.66-1.1)

No sólo el HPV16 se ha demostrado que influye en la evolución de las lesiones cervicales. Destacamos el estudio de Berkhof *et al.* (24) en el que analizaron además de la influencia del genotipo 16 en la evolución de las lesiones la de otros virus de alto riesgo. A partir de 44102 mujeres de un programa de screening para el cáncer de cérvix en Holanda, seleccionó aquellas con un resultado positivo para HPV y que tuviesen una citología normal o ASCUS-LSIL. Estudiaron entonces la aparición de CIN2+ y de CIN3+ a los 18 meses, en relación al tipo viral que infectaba. Analizaron así mismo esta relación tanto en infecciones con un solo virus, como aquellas en las que intervenían más de uno. Los datos respecto a las de un solo virus son a nuestro parecer más correctas para conocer la influencia del genotipo, y se reportan en la tabla 14.

Independientemente del resultado de la citología, el riesgo de CIN3+ para la infección por HPV16 es la más elevada de todos los genotipos. Para CIN2+ el HPV31 y el HPV33 conllevan también un riesgo elevado. En los datos aportados por el artículo, el riesgo para CIN2+ y CIN3+ para el HPV18 sí que son significativos cuando tenemos en consideración la infecciones por más de un genotipo, pero para infecciones aisladas los datos no son significativos ( $p=0.07$ ).

**Tabla 14:** Riesgo acumulado a los 18 meses para CIN2+ y CIN3+ según el genotipo de HPV y el resultado de la citología inicial, según Berkhof *et al.*

	Riesgo para CIN2+		Riesgo para CIN3+	
	% (95% IC)		% (95% IC)	
	Citología normal	ASCUS-LSIL	Citología normal	ASCUS-LSIL
hrHPV	14(11-18)	34(28-40)	7(5-10)	21(16-27)
16	<b>31(22-41)</b>	<b>46(35-58)</b>	<b>17(10-26)</b>	<b>39(29-51)</b>
hrHPV no16	8 (5-12)	28(21-36)	3(2-6)	12(8-18)
18	18(5-41)	43(20-73)	9(0-30)	13(7-53)
31	11(4-23)	<b>44(26-64)</b>	7(2-19)	<b>34(16-57)</b>
33	<b>25(8-54)</b>	<b>50(23-76)</b>	<b>13(0-40)</b>	21(6-52)
35	6(0-33)	20(10-70)	6(0-32)	10(0-70)
39	0(0-17)	10(0-57)	0(0-17)	10(0-57)
45	0(0-8)	13(0-47)	0(0-8)	7(0-43)
51	13(0-44)	24(10-50)	0(0-13)	5(0-32)
52	14(4-38)	16(0-50)	0(0-13)	8(0-46)
56	0(0-8)	13(0-44)	0(0-8)	6(0-40)
58	0(0-11)	46(17-80)	0(0-11)	0(0-26)
59	0(0-28)	0(0-84)	0(0-28)	0(0-84)
66	3(0-19)	0(0-31)	0(0-9)	0(0-31)
68	0(0-52)	33(0-58)	0(0-52)	0(0-41)

Nota: en cursiva y en negrita los resultados significativos.

Finalmente destacaríamos un trabajo de Bulk *et al.* (25) sobre la misma población holandesa. Estudiaron no sólo el efecto del resultado de la citología y HPV en el momento de inicio del estudio para desarrollar CIN2+ o CIN3+, sino que añadieron los resultados de dichas pruebas en el control de los seis meses.

De los resultados mostrados en la tabla 15 podemos obtener conclusiones muy interesantes. Independientemente del resultado inicial, si a los seis meses la citología es normal y no se identifica HPV en las muestras el riesgo para desarrollar una lesión de alto grado es prácticamente nulo. No se trata de una infección persistente y por lo tanto es

lógico el resultado. El riesgo en el caso de la infección por HPV 16 o 18 (en este trabajo se analizan conjuntamente) siempre son mayores que los de la infección por otros virus de alto riesgo. Este riesgo puede llegar a ser hasta 9 veces superior en el caso de citología inicial normal con HPV positivo, y a los seis meses citología ASCUS+ con HPV positivo. En los casos de citología alterada con HPV negativo a los seis meses el riesgo no es cero, esto podría ser debido tanto a una toma de la muestra incorrecta para la determinación del HPV, o un falso negativo de la PCR. Los autores esgrimen estas causas y confirman los casos de falsos negativos utilizando otro *primer*<sup>3</sup> para la PCR.

**Tabla 15:** Riesgo para CIN2+ y CIN3+ según resultado citológico y para determinación de HPV basal y a los 6 meses, según Bulk *et al.*

<b>Resultado al inicio</b>	<b>Resultado a los 6 meses</b>	<b>Riesgo para CIN2+ % (95% IC)</b>	<b>Riesgo para CIN3+ % (95% IC)</b>	
N y HPV+	N y HPVneg	1.3(0.0-2.4)	0.0(0.0-2.4)	
	ASCUS+ o HPV+	41(31-53)	24(16-35)	
	16 o 18	N y HPVneg	3.9(0.6-24.3)	0.0(0.0-7.7)
		ASCUS+ o HPV+	65(50-80)	45(31-63)
no16no18	N y HPVneg	0.0(0.0-3.4)	0.0(0.0-3.4)	
	ASCUS+ o HPV+	20(11-35)	5.4(1.4-20)	
ASCUS y HPVneg	N y HPVneg	0.0(0.0-1.1)	0.0(0.0-1.1)	
	ASCUS+ o HPV+	11(5.1-23)	7.5(2.9-19)	
ASCUS y HPV+	N y HPVneg	0.0(0.0-8.4)	0.0(0.0-8.4)	
	ASCUS+ o HPV+	48(38-59)	28(20-38)	
	16 o 18	N y HPVneg	0.0(0.0-34)	0(0.0-34)
		ASCUS+ o HPV+	58(44-73)	47(33-62)
no16no18	N y HPVneg	0.0(0.0-1.1)	0.0(0.0-1.1)	
	ASCUS+ o HPV+	39(38-53)	14(7.4-27)	

Nota: ASCUS+ incluye ASCUS, ASC-H y LSIL

<sup>3</sup> El *primer* es la porción de ADN escogida para amplificar en la técnica de PCR.

En definitiva, lo que todos estos estudios coinciden es que la infección por HPV16 conlleva un riesgo mucho mayor de progresión de las lesiones preinvasoras. Es precisamente este dato el que ha llevado al planteamiento de la posibilidad de utilizar la genotipificación de HPV16 como método de triage. Previamente a desarrollar esta idea abriremos un paréntesis para hablar de las técnicas de detección con genotipado del HPV.

## 1.5. Métodos de genotipado del HPV

Las técnicas de genotipado del HPV se basan en la detección de material genético (ya sea DNA o RNA) que es específico para un determinado tipo de virus.

Podemos dividir las técnicas existentes (26) en:

- métodos por sonda directa: utilizados clásicamente, como el Southern Blot, pero hoy en día no usados por su baja sensibilidad, el alto tiempo invertido en el proceso que conllevan y la necesidad de grandes cantidades de DNA altamente purificado.
- amplificación de señal: en donde encontramos el Hybrid Capture 2
- técnicas de PCR

Describiremos a continuación las técnicas aprobadas por la FDA a día de hoy.

### 1.5.1 Métodos basados en la amplificación de una señal

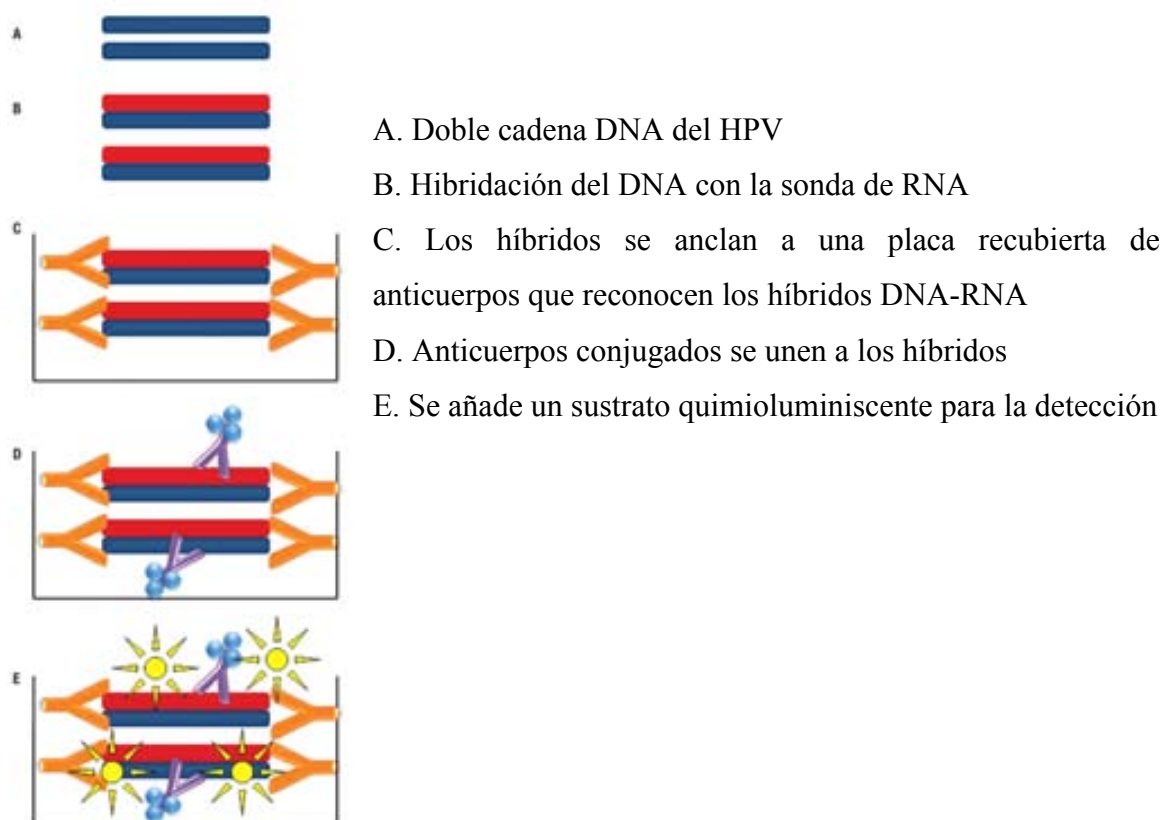
#### *1.5.1.1. Hybrid Capture 2 (HC2, Digene Corp., USA) (26)*

HC2 fue el primer método de detección de HPV aprobado por la FDA estadounidense para su uso clínico en 1999.

Consiste en dos tipos de cócteles de sondas: una para la detección de 13 virus de alto riesgo (en concreto 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), y la otra para la detección de 5 virus de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44). El resultado que se obtiene es la positividad para virus de alto riesgo y/o bajo riesgo, sin especificar el genotipo en

concreto. Podemos usar las dos sondas, o bien sólo una dependiendo de nuestro objetivo. Hoy en día se suele utilizar sólo la sonda para virus de alto riesgo ya que es la única cuya información tiene relevancia clínica.

Estas sondas son de RNA específicas para determinadas partes del genoma del HPV, por lo que se producen híbridos RNA-DNA que son detectados mediante un anticuerpo marcado con una molécula quimioluminiscente. Es por tanto un inmunoensayo.



**Ilustración 1:** Representación gráfica de HC2, extraído de Arney Gráfico extraído de Arney (27)

#### 1.5.1.2. Cervista HPV HR (Hologic, Inc., Marlborough, MA, USA) (28)

Cervista usa también un método de amplificación de la señal, y la fluorescencia para su detección. Detecta 14 virus de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) y al igual que el HC2 no permite genotipar individualmente los virus.

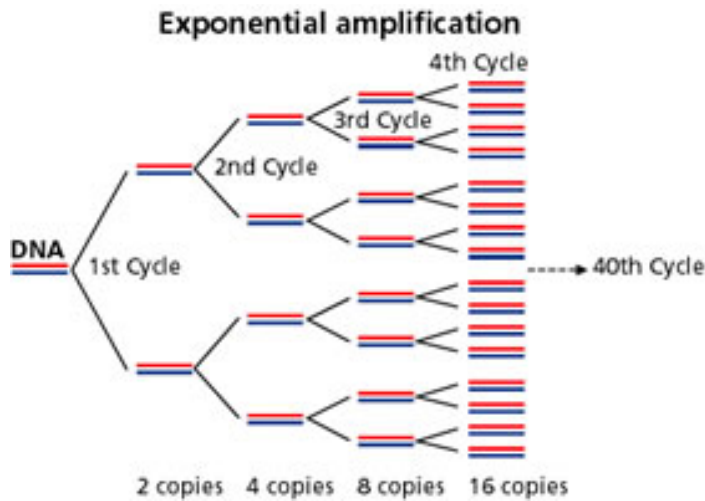
Aporta como novedad un control interno para validar que existe suficiente DNA en la muestra para hacer el test (reduciendo los falsos negativos) y una reactividad cruzada con genotipos de bajo riesgo menor (29). En comparación con el HC2, Cervista ha demostrado una sensibilidad del 100% para la detección de CIN3, y un 98% para la detección de CIN2, con menos falsos positivos (28).

Existe una versión de esta técnica (Cervista HPV 16/18) que sólo detecta los genotipos 16 y 18.

### **1.5.2. Métodos basados en técnicas de PCR**

Existen múltiples kits comerciales basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero los únicos aprobados actualmente por la FDA son el COBAS 4800 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA) y APTIMA HPV (Gen-Probe, San Diego, CA, USA).

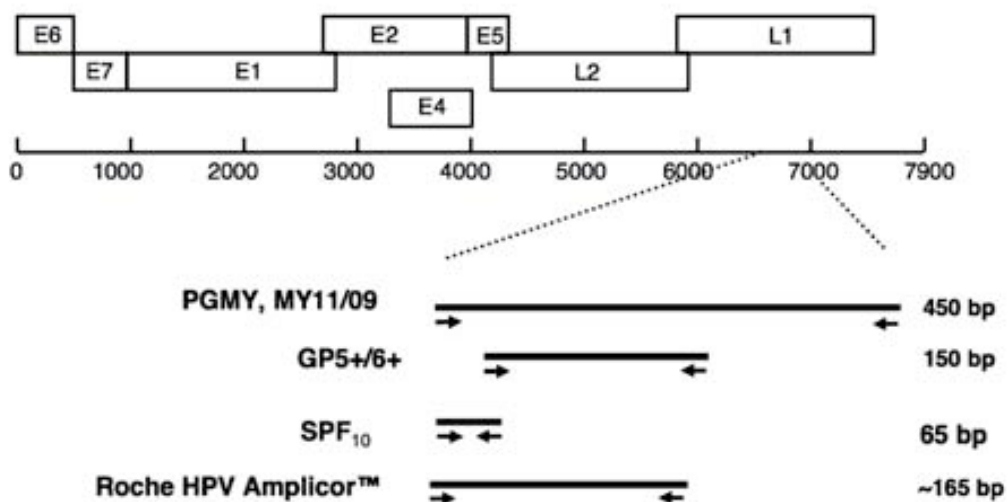
La técnica de PCR se basa en la amplificación de un fragmento de DNA usando el enzima PCR polimerasa. Dicho fragmento se selecciona a través de las regiones de DNA inmediatamente antes y después del mismo. Se utiliza un fragmento de DNA (denominado *primer*) de dichas regiones que flanquean la región deseada. Se crea así una reacción en cadena que amplifica el fragmento que nos interesa. Esto permite que, teóricamente, se produzcan un millón de copias a partir de una única molécula de DNA de doble cadena después de tan solo 30 ciclos. Presenta como inconveniente que una mínima contaminación de la muestra pueda producir falsos positivos, dada la facilidad en amplificar la muestra (30).



**Ilustración 2:** Esquema de la Reacción en cadena de la Polimerasa

El análisis de los productos amplificados puede realizarse de diversas maneras: gel de electroforesis, dot blot, line strip hybridization, secuenciación directa del DNA.

La sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCR pueden variar mucho dependiendo de la regiones que se amplifican, es decir, de los *primer* que se usen para la amplificación. Este es uno de los principales aspectos en el que se diferencian varias de las pruebas que se basan en la PCR. Diferentes tipos de *primers* se pueden observar en la ilustración 3.



**Ilustración 3:** Varios de los *primers* usados para la detección de HPV por PCR

(de <http://dellybeandairy.wordpress.com/2011/02/06/hpv-detection/> )

Existe una variante de la PCR llamada Real-time PCR. Combina los *primers* con sondas fluorescentes permitiendo obtener un resultado cuantitativo (27). Es un método muy reproducible, rápido y aplicable a muestras clínicas (28).

#### **1.5.2.1. COBAS 4800 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA)**

Este método, que es el que se utiliza en esta tesis, consiste en una técnica Real-time PCR para detectar 14 virus de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). La particularidad es que, en vez de darnos un resultado global como los métodos anteriormente descritos, detecta de forma aislada el HPV16, el HPV18, y los 12 restantes virus de alto riesgo los agrupa en un mismo resultado (28). Es el único test de los aprobados que permite dicha discriminación, lo cual es sumamente interesante como veremos en el siguiente capítulo.

Ha sido validado para el triage en el ASCUS (31), del que hablaremos en el siguiente apartado, y existen numerosos estudios que han demostrado que la sensibilidad y especificidad para la detección de CIN2+ en pacientes con citología con alteraciones menores no es inferior a la aportada por el HC2 (32), confirmando la validez del test.

#### **1.5.2.2. APTIMA HPV (Gen-Probe, San Diego, CA, USA)**

Aptima HPV se basa en la detección de RNA, y no de DNA como todos los métodos anteriores. Su propósito es detectar RNA mensajero (mRNA) producto de la transcripción de los genes E6 y E7 del HPV. Estos son los genes implicados en la transformación maligna de la célula, y por tanto, su detección podría ser un buen indicador de las lesiones preinvasoras con más probabilidad de evolucionar a cáncer invasor (28).

En concreto APTIMA detecta el mRNA E6/E7 de 14 virus de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), y nos ofrece un resultado global sin genotipar específicamente.

En un reciente meta-análisis en el que se comparaba este test con el HC2 se observó que APTIMA aportaba una sensibilidad comparable a la del HC2 para detectar CIN2+ o CIN3+ en mujeres con ASCUS o LISL, y que la especificidad era un 19% mayor para ASCUS, y un 37% mayor para LSIL (33).



Un test que también detecta mRNA E6/E7 pero que todavía no está aprobado para su uso clínico es el PreTect HPV (34), el cual detecta el mRNA de 5 hrHPV (16, 18, 31, 33 y 45).

### **1.5.3. Consideraciones finales**

Además de los métodos expuestos anteriormente, existen muchos más en estudio, algunos de los cuales recibirán también la aprobación de la FDA para su uso clínico.

En un trabajo reciente Cuzick (35) comparó seis tests para la detección de HPV: HC2, Cobas4800, Aptima, y de los nos descritos anteriormente el Abbot RealTime High Risk HPV (Abbot Molecular GmbH&Co, Wiesbaden, Alemania), el BD HPV test (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) y el PreTect HPV-Proofer (NorChip, Klokkarstua, Noruega). Todos los tests excepto NorChip mostraron una alta sensibilidad para CIN2+ y CIN3+. Los resultados positivos en citologías normales fueron similares para todos los tests excepto para Aptima, sugiriendo quizás una mayor especificidad. No obstante, como remarcan los autores, todavía no está demostrado que un resultado negativo en una prueba de RNA (como lo es Aptima) ofrezca un valor predictivo elevado de patología cervical en el futuro. PreTect HPV mostró una menor sensibilidad pero con mayor especificidad (sólo detecta cinco virus de alto riesgo), por lo que podría ser útil en estrategias de triage.

El resumen de las técnicas descritas podría ser el que reflejamos en la tabla 16. Es interesante observar que el HPV66, clasificado hoy en día como virus de alto riesgo, no es detectado por el HC2 mientras que los tests más nuevos lo incorporan.

**Tabla 16:** Resumen de los tests aprobados por la FDA para detección de HPV

Tests	Genotipos detectados	Tipo de técnica
HC2	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68	Amplificación de señal - DNA
Cervista HPV HR	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, <b>66</b> y 68	Amplificación de señal - DNA
Cervista HPV 16/18	16, 18	Amplificación de señal - DNA
Cobas 4800 HPV	16 18 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, <b>66</b> y 68	Real-time PCR - DNA
Aptima HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, <b>66</b> y 68	PCR - RNA

## 1.6. Breve reseña del manejo actual de las displasias escamosas cervicales

### 1.6.1. Manejo de las lesiones de alto grado

Según el protocolo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC), la Sociedad Española de Citología (SEC) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), publicado en el 2006 (36), un resultado citológico de HSIL obliga a realizar una colposcopia con el fin de poder realizar una valoración exhaustiva del cérvix y poder practicar biopsias dirigidas para llegar a un diagnóstico histológico y su tratamiento correspondiente.

El último consenso por parte de la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASSCP) aparecido en el año 2012 coincide con el mismo manejo (37).

En estos casos, el riesgo de progresión a cáncer invasor se considera suficientemente elevado como para hacer un tratamiento excisional, a menudo en forma de conización.

### **1.6.2. Manejo de las lesiones de bajo grado y ASCUS**

En el manejo del ASCUS, el estudio ALTS (38) demostró que la determinación del HPV era un buen método de triage para discriminar qué pacientes deberían continuar con el cribado habitual, y cuáles requerían una evaluación inmediata. Este efecto se observó de mayor magnitud en la mujeres de 29 años o mayores.

Dado que según este estudio el riesgo de CIN2+ en pacientes ASCUS HPV+ es el mismo que en el caso de citología LSIL, el manejo de ambos resultados es el mismo. Tanto el protocolo español(39) como el americano (37) recomiendan la realización de una colposcopia para descartar patología mayor a CIN1.

### **1.7. Triage de las lesiones escamosas de bajo grado (LSIL) y ASCUS**

Ya en 1991, en el Bethesda Workshop, surgieron voces sugiriendo el estudio de alternativas al manejo del ASCUS y LSIL (40). El motivo con todo lo expuesto hasta ahora parece claro. Ambas son alteraciones citológicas que en la mayoría de los casos regresarán sin producir ninguna patología más grave, salvo una pequeña proporción que progresarán a CIN2+. Además, el manejo de esta mayoría de casos supone un consumo innecesario pero importante de recursos humanos, tecnológicos y económicos. Este consiste en realizar colposcopias y citologías periódicas de control, o bien a los 2 años de seguimiento realizar una conización, que podría tratarse de un tratamiento innecesario en el caso de ser una de las lesiones que nunca fuera a progresar (40).

En los últimos años se está tomando en consideración también los posibles daños psicológicos derivados del diagnóstico de estas lesiones menores. Según Saslow (41):

"The potential harms associated with detecting these transient lesions include the anxiety associated with a "positive" cancer screening test, potential stigmatization from the diagnosis of a sexually transmitted infection, discomfort from additional diagnostic and treatment procedures, bleeding from treatment, and, longer term, an increased risk of pregnancy complications such as preterm delivery due to treatment."

Es por esto que han empezado a aparecer trabajos en que el número de colposcopias necesarias para detectar una lesión de alto grado se considera una medida del daño sobre la paciente de la estrategia a estudio. Así como la detección de CIN3+ es un resultado subrogado del beneficio de un programa de cribado, se considera el número de colposcopias un resultado subrogado el potencial daño que se pueda producir.

Otro aspecto importante que también se tiene en cuenta para valorar un posible método de triage es su coste-efectividad del protocolo propuesto. Una estrategia de triage con una relación pobre coste-efectividad no sería implantable a nivel poblacional y carecería por tanto de interés.

La mayor parte de los ensayos realizados con este fin estudian tanto el triage de citologías ASCUS como LSIL, englobándolas bajo el concepto "lesiones citológicas cervicales menores". Es difícil por lo tanto estudiar únicamente los métodos para las LSIL, tanto por la escasez de datos como porque muchas veces los resultados no se ofrecen aislados de los ASCUS.

Describiremos los trabajos agrupados según el método propuesto de triage, los cuales han sido:

- detección de HPV
  - de alto riesgo con HC2
  - genotipado para virus específicos
  - detección de mRNA E6/E7
- métodos inmunohistoquímicos

### **1.7.1. Triage mediante detección de HPV**

#### ***1.7.1.1. Detección de HPV de alto riesgo mediante HC2***

El estudio más importante realizado con esta prueba de triage es el estudio ALTS (ASCUS-LSIL Triage Study), realizado a finales de los años 90 y publicado en el 2003. Su realización surgió a partir de la inquietud expresada en el Workshop de Bethesda en 1991 de la necesidad de triage para este tipo de lesiones. Fue un estudio multicéntrico,

randomizado, que reclutó a 3488 mujeres con ASCUS y 1572 con LSIL, y a las que controlaron durante 2 años. Se compararon tres estrategias de triage para ambos tipos de citologías: realizar una colposcopia inmediata, seguimiento citológico (y colposcopia sólo si aparecía una citología HSIL) o bien determinación de HPV de alto riesgo (hrHPV) mediante HC2 (y colposcopia si era positivo). La variable de resultado fue la capacidad para detectar CIN3+ (40).

Sus resultados para los casos ASCUS demostraron que el triage con HPV ofrecía la misma sensibilidad que la colposcopia inmediata, pero reduciendo el número de colposcopias. En un subgrupo formado por pacientes de 29 años o más, observaron que la sensibilidad era idéntica pero el número de colposcopias realizadas era mucho menor. La sensibilidad obtenida para detección de CIN3+ en la colposcopia inmediata fue de 55.9%, mientras que en el grupo manejado con citologías de control fue del 48.4%.

No obstante, en el LSIL concluyeron que el triage con HPV no era posible, ya que hasta el 85% de pacientes eran positivas para virus de alto riesgo. No tenía sentido un triage en el que tan alta proporción de pacientes necesitaban una colposcopia, y además con un gasto sobreañadido como es la detección de HPV. Por ese motivo ese brazo del estudio fue cerrado antes de tiempo. El número de colposcopias realizadas en cada brazo se reflejan en la tabla 17.

Las conclusiones de este estudio llevaron a las diferentes sociedades científicas (36,42) a recomendar la determinación del hrHPV en los resultados ASCUS de pacientes no jóvenes (la edad de corte varía según la región) y a realizar una colposcopia inmediata en el LSIL.

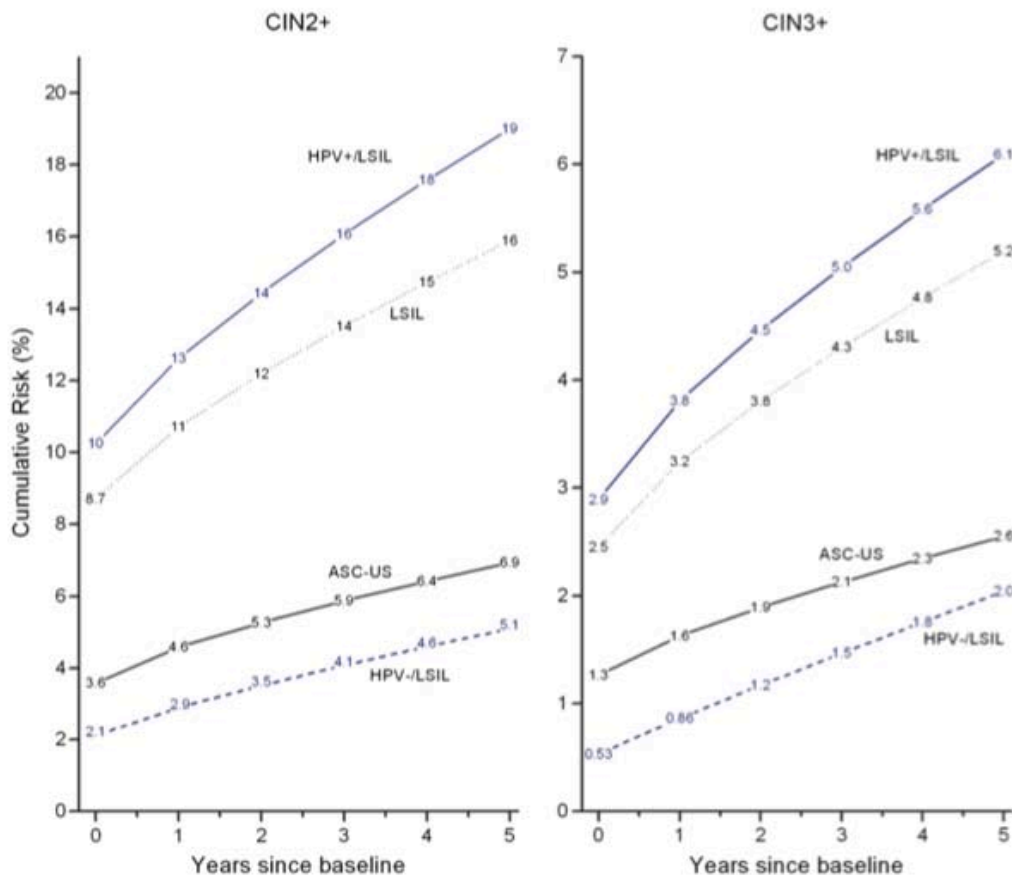
Estos resultados se vieron confirmados por un meta-análisis realizado posteriormente por la Cochrane (43). Confirmaron la alta tasa de hrHPV en los casos de LSIL (76%), siendo excepcionalmente elevada en mujeres jóvenes (más del 80%), con lo que su uso no estaría recomendado.

**Tabla 17:** Número de colposcopias realizadas y CIN3+ detectados en cada rama del estudio ALTS

	ASCUS		ASCUS 29+		LSIL
	Número de colposcopias	CIN3+	Número de colposcopias	CIN3+	Número de colposcopias
Colposcopia inmediata	100%			100%	100%
Triage con HPV	56%	95%	31%	94%	85%
Citología de control	8%	44%	50%	91%	14%

Nota: N. colp es el número de colposcopias realizada, ASCUS 29+ es el subgrupo formado por la pacientes con 29 años o más

Recientemente Katki *et al.* (44) ha publicado un nuevo análisis sobre la cohorte del estudio Kaiser Permanente Northern California (KPNC). En dicha cohorte, a partir de los 30 años se realizaba citología y determinación de hrHPV por HC2 en el 2003. Un total de 9374 mujeres fueron diagnosticadas de LSIL, y son las analizadas en este trabajo. Encontraron una positividad para hrHPV del 81%. Al analizar el riesgo acumulado de CIN2+ y CIN3+ a los 5 años, dependiendo del resultado citológico y de la determinación del hrHPV, obteniendo las curvas del gráfico 1.



**Gráfico I:** Riesgo acumulado para CIN2+ y CIN3+ entre mujeres de 30 a 64 años, según la citología y resultado HPV basales, según Katki *et al.*

Observamos claramente que el riesgo tanto para CIN2+ como para CIN3+ de los casos de LSIL positivos para hrHPV es claramente superior a si el hrHPV es negativo, y que su determinación nos permite separar la cohorte LSIL en un grupo de alto y otro de bajo riesgo. Pese a estos resultados, Katki concluye que el triage con hrHPV no es recomendable, ya que la alta tasa de positividad para hrHPV hace que sea una estrategia poco efectiva. Se basa en dos consideraciones: primero el 80% o más de mujeres con LSIL acabarían recibiendo una colposcopia; segundo como el riesgo añadido que ofrece la determinación de hrHPV no es muy superior al de la citología LSIL sin saber el resultado de hrHPV, parece más efectivo realizar la colposcopia directamente a todos los LSIL.

No obstante, comparando el riesgo de CIN3+ de los distintos resultados citológicos de cribado con las recomendaciones actuales de control, nos aporta una interesante consideración, como observamos en la tabla 18.

**Tabla 18:** Riesgos para CIN3 según citología y HPV, clasificados según el nivel de riesgo utilizado en las guías clínicas para determinar la actitud ante el resultado del cribado, según Katki *et al.*

Recomendación actual según citología	Riesgo a 5 años según citología			Riesgo a 5 años según co-test		
	Citología	% en 30-64a	Riesgo CIN3+	Co-test	% en 30-64a	Riesgo CIN3+
Colposcopia inmediata	LSIL	0.97	5.2	HPV+/ASCUS	1.1	6.8
				HPV+/LSIL	0.81	6.1
Control a los 6-12 meses	ASCUS	2.8	2.6	HPV-/LSIL	0.19	2.0
Control a los 3 años	PAP-	95.6	0.26	HPV- /ASCUS-	1.8	0.43

En los casos HPV-/LSIL, el riesgo de CIN3 a 5 años es similar al del ASCUS sin saber el resultado del HPV (2.0 vs 2.6). En el caso de un resultado ASCUS en una citología de cribado sin saber si existe la presencia de HPV, hoy en día la recomendación es hacer controles. Entonces, por qué no plantear el mismo seguimiento en los casos HPV-/LSIL, es decir, realizar controles pero sin la necesidad de hacer una colposcopia? Es lo que denominamos "para un mismo riesgo, una misma actitud". El problema de este cambio de protocolo es que realmente afectaría a una proporción muy pequeña de pacientes (0.19% en este estudio), con lo que se plantean dudas de su utilidad y del coste que conllevaría (determinar HPV en todas las LSIL) para tan poco beneficio.

#### ***1.7.1.2. Detección de genotipos específicos***

Tras lo expuesto anteriormente se deduce que el genotipado del HPV causante de las lesiones LSIL podría ser de gran utilidad en el triage de las mismas. De esta manera, genotipando para HPV16 identificaríamos aquellas lesiones con un mayor riesgo de progresión a CIN2+ (como hemos visto en el punto 4.2), y además la prevalencia de HPV16 será mucho menor al 80% del hrHPV (visto en el punto 4.1), uno de los problemas con el que nos encontrábamos con el triage con hrHPV.



El primer gran ensayo a explorar esta opción fue el ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) (45). Este es un estudio no diseñado para el triage de lesiones cervicales, sino para la validación del método COBAS 4800 comparándolo con el gold standard que es el HC2. Para ello diseñaron un estudio prospectivo que reclutó a 47208 mujeres mayores de 20 años. De ellas el 4.1% presentaron ASCUS en la primera citología de control, siendo este subgrupo el que se utilizó en la validación de la técnica COBAS 4800. En un 5.1% de pacientes se encontró CIN2, y en un 2.9% CIN3. Si nos centramos en las pacientes positivas para HPV16 y/o 18, estos valores ascendieron a un 44% para CIN2 y un 61% para CIN3. Obtuvieron una misma tasa de detección de CIN2+ y CIN3+ que con HC2 por lo que el método se consideró validado. A diferencia del estudio ALTS, pudieron ofrecer datos de riesgo para CIN2+ y CIN3+ para cada uno de los grupos detectados por Cobas 4800.

**Tabla 19:** Riesgo absoluto para CIN2+ y CIN3+ en citologías ASCUS en pacientes de más de 20 años, según el estudio ATHENA

<b>Cobas 4800</b>	<b>Riesgo Absoluto CIN2+ (95% IC)</b>	<b>Riesgo Absoluto CIN3+ (95% IC)</b>
HR-HPV+	14.0 (11.3-17.3)	8.4 (6.3-11.1)
HPV-16+/HPV-18+	24.4 (18.7-31.3)	15.9 (11.2-22.0)
HPV-16+	31.5 (24.2-40.0)	20.0 (14.0-27.7)
HPV-18+	4.3 (1.2-14.5)	4.3 (1.2-14.5)
HPVno16no18	8.6 (6.0-12.1)	4.4 (2.7-7.2)
Negativo	0.75 (0.4-1.5)	0.28 (0.1-0.8)
Global	5.1 (4.1-6.3)	2.9 (2.2-3.9)

Como se puede observar en la tabla 19, las pacientes ASCUS HPV16 tienen un riesgo casi 4 veces mayor de CIN2+ que las que son positivas para otros virus de alto riesgo, y en el caso de CIN3+ la diferencia todavía es mayor, de casi 5 veces más. Si bien como ya hemos comentado, el estudio no se diseñó para evaluar la utilidad del Cobas 4800 en el triage de ASCUS, los autores en la discusión plantean dicha posibilidad.

Si tomamos como referencia la asunción de algunos grupos como el de Castle *et al.* (46), en la que se afirma que cualquier situación en la que exista un riesgo superior al 10% de CIN3+ requeriría una colposcopia inmediata, según los resultados del estudio ATHENA el genotipado del HPV nos permitiría identificar precisamente estos casos que serían tributarios de seguimiento más intensivo o incluso tratamiento inmediato en pacientes no cumplidoras.

Si bien los resultados del estudio ATHENA muestran que el riesgo absoluto para pacientes con ASCUS y HPVno16no18 es de 4.4, con un límite superior del intervalo de confianza de 7.2, los autores concluyen que se necesitan aún más estudios para poder asumir con seguridad que estas pacientes no necesitan de un estudio colposcópico inmediato y/o un seguimiento. Orientan su discusión más a recomendar aumentar los controles en el caso de positividad para HPV16, que a relajarlos en los restantes casos. Proponen por ejemplo repetir la colposcopia si la inicial es normal, o bien tratar directamente a la paciente si ésta no es cumplidora con el seguimiento propuesto.

Gage *et al.* (47) en 2013 recuperó los datos del estudio ALTS (38), y los analizó de nuevo estratificándolos según la positividad para HPV16, HPV16 y 18, y HPV 16, 18 y 45. Encontró una prevalencia del 21.1% para HPV16+, 30% para HPV16/18 y 34% para HPV16/18/45, como vemos mucho menor al 80% conocido de hrHPV. En cuanto al riesgo a 2 años de CIN3+ el máximo valor lo ofrecía la detección de HPV16, que fue de 48.6% en mujeres de 30 años o más, y de 37.9% en mujeres jóvenes (diferencia no significativa). Añadiendo la detección de HPV18 y HPV45 el riesgo de CIN3+ disminuyó en las pacientes positivas, mientras que no varió en las negativas, por lo que no aportaba utilidad clínica la adición de dichos genotipos. En los casos hrHPV positivos excluyendo 16, 18 o 45, el riesgo de CIN3+ fue de 7.8%, pero con un margen de confianza del 95% que superaba el 10%. Es precisamente este dato el que les llevó a recomendar no usar el genotipado para el triage del LSIL dado que superaría el nivel de corte para realizar una colposcopia, según Castle *et al.* (46). Según este análisis, la positividad para hrHPV excluyendo HPV16, 18 y 45 supera ese dintel, con lo que ese aumento de riesgo observado para HPV16 no alteraría la conducta.

### **1.7.1.2. Detección de mRNA E6/E7**

Con la misma finalidad de mejorar el triage de las lesiones ASCUS y LSIL, existen estudios que valoran el papel de la detección de mRNA en la estimación del riesgo de desarrollo de lesiones de alto grado.

Existen trabajos publicados con el método PreTect HPV para el triage de ASCUS y LSIL. En un estudio comparando PreTectHPV con Amplicor HPV (un test que detecta DNA de hrHPV) observaron que un resultado negativo de Amplicor HPV aporta seguridad para plantear el siguiente control a los 3 años (48). No obstante, con PreTect, la especificidad del cual se observó mayor, el valor predictivo negativo era demasiado bajo como para devolver a la paciente el cribado habitual. En dicho estudio no analizan por separado las citologías ASCUS de LSIL, por lo que no es posible saber si aporta alguna información relevante en el campo del LSIL.

Arbyn *et al.* (33) ha publicado recientemente un meta-análisis de los estudios que han comparado HC2 con APTIMA HPV (recordemos que detecta mRNA de 14 hrHPV, ver tabla 16) en el triage de ASCUS y LSIL. Observan que la sensibilidad de APTIMA es similar a la de HC2 para detectar CIN2+ y CIN3+, a la vez que la especificidad es un 19% superior en global (mucho más para ASCUS, 37%). Concluyen por tanto que APTIMA es útil para el triaje de ASCUS, y también LSIL. No obstante, dicha afirmación se basa sólo en la mejora de la especificidad hallada, sin tener en cuenta el riesgo de CIN3+ en las pacientes LSIL con resultado positivo. Tampoco discuten la proporción de pacientes LSIL que son positivas para APTIMA, que en algunos estudios alcanza el 50% (49).

### **1.7.2. Métodos inmunohistoquímicos**

La detección de la proteína p16, junto o separada de la de Ki-67, se ha postulado también como un método de triage de las citologías ASCUS o LSIL. Estas proteínas alteran su presencia cuando el HPV infecta y transforma la célula, pudiendo ser un marcador de su progresión. La detección conjunta de p16 y Ki-67 (también conocido como tinción dual) se realiza mediante la técnica CINtec PLUS (Roche mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany).

Tsoumpou *et al.* (50) comparó CINtec PLUS (pero sólo para detección de p16), la detección de HPV16 o 18 y la de hrHPV en el triage de LSIL en 216 mujeres. Tal y como podemos observar en la tabla 20 la p16 alcanzó una sensibilidad muy baja comparada con la detección viral, por lo que este grupo concluyó que p16 no era útil para el triage por su baja sensibilidad.

**Tabla 20:** Parámetros de las diferentes pruebas para detección de CIN2+, según Tsoumpou *et al.*

	hrHPV	HPV16/18	p16
Sensibilidad	75%	44%	42%
Especificidad	64%	90%	90%
Valor Predictivo Positivo (VPP)	56%	73%	71%
Valor Predictivo Negativo (VPN)	81%	71%	71%

En 2011 Schmidt *et al.* (51) valoró el papel CINtec Plus (tinción dual) como método de triage en los casos de ASCUS y LSIL. Analizaron 776 pacientes y obtuvieron una sensibilidad para CIN2+ del 92.2% para ASCUS y del 94.2% para LSIL, con una especificidad del 80% para ASCUS y del 68% para el LSIL. La positividad de la técnica para LSIL es del 48-60%, lo cual permitiría usarla para un triage. No obstante añaden que la interpretación de la positividad de p16 es subjetiva y no bien estandarizada, lo que lleva a resultados dispares en otros trabajos. No aportan datos tampoco del riesgo de progresión de las lesiones para poder evaluar la diferencia en la necesidad de colposcopias o no.

### 1.7.3. Consideraciones finales

Hemos visto que el triage de las lesiones citológicas ASCUS y LSIL constituye un importante campo de estudio debido a sus importantes implicaciones clínicas y pronósticas. Las pacientes con LSIL son sometidas a un número de exploraciones muy importante que en la mayoría de los casos se demuestran como innecesarias. La posibilidad de detectar entre todas aquellas pacientes las que realmente tienen un riesgo real de

desarrollar una lesión de alto grado, permitiría adecuar de manera mucho más individualizada las decisiones de manejo diagnóstico y terapéutico en estos casos.

La reciente y constante aparición de nuevas técnicas que mejoran, de una u otra forma, la información aportada por la citología o la simple detección de la presencia de hrHPV puede suponer una gran ayuda en el cambio de enfoque de dichas situaciones.

## 2. Hipótesis

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El diagnóstico de una lesión de LSIL en una paciente obliga actualmente a la realización de una colposcopia con biopsia dirigida (si se observan imágenes patológicas) para descartar la presencia de una lesión CIN2+ subyacente. Si se descarta la lesión de alto grado, se somete a la paciente a controles semestrales en espera de una más que probable regresión espontánea de su lesión.

La evidencia obtenida en los últimos años de que muchas de estas lesiones tienen un bajo riesgo de progresión ha hecho plantearse la búsqueda de métodos de cribado para las LSIL, con objeto de identificar las lesiones con alto riesgo de progresión.

La aparición de técnicas automatizadas y fácilmente reproducibles para la determinación y genotipado de determinados HPV de alto riesgo, tales como el COBAS 4800, permite plantear un posible papel de las mismas en el triage de las lesiones LSIL, descartada en un principio por la alta prevalencia de los mismos en este tipo de lesiones.

Con el motivo de estudiar si uno de estos nuevos métodos, en concreto el Cobas 4800, podría ser de utilidad en el triage de las LSIL iniciamos este trabajo, formulando la siguiente hipótesis de trabajo:

La detección del Virus del Papiloma Humano 16 (HPV16) mediante el método Cobas en la lesiones escamosas de bajo grado (LSIL) permite identificar los casos con mayor riesgo de progresión a lesión CIN2+.

### 3. Objetivos



*Objetivo principal:*

Calcular el riesgo de progresión a CIN2+ (absoluto y relativo) de las lesiones LSIL de cérvix uterino producidas por el HPV16.

*Objetivos secundarios:*

1. Conocer las características de las pacientes con LSIL de nuestra área de influencia, en el período de tiempo estudiado.
2. Estudiar la distribución de genotipos de HPV en las lesiones LSIL, agrupando los mismos según el resultado de la técnica COBAS en HPV16, HPV18, HPV alto riesgo excluyendo 16 y 18 (HPVno16no18), ausencia de detección de HPV mediante COBAS (HPVneg).
3. Estudiar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos para HPV obtenidos mediante la técnica COBAS, y relacionarlos con los obtenidos por HC2.
4. Describir la historia natural de la LSIL en nuestras pacientes: tasas de regresión persistencia o progresión de la enfermedad.
5. Relacionar el resultado final de la LSIL con la edad de la paciente y otros factores epidemiológicos.
6. Relacionar el resultado final de la LSIL (progresión a CIN2+, persistencia o regresión) con el tipo viral de HPV que produce la lesión.
7. Calcular el riesgo absoluto y relativo según el genotipo de HPV para progresión de la lesión a CIN2+, y según la edad de la paciente.
8. Calcular el riesgo absoluto y relativo según el genotipo de HPV para regresión de la lesión, y según la edad de la paciente.

9. Relacionar el resultado anatómico-patológico de las piezas de conización de las pacientes tratadas por el diagnóstico de CIN2+ en biopsias dirigidas por colposcopia, con los genotipos virales.
10. Calcular el tiempo medio en el que la lesión LSIL regresa o progresa.
11. Analizar la progresión a CIN2+ de la lesión LSIL en el tiempo según la edad de la paciente.
12. Analizar la resolución de la lesión LSIL en el tiempo según la edad de la paciente.
13. Analizar la progresión a CIN2+ de la lesión LSIL en el tiempo según el tipo viral de HPV que produce la lesión.
14. Analizar la resolución de la lesión LSIL en el tiempo según el tipo viral de HPV que produce la lesión.

## 4. Pacientes y Métodos

#### 4.1. Pacientes

Las pacientes incluidas en el estudio son todas aquellas que fueron diagnosticadas de una lesión cervical de bajo grado (LSIL) en el área de influencia del Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria de Barcelona (IMAS), entre el 1 de enero de 2011 y el 30 de setiembre de 2011, en su citología de cribado.

Se incluyeron aquellas pacientes que:

1. No tenían patología cervical previa en los últimos tres años
2. No disponían de controles citológicos anteriores. Es decir, en su primera citología es en dónde se detectó la lesión LSIL.

Por lo tanto, las pacientes con citología o biopsia cervical patológica en los tres últimos años fueron excluidas. Entendemos por citología patológica una citología anormal con detección de HPV, ASCUS HPV+, LSIL o HSIL.

Además, sólo se incluyeron aquellas pacientes de las que disponíamos un seguimiento correcto. Entendemos por seguimiento correcto un período de tiempo mínimo de 2 años o bien hasta su curación o progresión.

Incluimos en nuestro estudio las pacientes seropositivas para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV+) recogiendo dicho dato.

Sintetizando, los criterios de inclusión fueron:

1. Pacientes con citología de cribado de LSIL en nuestra área de influencia
2. Citologías anteriores normales en los 3 años previos, o ausencia de controles anteriores
3. Seguimiento correcto hasta su curación, progresión, o de dos años en los casos de persistencia

Las pacientes fueron controladas en su mayor parte en los servicios de Atención Primaria de Ginecología y Obstetricia. La citología fue recogida por un médico ginecólogo o una comadrona, en un vial de ThinPrep con 30 ml de PreservCyt (Hologic, Marlborough, MA, U.S.A.). La muestra fue remitida al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar, dónde se analizó.

Según nuestro protocolo, las pacientes fueron recitadas para realizar una colposcopia en el momento del diagnóstico del LSIL, practicándose una biopsia en el caso de observar alguna lesión.

Las pacientes fueron controladas cada 6 meses mediante citología. El diagnóstico de HSIL durante el seguimiento motivó la realización de una nueva colposcopia, y el de CIN2+ por biopsia su derivación a la Unidad de Patología Cervical del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital del Mar, donde se llevó a cabo un tratamiento exerético mediante conización. Al finalizar los dos años de seguimiento, si la paciente continuaba presentando una LSIL se derivó para su tratamiento por persistencia de la misma.

Si durante el seguimiento el resultado de una citología fue normal, se recitó a los seis meses para practicar un nuevo control antes de remitirla a los controles habituales.

La información se recogió a través de la historia clínica informatizada del IMAS, que incluye el Hospital del Mar y los centros de atención primaria ginecológica adscritos al mismo previa autorización del comité ético.

## **4.2. Definiciones**

La evolución del LSIL se clasificará en curación, persistencia o progresión.

Definimos como:

- curación los casos con la presencia de dos citologías normales en un año separadas por seis meses.
- persistencia cuando la lesión LSIL se mantiene durante los dos años del seguimiento, o bien la citología de control es ASCUS HPV+. Si, fuera de protocolo, en alguna de las citologías normales de seguimiento se determinó el HPV de alto riesgo, y fue positivo, consideramos persistencia de la lesión. De todos modos, repetimos los análisis considerando las pacientes con citología normal y HPV positivas curadas, y los resultados no variaron (datos no mostrados).
- progresión la definimos como el diagnóstico de CIN2, CIN3, carcinoma in situ de cérvix o carcinoma invasor (agrupados como CIN2+) mediante biopsia dirigida por colposcopia.

### **4.3. Detección del Virus del Papiloma Humano**

Dado que en nuestra área se realiza la citología líquida, la muestra se recogió en un vial de ThinPrep con 30 ml de PreservCyt (Hologic, Marlborough, MA, U.S.A.). En el mismo vial se estudió la citología, y en los casos con resultado de LSIL se llevó a cabo la determinación de HPV, sin necesidad de recitar a la paciente.

El método de detección del HPV fue el test "Cobas 4800 HPV test" (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Es un estudio cualitativo in vitro para la detección de 14 genotipos de HPV de alto riesgo. Los resultados identifican por separado a los virus HPV16 y HPV18, agrupando el resto de 12 genotipos de alto riesgo en un mismo grupo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

En algunos casos de LSIL no se realizó el método COBAS sino el Hybrid Capture 2 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) por diversos motivos. En estos casos comprobamos la existencia del vial de ThinPrep congelado en nuestro biobanco, y de ser así, realizamos el método COBAS4800 previa descongelación del mismo.

La información obtenida con el método COBAS no se utilizó en la toma de decisiones clínicas, aunque sí que fue dada a conocer al ginecólogo encargado del seguimiento de la LSIL.

### **4.4. Análisis estadístico**

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de las pacientes calculando las medias y las desviaciones estándar para las variables cuantitativas, y frecuencias y porcentajes para las cualitativas.

Se realizó el test de Ji al cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher, según fuera apropiado, para el análisis de la relación entre variables categóricas, calculando además el riesgo relativo y sus intervalos confianzas en las tablas de contingencia que lo requerían.

Los resultados del genotipado según el método Cobas se agruparon para su análisis en las siguientes categorías:

- HPV16: pacientes con detección de HPV16, independientemente de la presencia de otros virus de alto riesgo
- HPV18: pacientes con detección de HPV18, independientemente de la presencia de otros virus de alto riesgo
- HPVno16no18: pacientes con detección de virus de alto riesgo, excluyendo las pacientes que además pudiesen estar infectadas por HPV16 y/o HPV18
- hrHPV: pacientes con infección por un virus de alto riesgo (engloba las tres categorías anteriores)
- HPVneg: pacientes en la que el método Cobas no detectó ningún virus de alto riesgo

Estudiamos la distribución de los distintos genotipos por grupos de edades de 10 años, y haciendo dos agrupaciones en dos puntos de corte distintos, a los 30 y 40 años.

Para la comparación de los métodos de detección de HPV HC2 y Cobas 4800 utilizamos el índice kappa, y calculamos sus sensibilidades, especificidades y valores predictivos positivos y negativos. Se calcularon los riesgos absolutos y relativos con sus respectivos intervalos de confianza del 95% para cada uno de los posibles resultados del test Cobas 4800. Se estudió el tiempo hasta la progresión mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer, aplicando el test de Log-Rank para comparar las supervivencias según la presencia de los distintos genotipos.

Se asumió la significancia estadística con un valor de P inferior a 0.05.

Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS Versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) para MacOSX.

## 5. Resultados



## 5.1. Población de estudio

La muestra objeto de estudio estuvo formada por 188 pacientes con citología de cribado de LSIL, diagnosticadas entre el 1 de enero de 2011 y el 30 de septiembre de 2011. De ellas se excluyeron 37 por haber presentado alguna citología patológica (ASCUS HPV+ o más) previa, sin tener dos citologías normales posteriores, y 8 se excluyeron por falta de seguimiento. Por lo tanto la muestra de estudio finalmente fueron 143 mujeres. En la tabla 21 observamos los principales datos de la muestra a estudio.

La edad media de las pacientes fue de  $33.8 \pm 11.1$  años, con una mediana de 31 años, la distribución de las edades de la cuales se pueden observar en la ilustración 5. De las 143 un 10.5% eran post-menopáusicas.

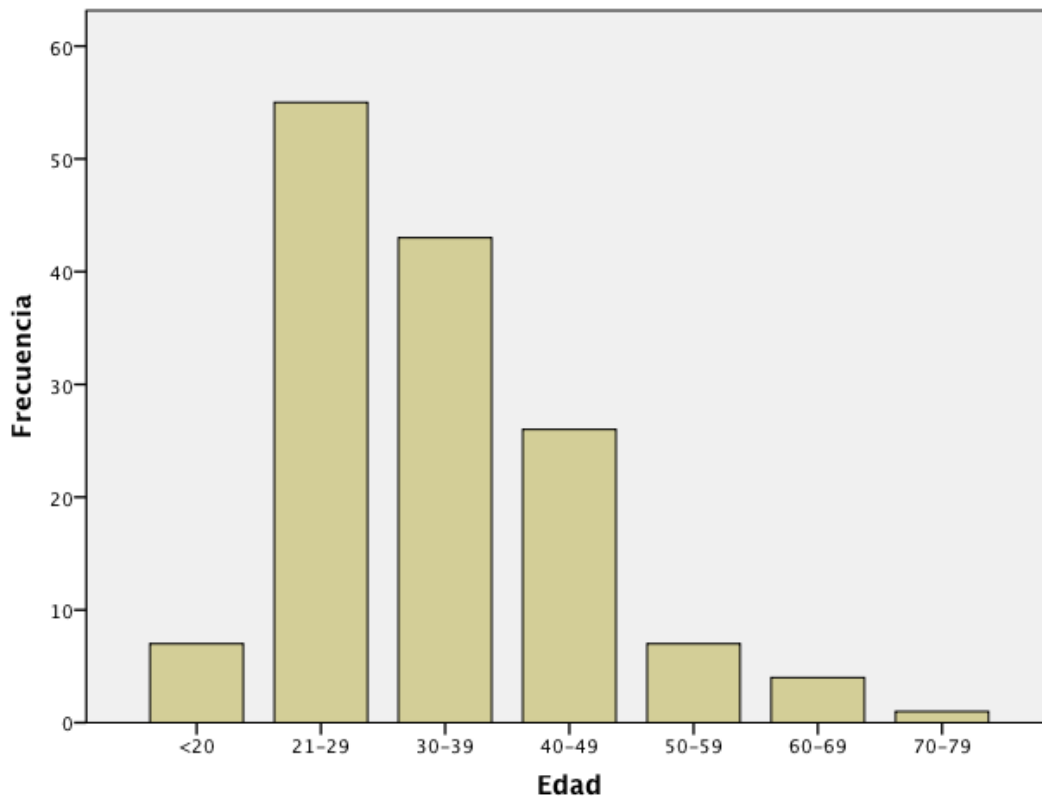
Cinco de las pacientes presentaban algún tipo de inmunodepresión, o se encontraban inmunocomprometidas. De éstas, una paciente estaba recibiendo tratamiento quimioterápico (esquema CHOP) por un linfoma. El resto eran pacientes seropositivas para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). De ellas, solamente una presentaba una carga viral indetectable. El resultado final de estas cuatro pacientes fue variado, dos pacientes se curaron de la LSIL, una persistió y la última evolucionó a CIN3, por lo que no se han analizado de manera independiente.

El tiempo medio de seguimiento fue superior a 2 años ( $29.4 \pm 17.3$  meses), siendo el mínimo de 1 año, correspondiendo a aquellas pacientes con una primera citología de LSIL, y las dos siguientes ya normales, por lo fueron dadas de alta.

Tal como podemos observar en la ilustración 5, la mayor proporción de pacientes se encontraban entre los 21 y 40 años. En nuestro análisis llevamos a cabo dos agrupaciones para estudiar el efecto de la edad, siendo el primero formado por las pacientes de menos de 30 años (enfrente de las de 30 años o más), y el segundo con el nivel de corte en los 40 años.

**Tabla 21:** Población a estudio

	n	%	Casos perdidos
<b>Edad</b>			
Media $\pm$ SD (mín-máx)		33.8 $\pm$ 11.1 (18-73)	
<20	7	4.9	
21-29	55	38.5	
30-39	43	30.1	
40-49	26	18.2	
50-59	7	4.9	
60-69	4	2.8	
>70	1	0.7	
<b>Estado menopáusico</b>			5
Premenopausia	123	89.1	
Postmenopausia	15	10.9	
<b>Tabaco</b>			42
Fumadoras	43	42.6	
No fumadoras	58	57.4	
<b>Método anticonceptivo</b>			
Preservativo	36	36.4	
Anticonceptivos hormonales orales	27	26.5	
Desconocido	80	55.9	
<b>Paridad</b>			74
Nulíparas	47	68.1	
Primíparas	7	10.1	
Secundíparas	10	14.5	
Tercíparas	3	4.3	
Cuartíparas o más	2	2.9	
<b>Inmunodepresión</b>			3
HIV	4	2.9	
<b>Tiempo de seguimiento</b>			
Media $\pm$ SD (meses)		29.4 $\pm$ 17.3	



**Gráfico II:** Distribución de edades

## 5.2. Patología cervical previa de la muestra

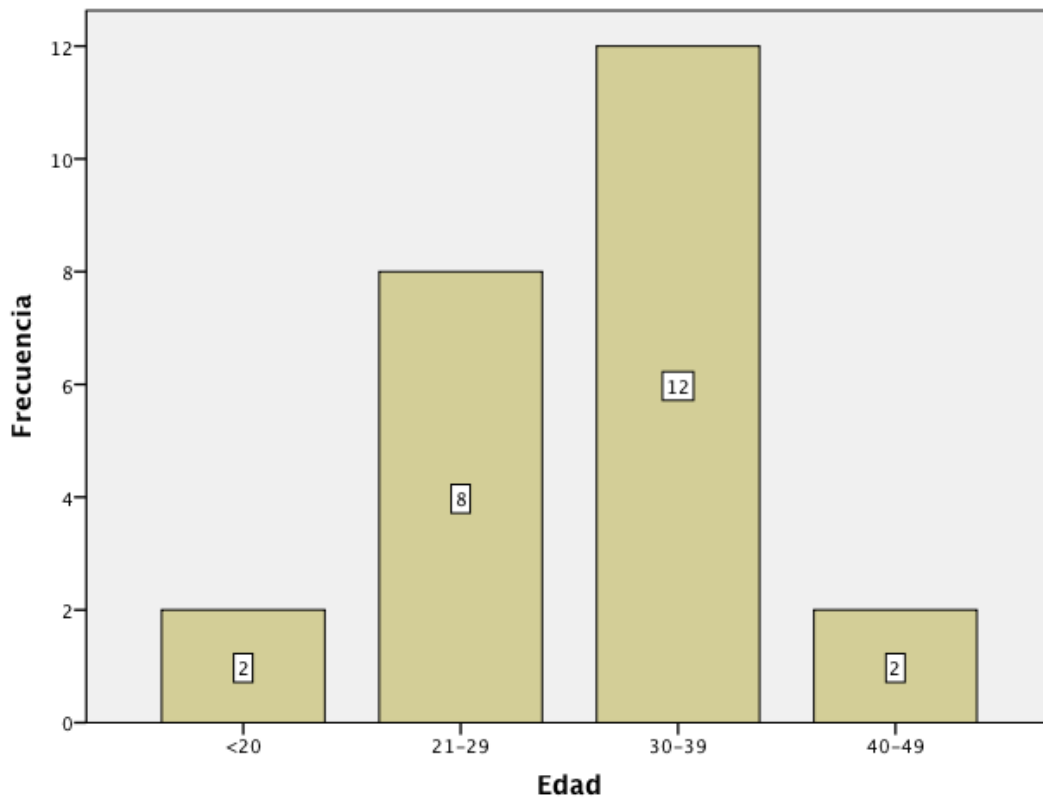
Tal como comentamos en el apartado de métodos, para su inclusión en nuestro estudio requeríamos no haber tenido patología cervical en los últimos 3 años, y de haberla tenido, tener dos citologías normales desde la resolución de dicha patología. En total encontramos 9 pacientes con patología cervical previa que cumplieran dichos requisitos. De ellas dos habían sido tratadas mediante conización (una por un CIN1 persistente en 1998, otra por un carcinoma in situ en 2006), mientras que el resto se sometieron a un seguimiento aclarándose la lesión durante el mismo.

En la tabla 22 recogemos los datos referentes a la patología previa de nuestra muestra. Hemos nombrado como "Ausencia de controles anteriores" a aquel grupo de pacientes de las que no disponíamos ningún dato sobre citologías anteriores, por lo que es imposible saber si habían padecido una patología previa o no.

En la ilustración 6 detallamos la distribución por edades de las pacientes que no disponían de ninguna citología previa. Observamos que este hallazgo se debe más a un cribado inadecuado a que la población estudiada sea muy joven.

**Tabla 22:** Patología cervical previa

	n	%
<b>Antecedentes de patología cervical previa</b>		
Sí	9	6.3
No	110	76.9
Ausencia de controles anteriores	24	16.8
<b>Tipo de patología previa</b>		
ASCUS HPV+	2	1.2
CIN1/LSIL	6	3.5
Carcinoma in situ	1	0.6
<b>Tratamiento recibido</b>		
Conización	2	1.4
Seguimiento	7	4.9
<b>Número de citologías previas inmediatamente anteriores normales</b>		
Media $\pm$ SD	1.9 $\pm$ 1.9	
Ninguna	24	16.8
1	50	35
2	33	23.1
3	15	10.5
Más de 3	21	14.6



**Gráfico III:** Edades entre las pacientes sin citología previa

### 5.3. Datos del episodio de diagnóstico

Como hemos comentado, el diagnóstico inicial de la LSIL se realizó entre el 1 de enero y el 30 de septiembre de 2011. En un subgrupo de estas pacientes, además de la técnica COBAS se realizó también un estudio con HC2, lo que nos ha permitido comparar las dos técnicas como objetivo secundario de este trabajo.

El número de biopsias realizadas fue sólo de 18 (12.6% del total de pacientes). No pudimos obtener el número de colposcopias realizadas dada la naturaleza retrospectiva de la recogida de datos. No siempre se reporta en la historia clínica informatizada la realización de una colposcopia.

De las biopsias realizadas, cabe destacar que 2 de ellas fueron diagnósticas de CIN2 y una de ellas de CIN3. El período de tiempo entre la realización de la citología y la biopsia fue de entre 2 y 4 meses. Esto nos hace pensar que la lesión ya estaba presente en el momento de la citología. De hecho, el protocolo de realizar una colposcopia en los casos LSIL es precisamente para diagnosticar estos casos. Estos tres casos fueron positivos para HPV16.

**Tabla 23:** Resumen del episodio inicial

	N	%
<b>Fecha 1era citología</b>	1/1/2011-30/9/2011	
<b>Biopsias realizadas</b>	18	12.6
Normal <sup>4</sup>	6	35.3
Coilocitosis	1	5.9
CIN1	7	41.2
CIN2	2	11.8
CIN3	1	5.9
<b>Captura de híbridos</b>		
Realizada	70	41.5

## 5.4. Descripción de los resultados del método Cobas 4800

### 5.4.1. Resultados globales

Obtuvimos a partir del método Cobas 4800 las siguientes categorías de resultados: positividad para HPV16, positividad para HPV18, positividad para otros virus de alto riesgo (etiquetados por nosotros como HPVno16no18), combinación de los anteriores resultados, y finalmente negatividad para detección de cualquier virus de alto riesgo (designaremos dicho resultado como HPVneg). En este apartado así mismo describimos los datos para positividad de cualquier virus de alto riesgo, agrupados como hrHPV (de high-risk HPV).

<sup>4</sup> % del total de biopsias realizadas

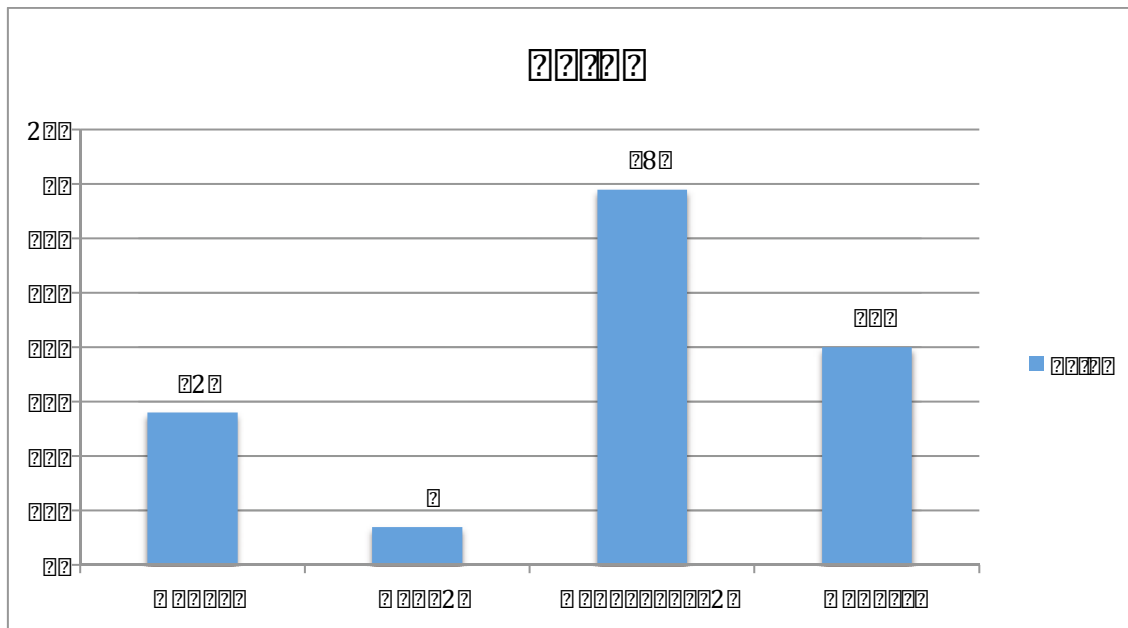
Es importante remarcar que en los siguientes resultados la categoría HPV16 agrupa los casos en que se detectó HPV16, independientemente de si además había otros virus de alto riesgo o no. El mismo comentario se aplica al resultado HPV18. No obstante, en los casos HPVno16no18 reportaremos sólo los casos que no presentan coinfección ni por el HPV16 ni por el HPV18. De esta manera podremos estudiar el efecto de la infección por los virus de alto riesgo que no son 16 ni 18 de forma aislada.

En la tabla 24, y con fines descriptivos, además de describir el número de pacientes con infección exclusiva por un virus de alto riesgo diferente del 16 o 18 (HPVno16no18) (69 pacientes), detallamos también aquellas pacientes con positividad para HPVno16no18 pero que además podían presentar coinfección para HPV16 o HPV18 (91 pacientes en total).

Observamos la distribución general de los distintos genotipos sobre la población estudiada en la citada tabla. El resultado más frecuente es el de HPVno16no18 con un 48.3% de los casos si excluimos las coinfecciones de HPV16 o HPV18 con otros virus de alto riesgo, seguido por el resultado negativo para Cobas. Así mismo, hasta en un 28% de los casos no se detectó ningún virus de alto riesgo.

**Tabla 24:** Genotipos de HPV en las LSIL

<b>Genotipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
HPV16	28	19.6
HPV18	7	4.9
HPVno16no18 (excluyendo coinfecciones)	69	48.3
HPVno16no18 sin excluir coinfecciones	91	63.6
HPVneg	40	28.0
<b>Coinfecciones</b>		
HPV16+HPV18	0	0
HPV16+HPVno16no18	18	12.6
HPV18+HPVno16no18	3	2.1
HPV16+HPV18+HPVno16no18	1	0.7



**Gráfico IV:** Distribución de genotipos

?

#### 5.4.2. Análisis por grupos de edad

Estudiamos la distribución de los distintos genotipos por grupos de edades de 10 años, y haciendo dos agrupaciones en dos puntos de corte distintos, a los 30 y 40 años. En estos análisis no observamos que las diferencias en la distribución de los distintos genotipos por edades fuera estadísticamente significativo (tablas 25, 26 y 27), excepto para el HPV18. En este caso obtuvimos una edad media para su presencia superior a la del resto de grupos, con una edad media es de 42.43 años, casi 10 años más tarde que en el resto de grupos (tabla 25).

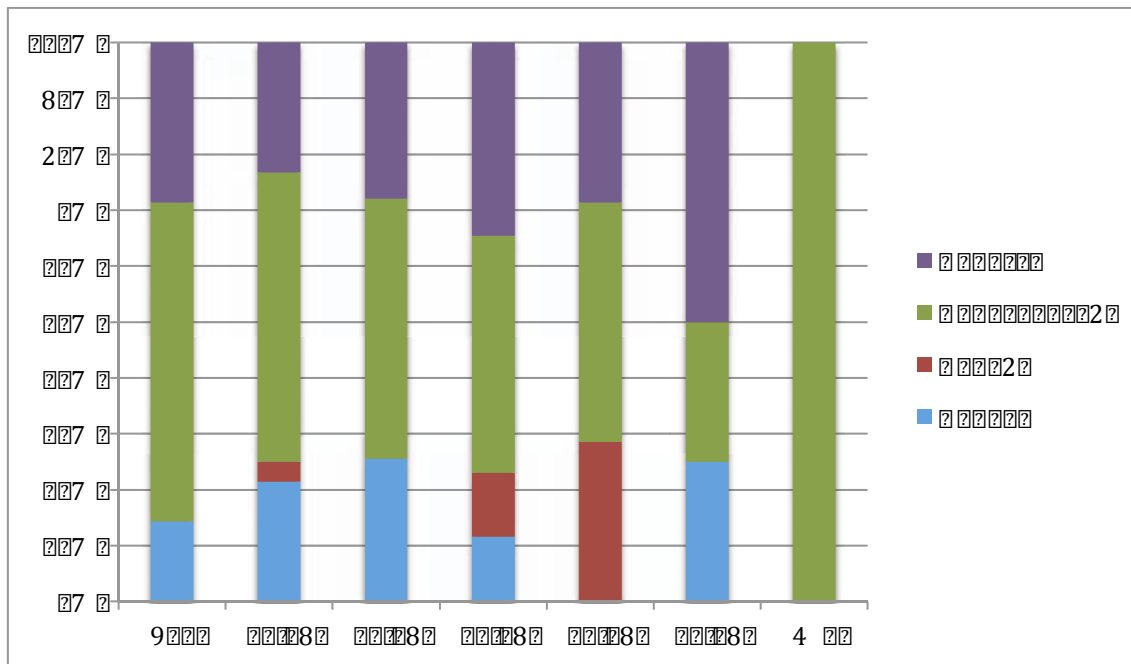
El resultado negativo para Cobas es más frecuente encontrarlo en las pacientes mayores, mientras que el HPV16 parece que a partir de los 40 años disminuye. No obstante los resultados no son significativos.



**Tabla 25:** Distribución de los genotipos según la edad

Edad	Resultado Cobas 4800					
	HPV16 n (%)	HPV18 n (%)	HPV no16no18 n (%)	hrHPV n (%)	HPVneg n (%)	Total
Media ± SD	32.0 ± 8.8	42.43 ± 13.8	32.25 ± 11.0	32.95 ± 11.0	35.95 ± 11.8	33.8 ± 11.1
<20	1 (3.6%)	0 (0%)	4 (5.8%)	5 (4.9%)	2 (5.0%)	7 (4.9%)
21-29	12 (42.9%)	2 (28.6%)	29 (42.0%)	42 (40.8%)	13 (32.5%)	55 (38.5%)
30-39	11 (39.3%)	0 (0%)	20 (29.0%)	31 (30.1%)	12 (30.0%)	43 (30,1%)
40-49	3 (10.7%)	3 (42.9%)	11 (15.9%)	17 (16.5%)	9 (22.5%)	26 (18,2%)
50-59	0 (0%)	2 (28.6%)	3 (4.3%)	5 (4.9%)	2 (5.0%)	7 (4.9%)
60-69	1 (3.6%)	0 (0%)	1 (1.4%)	2 (1.9%)	2 (5.0%)	4 (2.8%)
>70	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.4%)	1 (1.0%)	0 (0%)	1 (0.6%)
Total	28 (100%)	7 (100%)	69 (100%)	103 (100%)	39 (100%)	7 (4.9%)

t-Student para comparación de las medias no significativa, excepto para HPV18 (p=0.036)



**Gráfico V:** Distribución de genotipos según la edad

**Tabla 26:** Distribución de genotipos HPV entre pacientes menores de 30 años y de 30 años o más

Edad	Resultados Cobas 4800					Total
	HPV16 n (%)	HPV18 n (%)	HPV no16no18 n (%)	hrHPV n (%)	HPVneg n (%)	
<30	13 (46.4%)	2 (28.6%)	33 (47.8%)	47 (45.6%)	15 (37.5%)	62 (43.3%)
>=30	15 (53.6%)	5 (71.4%)	36 (52.2%)	56 (54.4%)	25 (62.5%)	81 (56.7%)
Total	28 (100%)	7 (100%)	69 (100%)	103 (100%)	39 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 27:** Distribución de genotipos HPV entre pacientes menores de 40 años y de 40 años o más

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos, excepto para HPV18

Edad	Resultados Cobas 4800					
	HPV16 n (%)	HPV18 n (%)	HPV no16no18 n (%)	hrHPV n (%)	HPVneg n (%)	Total
<40	24 (85.7%)	2 (28.6%)	53 (76.8%)	78 (75.7%)	27 (67.5%)	105 (73.4%)
>=40	4 (14.3%)	5 (71.4%)	16 (23.2%)	25 (24.3%)	13 (32.5%)	38 (26.6%)
Total	28 (100%)	7 (100%)	69 (100%)	103 (100%)	39 (100%)	143 (100%)

(p=0.015)

La significancia para HPV18 se pierde cuando el punto de corte para los grupos de edad son los 30 años. Es a partir de lo 40 años cuando observamos la diferencia significativa para HPV18 obtenida en el análisis global.

### 5.5. Comparativa resultados HC2 versus Cobas

Como comentamos anteriormente, en 70 pacientes se estudio la presencia de HPV de alto riesgo por dos métodos distintos, el HC2 y el Cobas 4800.

Calculamos la sensibilidad, especificidad y valores predictivos para los dos métodos para detectar CIN2+. Como observamos son muy similares entre las dos técnicas, pero mientras que Cobas es algo menos específica, su sensibilidad y valor predictivo positivo alcanzan el 100% en nuestra serie.

**Tabla 28:** Sensibilidad y Especificidad para HC2 y Cobas

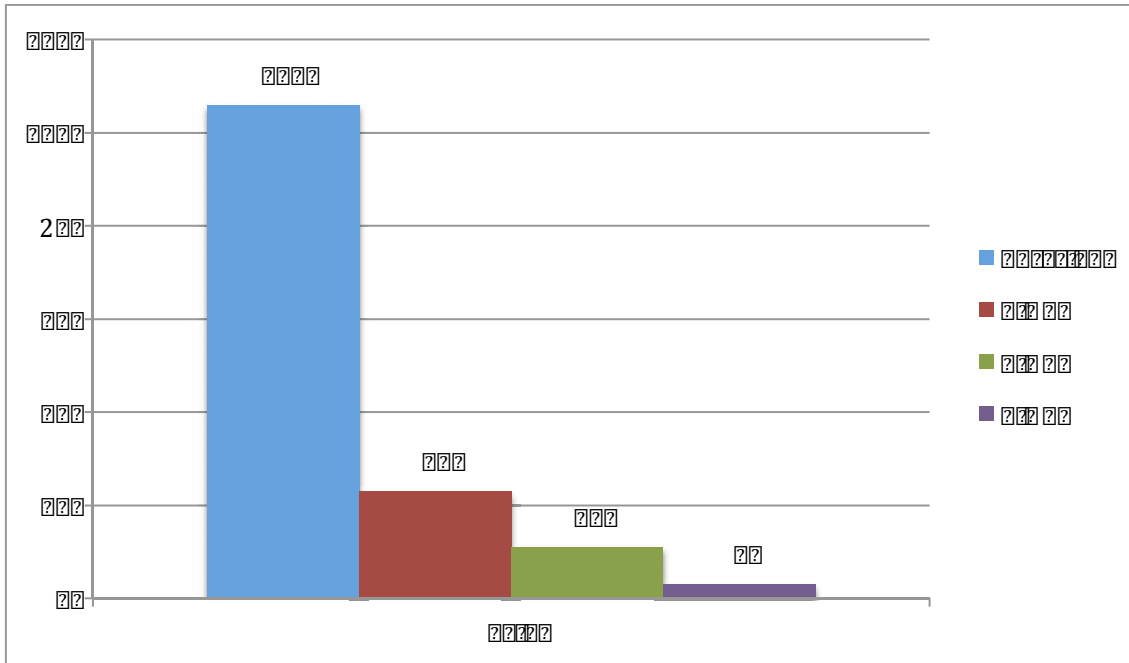
	COBAS 4800	HC2
Sensibilidad	100%	88.9%
Especificidad	27.4%	29.5%
Valor Predictivo Positivo	16.7%	15.7%
Valor Predictivo Negativo	100%	94.7%

## 5.6. Evolución y resultado final de la lesión LSIL

Es necesario hacer una consideración previa al estudio al que se inicia con este apartado, ya apuntado en el capítulo de Métodos. En el seguimiento de las pacientes hubieron 2 casos en los que la última citología fue normal, pero la determinación de virus de alto riesgo positiva. Estas pacientes las incluimos dentro del grupo de pacientes con lesiones persistentes.

### 5.6.1. Resultados globales

Del total de 143 LSIL, 106 casos (74.1%), regresaron durante el tiempo de seguimiento. La progresión a CIN2+ la observamos en 14 pacientes (9.8%), y la progresión a CIN3+ en 3 casos (2.1%). La tasa de persistencia de las LSIL a los dos años fue de 16.3%.



**Gráfico VI:** Evolución de las LSIL

### 5.6.2. Análisis por grupos de edad

Al igual que análisis anteriores, analizamos el resultado por grupos de edades, y con los puntos de corte de 30 y a 40 años. En el estudio por grupos de edades cada 10 años (tabla 30) el resultado estuvo en el límite para ser significativo. Al dividir la cohorte con el punto de corte en los 30 años (tabla 31) o en los 40 años (tabla 32) los datos no fueron significativos.

**Tabla 29:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad

Edad	Curación n (%)	CIN1/LSIL n (%)	CIN2+ n (%)	Total n (%)
Media±SD	33.8±11.2	34.6±12.2	33.9±9.5	33.8 ± 11.1
<20	4 (3.8%)	3 (13.0%)	0 (0%)	7 (4.9%)
21-29	42 (39.6%)	8 (34.8%)	5 (35.7%)	55 (38.5%)
30-39	29 (27.3%)	7 (30.4%)	7 (50%)	43 (30,1%)
40-49	23 (21.7%)	3 (13.0%)	0 (0%)	26 (18,2%)
50-59	4 (3.8%)	1 (4.4%)	2 (14.3%)	7 (4.9%)
60-69	4 (3.8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (2.8%)
>70	0 (0%)	1 (4.4%)	0 (0%)	1 (0.6%)
Total	106 (100%)	23 (100%)	14 (100%)	143 (100%)

t-Student para comparación de las medias no significativa

**Tabla 30:** Resultado del seguimiento de las LSIL según la edad, con el punto de corte en los 30 años

Edad	Curación n (%)	CIN1/LSIL n (%)	CIN2+ n (%)	Total n (%)
<30	46 (43.4%)	11 (47.8%)	5 (35.7%)	62 (43.3%)
30 o más	60 (56.6%)	12 (52.2%)	9 (64.3%)	81 (56.7%)
Total	106 (100%)	23 (100%)	14 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 31:** Resultado del seguimiento de las LSIL según la edad, con el punto de corte en los 40 años

	Curación n (%)	CIN1/LSIL n (%)	CIN2+ n (%)	Total n (%)
<40	75 (70.8%)	18 (78.3%)	12 (85.7%)	105 (73.4%)
40 o más	31 (29.2%)	5 (21.7%)	2 (14.3%)	38 (26.6%)
Total	106 (100%)	23 (100%)	14 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

Analizamos también el resultado final de la LSIL según la edad practicando dos análisis adicionales. Por un lado Curación versus no curación (independientemente si persistía o progresaba la misma) (tablas 33, 34 y 35), y por otra parte CIN2+ versus no progresión de la lesión (englobando las lesiones que bien habían remitido o persistían como LSIL) (tablas 36, 37 y 38). En ambos supuestos los resultados no fueron estadísticamente significativos para ninguna agrupación de edades.

**Tabla 32:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por curación vs no curación

Edad	Curación n (%)	No curación n (%)	Total n (%)
Media±SD	33.8±11.2	33.6±11.2	33.8 ± 11.1
<20	4 (3.8%)	3 (8.1%)	7 (4.9%)
21-29	42 (39.6%)	13 (35.1%)	55 (38.5%)
30-39	29 (27.4%)	14 (37.8%)	43 (30,1%)
40-49	23 (21.7%)	3 (8.1%)	26 (18,2%)
50-59	4 (3.8%)	3 (8.1%)	7 (4.9%)
60-69	4 (3.8%)	0 (0%)	4 (2.8%)
>70	0 (0%)	1 (2.7%)	1 (0.6%)
Total	106 (100%)	37 (100%)	143 (100%)

t-Student para comparación de las medias no significativa

**Tabla 33:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por curación vs no curación, con el punto de corte en los 30 años

Edad	Curación n (%)	No curación n (%)	Total n (%)
<30	46 (43.4%)	16 (43.2%)	62 (43.3%)
30 o más	60 (56.6%)	21 (56.8%)	81 (56.7%)
Total	106 (100%)	37 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 34:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por curación vs no curación, con el punto de corte en los 40 años

	Curación n (%)	No curación n (%)	Total n (%)
<40	75 (70.8%)	30 (81.1%)	105 (73.4%)
40 o más	31 (29.2%)	7 (18.9%)	38 (26.6%)
Total	106 (100%)	37 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 35:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión

Edad	CIN2+ n (%)	No progresión n (%)	Total n (%)
Media±SD	33.9±9.5	33.7±11.3	33.8 ± 11.1
<20	0 (0%)	7 (5.4%)	7 (4.9%)
21-29	5 (35.7%)	50 (38.8%)	55 (38.5%)
30-39	7 (50%)	36 (27.9%)	43 (30,1%)
40-49	0 (0%)	26 (20.2%)	26 (18,2%)
50-59	2 (14.3%)	5 (3.9%)	7 (4.9%)
60-69	0 (0%)	4 (3.1%)	4 (2.8%)
>70	0 (0%)	1 (0.8%)	1 (0.6%)
Total	14 (100%)	129 (100%)	143 (100%)

t-Student para comparación de las medias no significativa



**Tabla 36:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión, con el punto de corte en los 30 años

Edad	CIN2+ n (%)	No progresión n (%)	Total n (%)
<30	5 (35.7%)	57 (44.2%)	62 (43.3%)
30 o más	9 (64.3%)	72 (55.8%)	81 (56.7%)
Total	14 (100%)	129 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 37:** Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión, con el punto de corte en los 40 años

	CIN2+ n (%)	No progresión n (%)	Total n (%)
<40	12 (85.7%)	93 (72.1%)	105 (73.4%)
40 o más	2 (14.3%)	36 (27.9%)	38 (26.6%)
Total	106 (100%)	23 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

### 5.6.3. Análisis según el método anticonceptivo y tabaco

De los datos recogidos en la historia clínica, analizamos la relación del uso del preservativo, de los anovulatorios orales (ACO) o de ser fumadora con el resultado de la LSIL. Como en el apartado anterior, además agrupamos también los resultados en las categorías curación/no curación y progresión a CIN2+/no progresión.

Como se puede observar en las siguientes tablas (tablas 39 al 47), el único análisis significativo fue el del uso de anovulatorios orales con el riesgo de progresión a CIN2+ de la LSIL.

**Tabla 38:** Resultado de la LSIL en relación al uso del preservativo

	Curación	CIN1/LSIL	CIN2+	Total
Uso de preservativo n (%)	27 (75%)	6 (16.7%)	3 (8.3%)	63 (100%)
No uso de preservativo n (%)	47 (74.6%)	8 (12.7%)	8 (12.7%)	36 (100%)
Total n (%)	14 (14.1%)	11 (11.1%)	74 (74.7%)	99 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 39:** Resultado de la LSIL en relación al uso de anovulatorios orales

	Curación	CIN1/LSIL	CIN2+	Total
Uso de ACO n (%)	16 (59.3%)	5 (18.5%)	6 (22.2%)	27 (100%)
No uso de ACO n (%)	57 (76%)	12 (16%)	6 (8%)	75 (100%)
Total n (%)	73 (71.6%)	17 (16.7%)	12 (11.8%)	102 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 40:** Resultado de la LSIL según el hábito tabáquico

	Curación	CIN1/LSIL	CIN2+	Total
Fumadora n (%)	31 (72.1%)	6 (14%)	6 (14%)	43 (100%)
No fumadora n (%)	41 (70.7%)	10 (17.2%)	7 (12.1%)	58 (100%)
Total n (%)	72 (71.3%)	16 (15.8%)	13 (12.9%)	101 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 41:** Resultado de la LSIL según el uso de preservativo, agrupando por curación vs no curación

	Curación	No curación	Total
Uso de preservativo n (%)	27 (75%)	9 (25%)	36 (100%)
No uso de preservativo n (%)	47 (74.6%)	16 (25.4%)	63 (100%)
Total n (%)	74 (74.7%)	25 (25.3%)	99 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 42:** Resultado de la LSIL según el uso de anovulatorios orales, agrupando por curación vs no curación

	Curación	No curación	Total
Uso de ACO n (%)	16 (59.3%)	11 (40.7%)	27 (100%)
No uso de ACO n (%)	57 (76%)	18 (24%)	75 (100%)
Total n (%)	73 (71.6%)	29 (28.4%)	102 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 43:** Resultado de la LSIL según el hábito tabáquico, agrupando por curación vs no curación

	Curación	No curación	Total
Fumadora n (%)	31 (72.1%)	12 (27.9%)	43 (100%)
No fumadora n (%)	41 (70.7%)	17 (29.3%)	58 (100%)
Total n (%)	72 (71.3%)	25 (25.3%)	101 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 44:** Resultado de la LSIL según el uso del preservativo, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión

	CIN2+	No progresión	Total
Uso de preservativo n (%)	3 (8.3%)	33 (91.7%)	36 (100%)
No uso de preservativo n (%)	8 (12.7%)	55 (87.3%)	63 (100%)
Total n (%)	11 (11.1%)	88 (88.9%)	99 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

**Tabla 45:** Resultado de la LSIL según el uso de anovulatorios, agrupando según progresión a CIN2+ vs no progresión

	CIN2+	No progresión	Total
Uso de ACO n (%)	6 (22.2%)	21 (77.8%)	27 (100%)
No uso de ACO n (%)	6 (8%)	69 (92%)	75 (100%)
Total n (%)	12 (11.8%)	90 (88.2%)	102 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher significativos,  $p=0.049$

**Tabla 46:** Resultado de la LSIL según el hábito tabáquico, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión

	CIN2+	No progresión	Total
Fumadora n (%)	6 (14%)	37 (86%)	43 (100%)
No fumadora n (%)	7 (12.1%)	51 (87.9%)	58 (100%)
Total n (%)	13 (12.9%)	88 (87.1%)	101 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher no significativos

## 5.7. Distribución de los genotipos del HPV según el resultado final de la LSIL

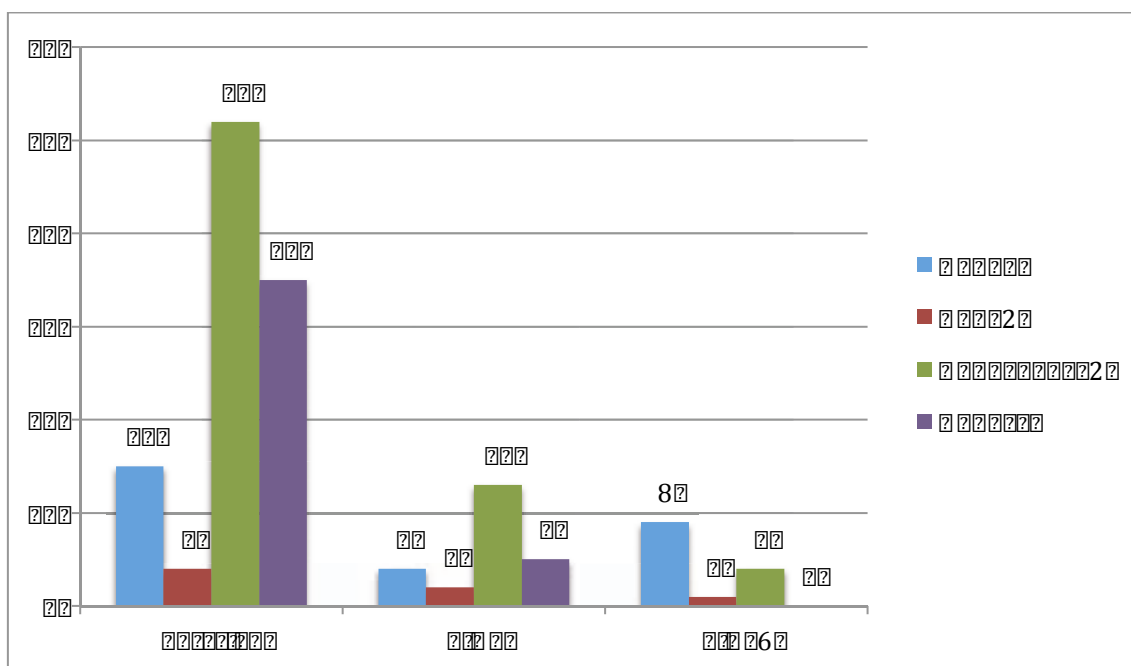
Estudiamos la distribución de los distintos genotipos (HPV16, HPV18, HPVno16no18) y la ausencia de detección (HPVneg) en relación al resultado final de la LSIL (tabla 48). Recordamos que en el grupo HPVno16no18 excluimos aquellos que presentan una coinfección con el HPV16 y/o HPV18.

Tras el análisis de los casos encontramos que únicamente para el HPV16 y HPVneg las diferencias en la distribución fueron significativas. Es decir, el número de lesiones que se curan, persisten o progresan es significativamente diferente en los casos en que hay una infección por HPV16, o bien el resultado por Cobas es negativo, respecto al resto de grupos. En este último caso no encontramos ni un solo caso que progresase a CIN2+.

**Tabla 47:** Distribución de los resultados Cobas según el resultado de la LSIL

	<i>HPV16</i> n (%)	HPV18 n (%)	HPVno16no18 n (%)	<i>HPVneg</i> n (%)	Total n (%)
Curación	15 (53.6%)	4 (57.1%)	52 (75.4%)	35 (87.5%)	106 (74.1%)
CIN1	4 (14.3%)	2 (28.6%)	13 (18.8%)	5 (12.5%)	23 (16.1%)
CIN2+	9 (32.1%)	1 (14.3%)	4 (5.8%)	0 (0%)	14 (9.8%)
Total	28 (100%)	7 (100%)	69 (100%)	40 (100%)	143 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher para HPV16  $p < 0.001$ ; para HPVneg  $p = 0.004$ . Resto  $p = \text{NS}$



**Gráfico VII:** Distribución de los genotipos de HPV según el resultado de la evolución de la LSIL

## **5.8. Riesgo de los distintos grupos de genotipos para CIN2+**

Estudiamos los riesgos otorgados para los distintos grupos de resultados obtenidos mediante Cobas. El primer análisis calculado, el tratado en este punto, es el riesgo para la progresión de la lesión, es decir, para el diagnóstico de CIN2, CIN3 o carcinoma invasor, englobados como CIN2+, en función de la presencia de un determinado genotipo viral. En nuestra serie, como ya describimos en el punto 5.6., sólo encontramos CIN2 y CIN3.

Como en análisis anteriores realizamos el cálculo para la serie considerada en su conjunto, y posteriormente con los grupos de edades con los puntos de corte de 30 y 40 años. El riesgo provocado por las coinfecciones sólo lo estudiamos en la muestra de forma global, dado el poco número de casos.

### **5.8.1. Riesgos absolutos**

#### ***5.8.1.1. Resultados globales***

El riesgo absoluto para cada categoría de genotipado según los resultados obtenidos por Cobas se describe en la tabla 49.

Destacamos que las pacientes portadores de HPV16 presentaron un riesgo absoluto para progresión del 32.1%, con un intervalo de confianza del 17.1 al 47.2%, que es 6 veces superior al de aquellos casos HPVno16no18. En este último caso no se alcanzó la significancia estadística.

**Tabla 48:** Riesgos absolutos para CIN2+

	n	CIN2+	No progresión	Riesgo (95% IC)
HPV16	28	9	19	32.1 (17.1-47.2)
HPV18	7	1	6	14.3 (0.0-38.5)
HPVno16no18	69	4	65	5.8 (0.4-11.1)
HPVneg	40	0	40	0
<b>Coinfecciones</b>				
HPV16+18	0	-	-	-
HPV16+no16no18	18	7	11	38.9 (19.8-58.0)
HPV18+no16no18	3	1	2	33.3 (0.0-79.5)
HPV16+18+no16no18	1	0	1	0

Los intervalos de confianza obtenidos sólo son significativos en los casos en los que interviene el HPV16, ya que el resto incluyen el 1 entre sus límites.

Para HPV18 obtenemos un riesgo de 14.3, pero por limitaciones en el número de pacientes de la muestra sus intervalos de confianza no nos ofrecen un resultado significativo.

Finalmente, el riesgo 0 para HPVneg es lo esperable ya que no obtuvimos ningún caso con progresión a CIN2+.

### **5.8.1.2. Resultados por grupos de edad**

#### **5.8.1.2.1. Punto de corte en los 30 años**

Analizamos los riesgos absolutos según los grupos de edad de menores de 30 años (tabla 50), y de 30 años o más (tabla 51).



**Tabla 49:** Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo HPV en pacientes menores de 30 años

	n	CIN2+	No progresión	Riesgo (95% IC)
HPV16	13	4	9	30.8 (8.8-52.7)
HPV18	2	0	2	0
HPVno16no18	33	1	32	3.0 (0.0-8.8)
HPVneg	15	0	15	0

**Tabla 50:** Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes de 30 años o más

	n	CIN2+	No progresión	Riesgo (95% IC)
HPV16	15	5	10	33.3 (12.7-54.0)
HPV18	5	1	4	20.0 (0-52.0)
HPVno16no18	36	3	33	8.3 (0.0-17.0)
HPVneg	24	0	25	0

Vemos que los valores obtenidos para HPV16 son muy similares independientemente de la edad. Para los otros virus de alto riesgo (HPVno16no18) los resultados siguen sin ser significativos, la división por edad no hace aparecer ninguna significancia estadística. Pese a no ser significativo, es interesante hacer notar que el riesgo absoluto para HPVno16no18 es superior en las pacientes de 30 años o más.

#### **5.8.1.2.2. Punto de corte en los 40 años**

En las tablas 52 y 53 podemos visualizar los datos para los grupos de edad de menos de 40 años, y de 40 años o más.

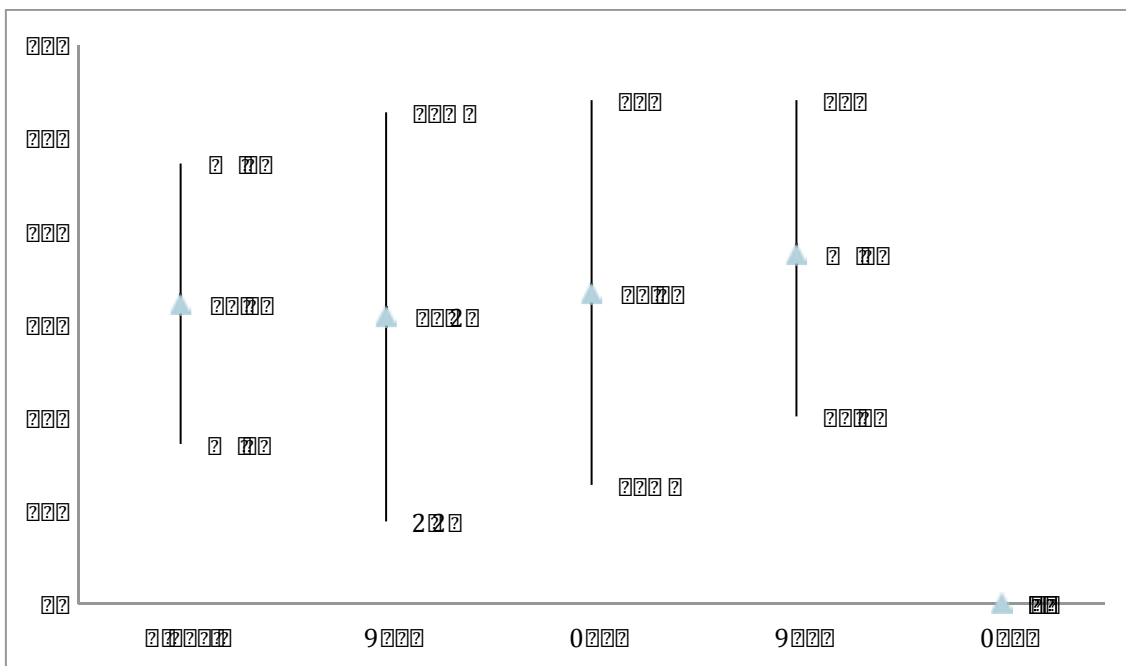
**Tabla 51:** Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años

	n	CIN2+	No progresión	Riesgo (95% IC)
HPV16	24	9	15	37.5 (20.1-54.0)
HPV18	2	0	2	0
HPVno16no18	53	3	50	5.7 (0.0-11.7)
HPVneg	27	0	27	0

**Tabla 52:** Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más

	n	CIN2+	No progresión	Riesgo (95% IC)
HPV16	4	0	4	0
HPV18	5	1	4	20.0 (0-52.0)
HPVno16no18	16	1	15	6.2 (0.0-17.7)
HPVneg	13	0	13	0

Observamos una inversión de la tendencia. Mientras que con el punto de corte a los 30 años las pacientes jóvenes parece que tendrían un riesgo superior de progresión para HPV16, al colocar el punto de corte en los 40 años el menor riesgo lo observamos en las pacientes mayores, hasta el punto en que ningún caso haya evolucionado a CIN2+ con el resultado de un riesgo 0. Tenemos que tener en cuenta el bajo número de pacientes con HPV16 de 40 años o más, lo que puede explicar el resultado. Los otros resultados apenas varían.



**Gráfico VIII:** Riesgos absolutos para CIN2+ debido a HPV16, con los intervalos de confianza, según el corte del grupo de edad

### 5.8.2. Riesgos relativos

Calculamos también los riesgos relativos para la presencia de cada grupo de genotipos en referencia a no tenerlo. Así, en las siguientes tablas HPV16 nos indica el riesgo relativo que aporta la presencia de HPV16 enfrente de los casos en los que no lo encontramos (HPV16+/HPV16-).

#### 5.8.2.1. Resultados Globales

En todos los análisis realizados en este apartado no pudimos calcular el riesgo relativo de progresión a CIN2+ para los casos en que Cobas fue negativo (HPVneg). Esto es debido a que no obtuvimos ningún resultado de CIN2+, por lo que el riesgo sería 0. En el resto de casos obtuvimos un resultado significativo sólo para HPV16. La presencia de HPV16 otorga un riesgo 7.4 veces mayor de progresar a CIN2+ que si la lesión no presenta HPV16.

Analizamos también si la distribución de cada genotipo entre las lesiones que progresan y las que no es distinta, lo que únicamente se demostró alcanzando la significancia

estadística en los casos con HPV16 y los HPVneg. Para HPV16 y para HPVneg encontramos una diferencia estadísticamente significativa.

En el caso de presencia de coinfecciones el único que confiere un riesgo estadísticamente significativo es la presencia de HPV16 junto a otros virus de alto riesgo (no pudimos estudiar la asociación HPV16 con HPV18 por no haber ningún caso). Dado que la infección aislada por HPVno16no18 no obtiene unos resultados significativos, podemos concluir que dicho resultado lo obtenemos gracias a la participación de HPV16, ya que el riesgo que obtenemos es análogo al de este genotipo cuando no tenemos en cuenta la presencia de otros virus. Si la coinfección confiriese un mayor probabilidad de progresión tendríamos que haber obtenido un riesgo mayor, lo cual no ocurre.

**Tabla 53:** Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV

	n	CIN2+	No progresión	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	28	9	19	<0.001	7.4 (2.7-20.3)
HPV18	7	1	6	NS	1.5 (0.2-9.9)
HPVno16no18	69	4	65	NS	0.4 (0.1-1.3)
HPVneg	40	0	40	0.01	NA
<b>Coinfecciones</b>					
HPV16+18	0	-	-	-	-
HPV16+no16no18	18	7	11	<0.001	6.9 (2.7-17.5)
HPV18+no16no18	3	1	2	NS	3.6 (0.7-19.3)
HPV16+18+no16no18	1	0	1	NS	NA

NS: no significativo. NA: no aplicable

## 5.8.2 Análisis por grupos de edad

### 5.8.2.1. Punto de corte en los 30 años

No encontramos diferencias importantes respecto al resultado global: los únicos resultados significativos para el riesgo relativo para CIN2+ es para el HPV16.

Destacamos que el riesgo relativo es mayor en pacientes jóvenes (menores de 30 años), es decir, el riesgo relativo de progresión debido a HPV16 es menor en las pacientes mayores de 30 años, aunque el límite inferior del intervalo de confianza es muy similar en ambos grupos. Aumentando el número de pacientes dicha diferencia podría ser más significativa. Para la distribución de los genotipos, observamos una diferencia significativa en el grupo HPVneg, pero sólo en el grupo de 30 años o más. Para HPV16 se mantiene el resultado significativo en ambos grupos de edad.

Como hemos comentado anteriormente no se incluyen las coinfecciones en este análisis por edades dado su bajo número.

**Tabla 54:** Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años

	n	CIN2+	No progresión	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	13	4	9	0.006	15.1 (1.8-123.6)
HPV18	2	0	2	NS	NA
HPVno16no18	33	1	32	NS	0.2 (0.0-1.8)
HPVneg	15	0	15	NS	NA

NS: no significativo. NA: no aplicable

**Tabla 55:** Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años o más

	n	CIN2+	No progresión	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	15	5	10	0.009	5.5 (1.7-18.1)
HPV18	5	1	4	NS	1.9 (0.3-12.3)
HPVno16no18	36	3	33	NS	0.6 (0.2-2.3)
HPVneg	24	0	25	0.051	NA

NS: no significativo. NA: no aplicable

#### 5.8.2.2. Punto de corte en los 40 años

Sorprendentemente encontramos que ninguna de las 4 pacientes HPV16 de más de 40 años evolucionaron a CIN2+. Es por este motivo por el que no podemos calcular el riesgo relativo para HPV16 en este grupo de edades. Solamente obtuvimos un riesgo relativo significativo para el grupo de HPV16 en pacientes menores de 40 años. Respecto a la distribución de los genotipos, la distribución fue distinta para HPV16 y HPVneg respecto a los grupos sin estos genotipos. En el grupo de pacientes de 40 años o más es difícil sacar conclusiones dado el bajo número de eventos CIN2+ producidos.

**Tabla 56:** Riesgo relativo de progresión a CIN2 según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años

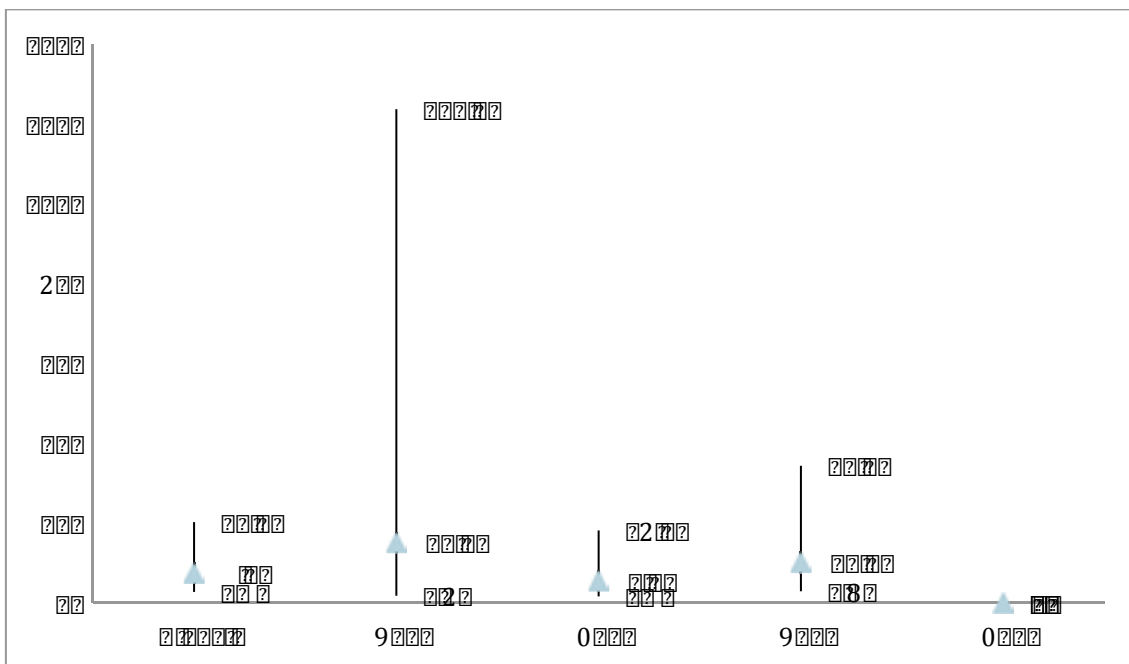
	n	CIN2+	No progresión	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	24	9	15	<0.001	10.1 (2.9-34.4)
HPV18	2	0	2	NS	NA
HPVno16no18	53	3	50	0.061	0.3 (0.1-1.1)
HPVneg	27	0	27	0.034	NA

NS: no significativo. NA: no aplicable

**Tabla 57:** Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más

	n	CIN2+	No progresión	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	4	0	4	NS	NA
HPV18	5	1	4	NS	6.6 (0.5-89.5)
HPVno16no18	16	1	15	NS	1.4 (0.1-20.3)
HPVneg	13	0	13	NS	NA

NS: no significativo. NA: no aplicable

**Gráfico IX:** Riesgos relativos para CIN2+ debido a HPV16, con los intervalos de confianza, según el corte de edad

## 5.9. Riesgo de los distintos grupos de genotipos para curación de la LSIL

?

Si bien el concepto de "riesgo para curarse" no es semánticamente correcto, hemos creído interesante estudiar si la presencia de un determinado genotipo o un resultado negativo con Cobas conlleva una mayor probabilidad de curarse. En la nomenclatura estadística esta probabilidad lleva el nombre de riesgo, pese a que en este caso el riesgo sea beneficioso.

Como en el anterior apartado calculamos los riesgos absolutos y relativos, y analizamos los datos inicialmente de forma global, para posteriormente dividirlos según la edad de 30 años y 40 años.

### 5.9.1. Riesgos absolutos

#### 5.9.1.1. Resultados globales

En la tabla 59 observamos los resultados globales. La categoría que confiere mayor probabilidad de curación es la de obtener un resultado negativo para Cobas, seguido por HPVno16no18, HPV18 y por último HPV16. La probabilidad de curarse si el resultado de Cobas es negativo llega casi al 90%, mientras que en el caso de HPV16 disminuye al 53.6%. Los intervalos de confianza son amplios, sobretodo en aquellos casos en los que el número de pacientes es menor, por lo que un aumento en la muestra podría reducirlos y por lo tanto dar mayor potencia estadística a los resultados.

**Tabla 58:** Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV

	n	Curación	No curación	Riesgo (95% IC)
HPV16	28	15	13	53.6 (38.7-68.5)
HPV18	7	4	3	57.1 (27.9-86.4)
HPVno16no18	69	52	17	75.4 (67.7-83.0)
HPVneg	40	35	5	87.5 (80.0-95.0)

#### 5.9.1.2. Resultados por edades

En las siguientes tablas podemos observar el resultado para las pacientes agrupadas por su edad.

##### 5.9.1.2.1. Punto de corte en los 30 años

En los grupos de pacientes de menos de 30 años, y de 30 años o más, observamos una influencia mucho menor de la edad en la curación de la lesión que en el caso de la progresión. Se mantiene el alto riesgo absoluto de curación para Cobas negativo, y la



mínima probabilidad para HPV16, la cual es discretamente más alta para las pacientes mayores de 30 años, todos ellos muy similares a cuando estudiamos la muestra en su conjunto. No obstante, la diferencia encontrada para HPV16 entre los dos grupos de edades bien podría deberse al tamaño muestral.

**Tabla 59:** Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años

	n	Curación	No curación	Riesgo (95% IC)
HPV16	13	6	7	46.1 (23.7-68.6)
HPV18	2	1	1	50.0 (0.0-100.0)
HPVno16no18	33	25	8	75.7 (64.7-86.8)
HPVneg	15	13	2	86.7 (74.1-99.2)

**Tabla 60:** Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 30 años o más

	n	Curación	No curación	Riesgo (95% IC)
HPV16	15	8	7	53.3 (32.9-73.7)
HPV18	5	3	2	60.0 (26.0-93.9)
HPVno16no18	36	27	9	75.0 (64.3-85.7)
HPVneg	25	22	3	88.0 (78.7-97.2)

#### **5.9.1.2.2. Punto de corte en los 40 años**

En la tabla 62 vemos que por encima de los 40 años las pacientes con un resultado negativo de Cobas se curaron todas, lo que nos da un riesgo del 100% de curación. Es una tasa mayor que para las de menos de 40 años, que es del 81.5%. Sobre HPV16 y HPV18 no podemos obtener conclusiones dado el bajo número de eventos obtenidos en las pacientes mayores de 40 años, si bien los datos apuntan a que el riesgo de curación aumentaría con la edad. En cuanto a HPVno16no18, vemos que los riesgos de curación no varían con la edad.

**Tabla 61:** Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años

	n	Curación	No curación	Riesgo (95% IC)
HPV16	24	12	12	50.0 (33.7-66.3)
HPV18	2	1	1	50.0 (0.0-100.0)
HPVno16no18	53	40	13	75.5 (66.7-84.2)
HPVneg	27	22	5	81.5 (70.6-92.3)

**Tabla 62:** Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más

	n	Curación	No curación	Riesgo (95% IC)
HPV16	4	3	1	75 (42.9-100.0)
HPV18	5	3	2	60.0 (26.0-93.9)
HPVno16no18	16	12	4	75.0 (59.0-91.0)
HPVneg	13	13	0	100

Observamos una influencia mucho menor de la edad que en la curación de la lesión que en el caso de la progresión. Se mantiene el alto riesgo absoluto de curación para Cobas negativo, y la mínima probabilidad para HPV16.

## 5.9.2. Riesgos relativos

### 5.9.2.1. Resultados globales

En el análisis global encontramos dos resultados significativos: para HPV16 y HPVneg.

El riesgo relativo para HPV16 es de 0.7, por lo que su presencia va en contra de la curación de la LSIL. En cambio en el caso de HPVneg el riesgo relativo es de 1.3, indicando que la no detección de un HPV de alto riesgo mediante Cobas 4800 confiere hasta 1.3 veces más posibilidades de curarse que si se detecta algún hrHPV. Para el resto de genotipos no se observaron riesgos estadísticamente significativos.

**Tabla 63:** Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV

	n	Curación	No curación	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	28	15	13	0.006	0.7 (0.5-0.9)
HPV18	7	4	3	NS	0.7 (0.4-1.4)
HPVno16no18	69	52	17	NS	1.0 (0.8-1.2)
HPVneg	40	35	5	0.02	1.3 (1.1-1.5)

NS: no significativo

Observamos así mismo que la magnitud de los riesgos relativos encontrados es mucho menor que en el caso de la progresión.

### 5.9.2.2. Análisis por grupos de edad

#### 5.9.2.2.1. Punto de corte en los 30 años

En el análisis por edades nos encontramos que en ningún grupo se alcanza una significancia estadística para los riesgos relativos, excepto en el caso de HPVneg en las pacientes de 30 años o más. Es un caso claro de que un aumento en el número de casos, como el que tenemos sumando todos las pacientes en el análisis global, consigue hacer que un resultado sea significativo. Es de esperar, aunque no podemos demostrarlo, que aumentando el número de pacientes en ambos grupos obtendríamos un riesgo significativo parecido al global.

**Tabla 64:** Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años

	n	Curación	No curación	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	13	7	6	NS	0.7 (0.4-1.4)
HPV18	2	1	1	NS	0.7 (0.1-2.7)
HPVno16no18	33	25	8	NS	1.0 (0.8-1.4)
HPVneg	15	13	2	NS	1.2 (0.9-1.6)

NS: no significativo

**Tabla 65:** Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 30 años o más

	n	Curación	No curación	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	15	8	7	0.04	0.7 (0.4-1.1)
HPV18	5	3	2	NS	0.8 (0.4-1.6)
HPVno16no18	36	33	12	NS	1.0 (0.8-1.3)
HPVneg	25	22	3	0.056	1.3 (1.02-1.6)

NS: no significativo

**5.9.2.2.2. Punto de corte en los 40 años**

Los resultados son parecidos a los obtenidos en el apartado anterior: no se alcanza la significancia estadística para ningún grupo excepto para HPVneg por encima de los 40 años. Además, para HPV16 en pacientes menores de 40 años el riesgo es también significativo, con un riesgo relativo de 0.6.

Muy interesante es destacar que de la pacientes HPVneg de más de 40 años no hubo ninguna que no se curase.

**Tabla 66:** Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años

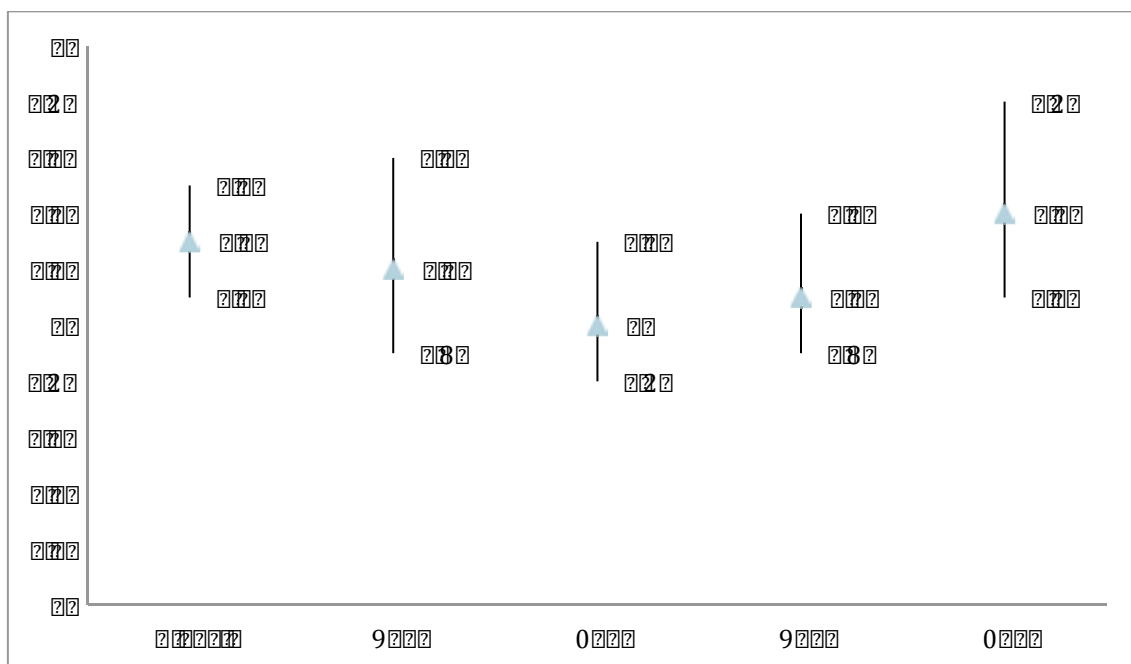
	n	Curación	No curación	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	24	12	12	0,008	0.6 (0.4-0.9)
HPV18	2	1	1	NS	0.7 (0.2-2.8)
HPVno16no18	53	40	13	NS	1.1 (0.9-1.4)
HPVneg	27	22	5	NS	1.2 (0.9-1.5)

NS: no significativo

**Tabla 67:** Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más

	n	Curación	No curación	p	Riesgo (95% IC)
HPV16	4	3	1	NS	0.9 (0.5-1.6)
HPV18	5	3	2	NS	0.7 (0.3-1.5)
HPVno16no18	16	12	4	NS	0.9 (0.6-1.2)
HPVneg	13	13	0	NS	1.4 (1.1-1.8)

NS: no significativo. NA: no aplicable

**Gráfico X:** Riesgos relativos para curación según el resultado HPVneg, con los intervalos de confianza, según el corte de edad

Pese a no ser todos los resultados estadísticamente significativos, podemos ver que el riesgo de curación entre pacientes jóvenes / mayores es de resultado inverso dependiendo de si el punto de corte son los 30 o 40 años. Intuimos que la cohorte de los 30 a los 40 años es muy importante, ya que es capaz de invertir la tendencia del resultado.

### 5.10. Resultado del tratamiento exérecico de las lesiones CIN2+ según el genotipo

De las 14 lesiones que progresaron a CIN2+, 8 de ellas fueron diagnosticadas mediante biopsia dirigida por colposcopia, mientras que las 6 restantes se diagnosticaron en el resultado AP de una conización realizada por una LSIL persistente de dos años de evolución. Las 8 pacientes con biopsia dirigida de CIN2+ fueron tratadas mediante tratamiento exérecico en forma de conización.

En la tabla 69 reflejamos el resultado obtenido en la anatomía patológica de las piezas de estas conizaciones. Recordamos que bajo la etiqueta de HPVno16no18 incluimos aquellas pacientes en las encontramos un virus de alto riesgo que no era ni el HPV16 ni el HPV18.

**Tabla 68:** Relación entre la AP de la conización y el genotipo viral entre las pacientes diagnosticadas de CIN2+ mediante biopsia dirigida por colposcopia

	CIN1 n (%)	CIN2 n (%)	CIN3+ n (%)	Total n (%)
HPV16	0 (0%)	4 (100%)	2 (100%)	6 (75%)
HPV18	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
HPVno16no18	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)
Total	2 (100%)	4 (100%)	2 (100%)	8 (100%)

Ji al cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher significativo,  $p=0.011$

Destacamos que la única lesión producida por HPV18 que progresó en nuestra serie fue diagnosticada tras el tratamiento con conización por LSIL persistente.

Observamos así mismo que las únicas lesiones CIN2+ confirmadas en la pieza de la conización fueron las producidas por el HPV16, mientras que las que eran HPVno16no18 todas fueron CIN1.

## 5.10. Análisis del tiempo en progresar a CIN2+

Tras una media de seguimiento de  $29.4 \pm 17.3$  meses, 17 pacientes progresaron a CIN2+ con una media de  $16.2 \pm 15.8$  meses desde el diagnóstico. Analizamos la influencia del genotipo viral en el tiempo de progresión.

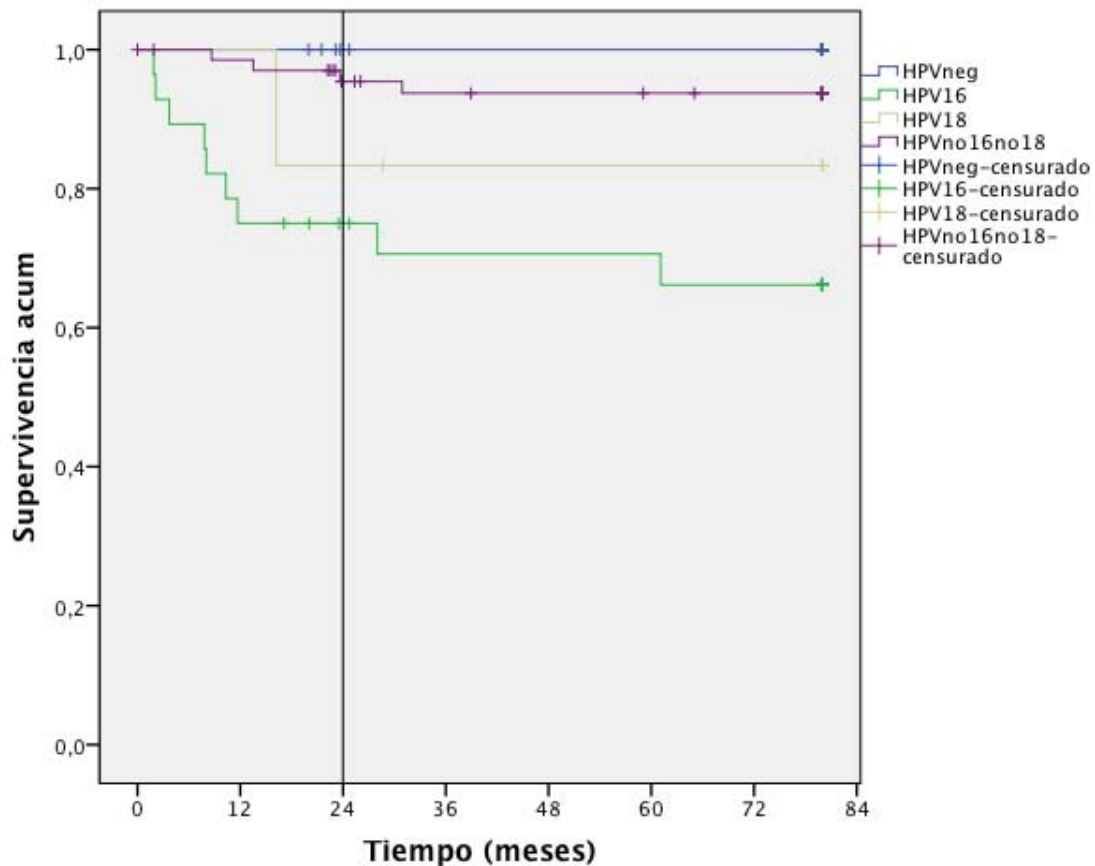
### 5.10.1. Resultados globales

Analizamos la progresión de las LSIL a CIN2+ a través de curvas de Kaplan-Meier. Tal como se observa en el gráfico XI, vemos que la progresión debida a HPV16 es mucho más rápida que para los otros resultados de Cobas, siendo el más lento en progresar el grupo formado por los genotipos no16no18 (HPVno16no18). Estas diferencias son significativas.

En el grupo HPV16 todas las progresiones las observamos dentro del primer año, siendo la mayor parte en los primeros seis meses, y dentro de las tres progresiones a CIN2+ observadas en los primeros 100 días después del episodio inicial, todas fueron positivas para HPV16. Seguramente muchas de estas progresiones no lo son en realidad, sino que la lesión ya estaba presente desde un principio.

Para HPVno16no18 todas las progresiones las observamos en los primeros 14 meses.

Parece por lo tanto que si en el primer año y medio de seguimiento la LSIL no ha progresado, las posibilidades de progresión disminuyen drásticamente.



$p < 0.001$

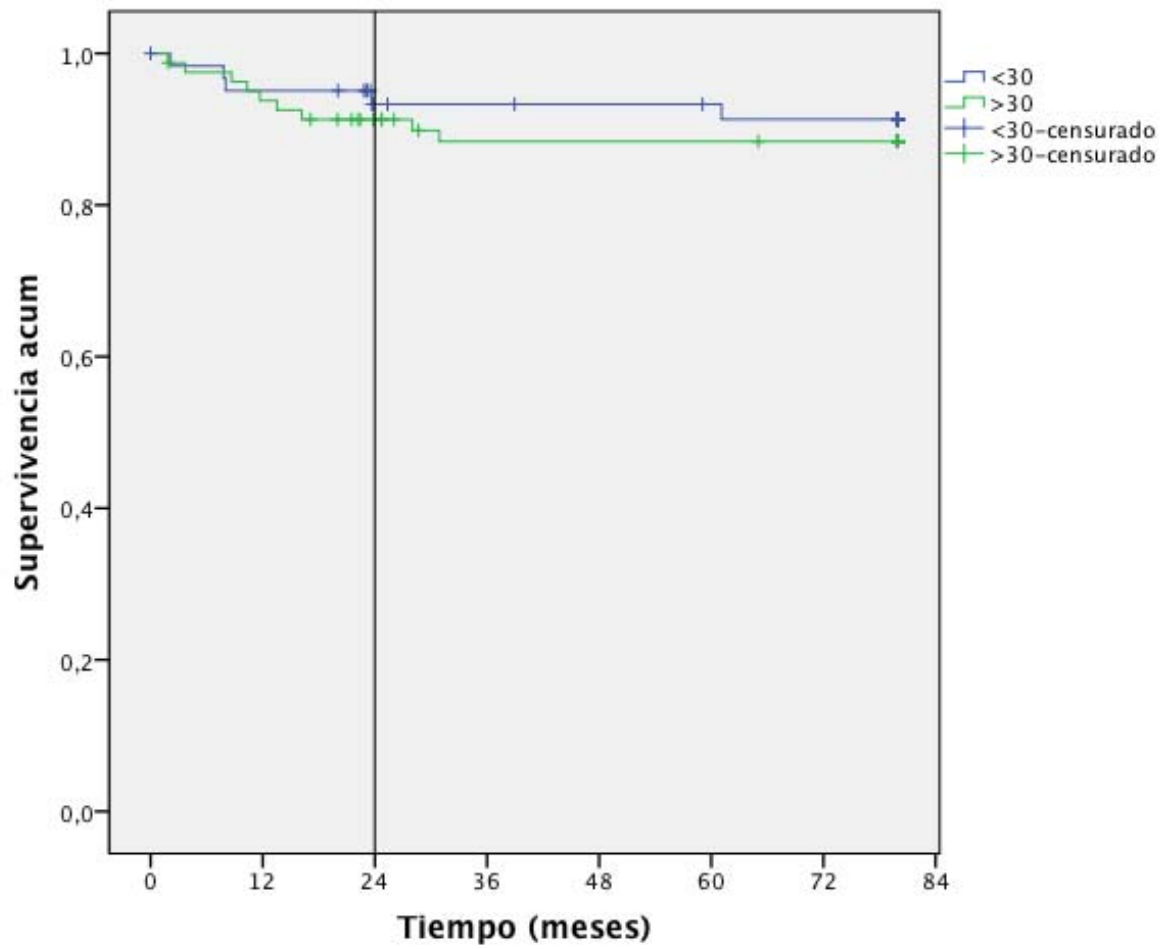
**Gráfico XI:** Curvas Kaplan-Meier para la aparición de CIN2+ según el resultado Cobas

De las 9 pacientes HPV16 que progresaron a CIN2+, más de la mitad (5 pacientes) de los eventos ocurrieron dentro de los primeros 8 meses, y 7 antes del año. De las 4 pacientes HPVno16no18, dos de ellas progresaron durante el primer año, otra durante el segundo año y la cuarta más allá del segundo año.

### 5.10.2. Análisis por edades

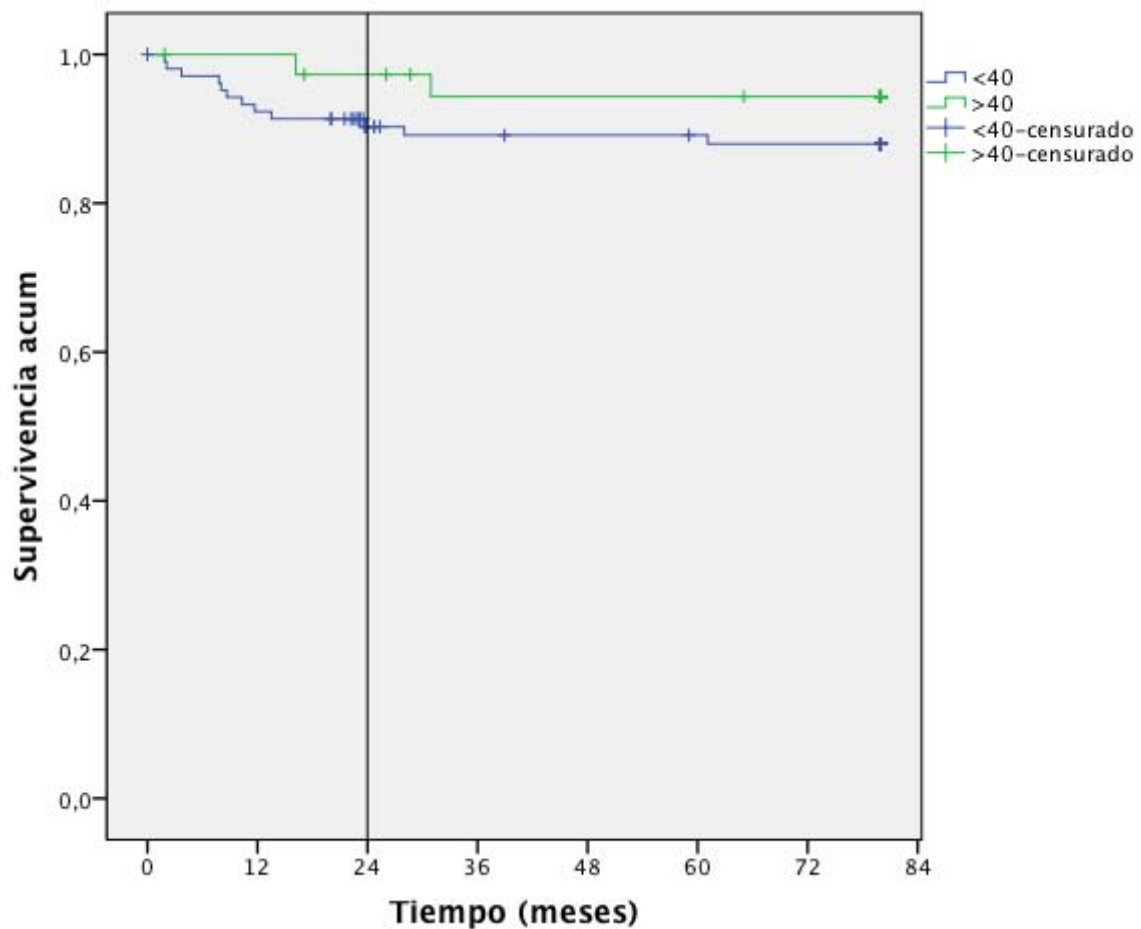
Al analizar la aparición de CIN2+ por grupos de edad, tanto para los grupos con límites en los 30 años (gráfico XII) como en los 40 años (gráfico XIII), observamos que no hay diferencias significativas.





$p=0.562$

**Gráfico XII:** Curvas Kaplan-Meier para la aparición de CIN2+ según el grupo de edad de menos de 30 años, o de 30 años o más



$p=0.257$

**Gráfico XIII:** Curvas Kaplan-Meier para la aparición de CIN2+ según el grupo de edad de menos de 40 años, o de 40 años o más

### 5.11. Análisis del tiempo de curación de LSIL

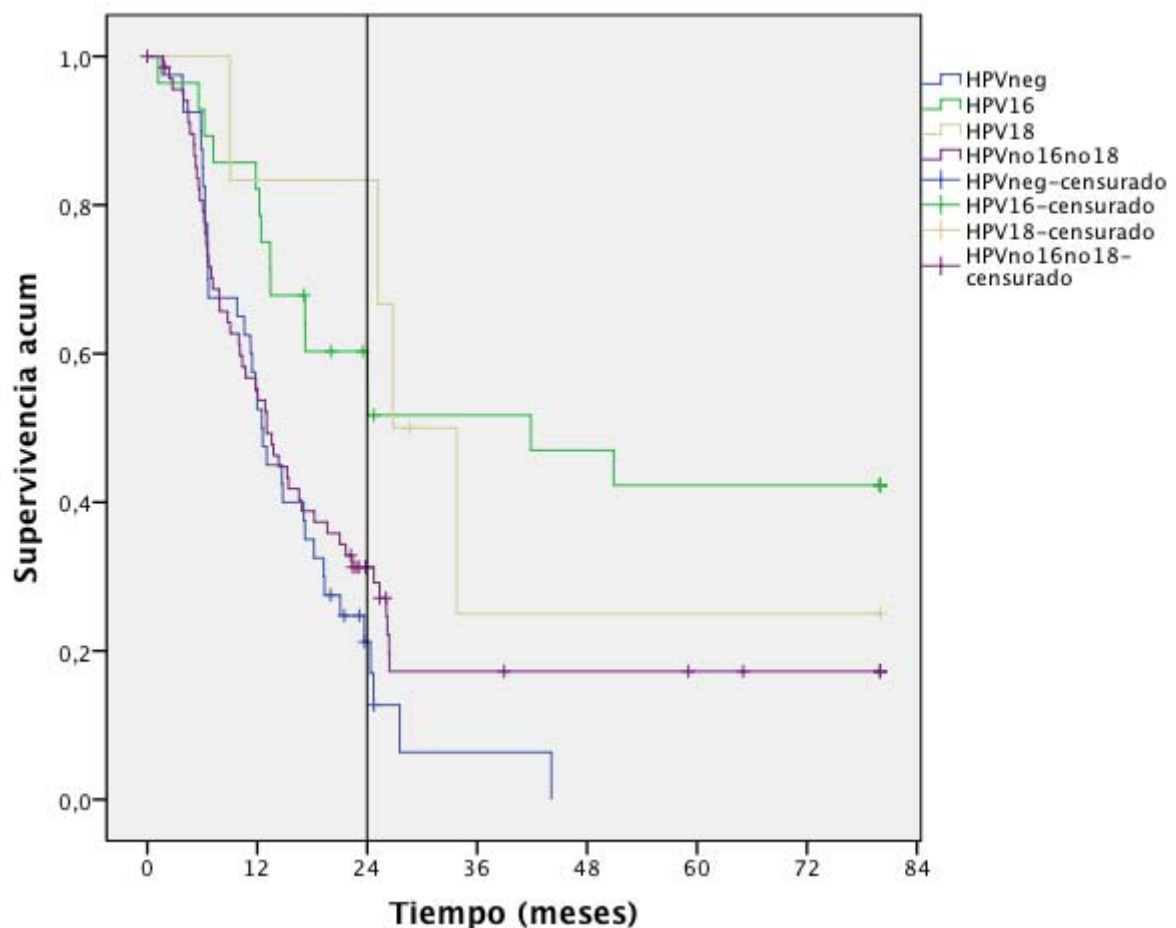
Del total de 143 pacientes objeto del estudio 106 se curaron, al cabo de  $13.5 \pm 9.2$  meses como media desde el diagnóstico.

#### 5.11.1. Resultados por genotipos

Al analizar la influencia del genotipo encontramos diferencias significativas para el tiempo de curación. Para HPV16 y HPV18 dicho tiempo es más lento que para HPVno16no18 y

para HPVneg. Es interesante destacar que las velocidades de curación para HPVno16no18 o para HPVneg son prácticamente idénticas.

A partir de los 24 meses la pendiente de las curvas empiezan a aplanarse, siendo prácticamente planas después de los dos años y medio. Es decir, de no haberse producido la curación en ese tiempo, es muy difícil que se produzca. Tenemos que recordar en este punto que nuestro seguimiento mínimo fue de 2 años, y que la mayor parte de nuestras pacientes a partir de ese período salen de la serie estudiada dado que el protocolo actual indica realizar una conización en estos casos. Por este motivo, curaciones más allá de este período son raras porque debido al diseño es prácticamente imposible encontrarlas.



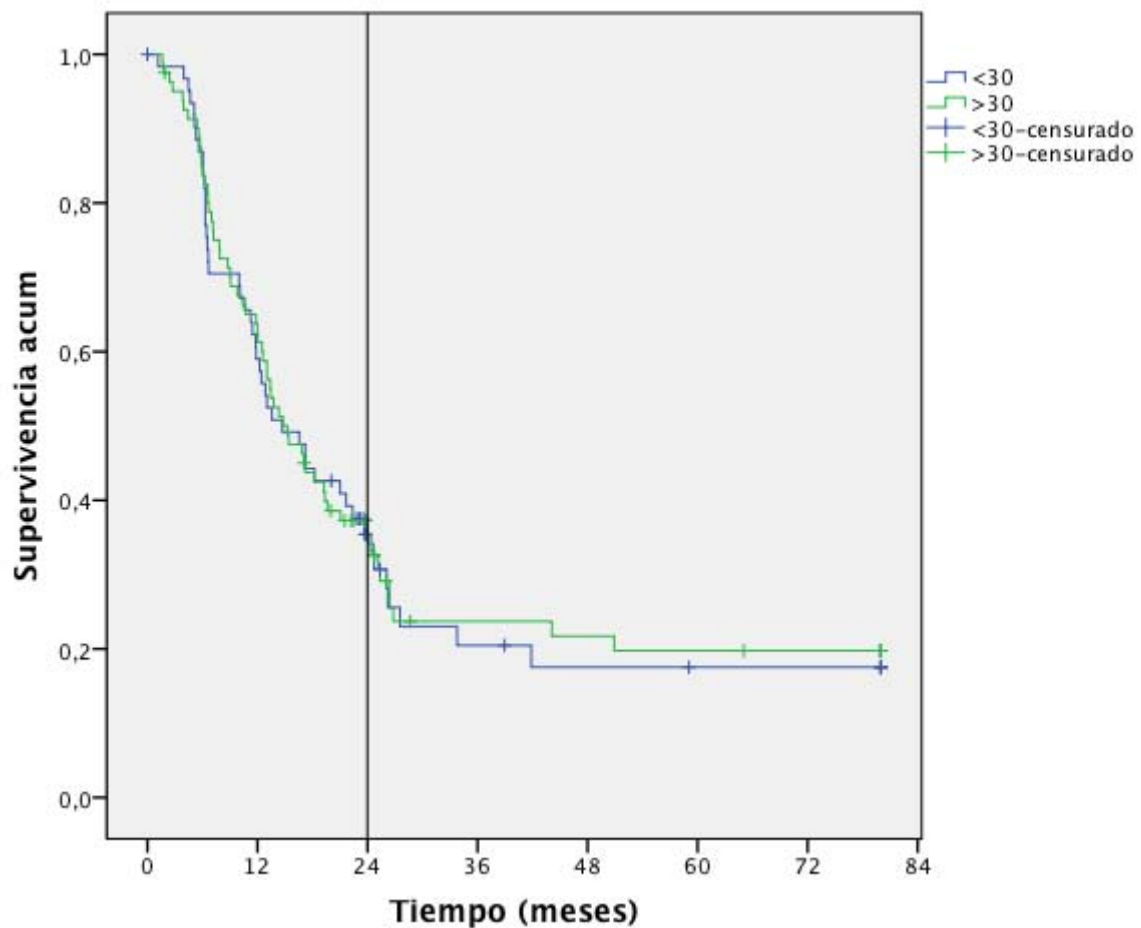
$p=0.002$

**Gráfico XIV:** Curvas Kaplan-Meier para la curación según el resultado Cobas

Para HPV16, al año se habían curado 5 de las 15 pacientes que se curaron en todo el período de seguimiento, mientras que para HPV18 solamente 1 de las 4 pacientes curadas ocurrió en ese primer año. Por contra, más de la mitad de las HPVno16no18, 30 de 52 se curaron en el primer año, y para HPVneg 19 de 35.

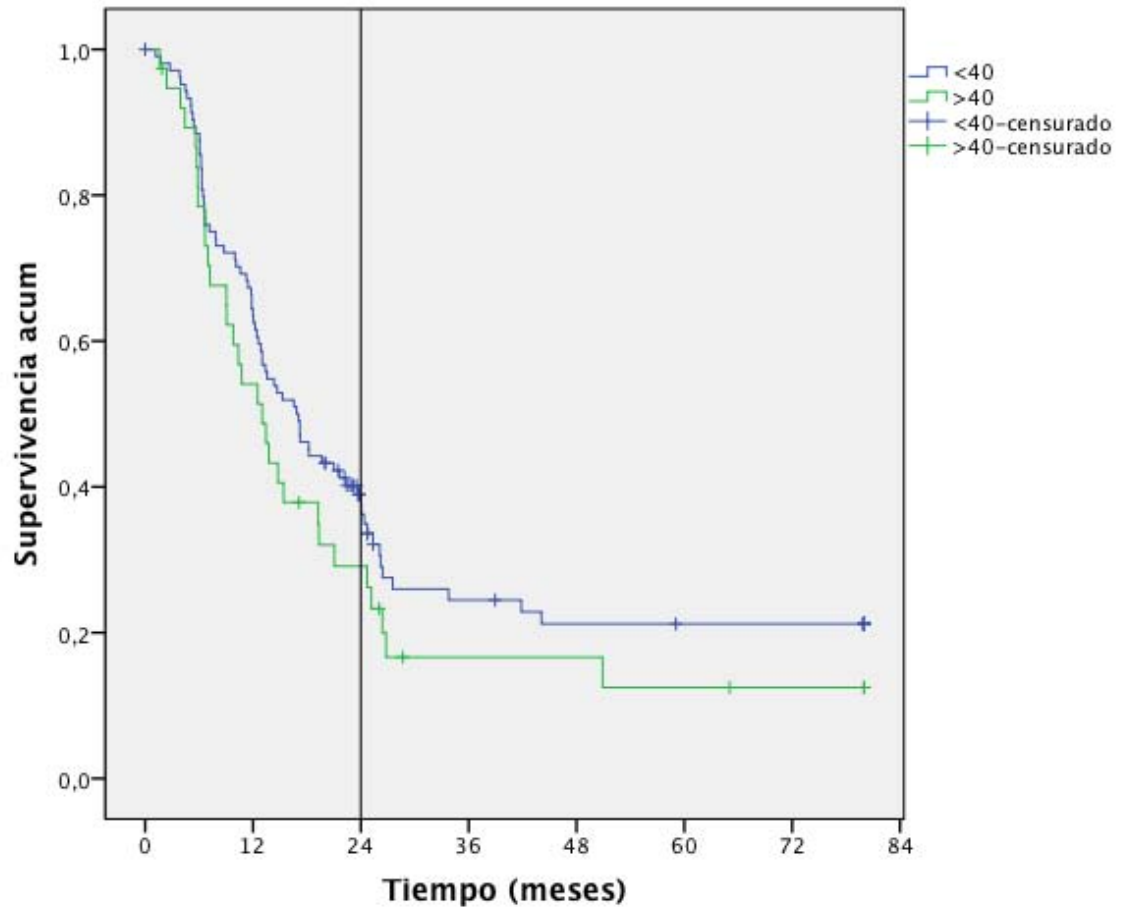
### 5.11.2. Análisis por grupos de edad

Para la curación de las LSIL seguimos sin encontrar diferencias significativas entre las pacientes jóvenes y las mayores, independientemente de si asumimos el punto de corte en los 30 o 40 años, tal y como podemos observar en los gráficos XV y XVI.



$p=0.853$

**Gráfico XV:** Curvas Kaplan-Meier para la curación según los grupos de edad de 30 años



p=0.195

**Gráfico XVI:** Curvas Kaplan-Meier para la curación según los grupos de edad de 40 años

## 6. Discusión

Hasta la fecha actual han aparecido varios trabajos estudiando la distribución del HPV en las lesiones escamosas de bajo grado (LSIL) (17,18,20,52), la influencia del genotipo presente en su evolución (22-25,47), y la validez del método Cobas 4800 como sustituto del HC2 (32,46). No obstante este es el primer trabajo en estudiar la distribución de genotipos en la LSIL y su influencia en la evolución de dichas lesiones utilizando el método Cobas 4800 para el genotipado de los HPV causantes de las mismas. La utilidad de dicho genotipado, los resultados del mismo y su relación con la evolución de las LSIL ha sido el objetivo principal de esta tesis.

### **6.1. La muestra**

La muestra estudiada, 143 casos, es superior a los trabajos sobre LSIL y genotipado comentados durante este estudio, como los de de Zuna *et al.* (18), Khan *et al.* (22) y Delgado *et al.* (20). No obstante, el resto de estudios como el de Matsumoto *et al.* (53) y del de Quint *et al.* (54) estudian más de 500 pacientes con LSIL, y los realizados a partir de grandes estudios prospectivos como el ALTS (38) llegan a los 1572 casos. Normalmente a mayor número de casos más probabilidades de obtener resultados estadísticamente significativos, es por esto que discutiremos más adelante este punto en relación a la significación obtenida en el riesgo para progresión de la lesión.

La edad media de nuestra muestra es muy similar a la de Khan *et al.* (22). En su estudio la edad fue de  $34 \pm 12.6$ , mientras que en el nuestro de  $33.8 \pm 11.1$ . Hay diferencias importantes con el estudio ALTS, analizado por Castle *et al.* (23), en el que la media fue de 25 años. Esta diferencia de edades en las diferentes muestras es un factor importante a tener en cuenta en el momento de comparar los resultados de los diferentes estudios. En muestras más jóvenes la tasa de infección por el virus del papiloma humano sabemos que es más elevada, y tenemos más probabilidades de encontrar infecciones recientes que persistentes. Debido a que nuestra muestra es más madura en términos de edad que la del estudio ALTS, encontrar discrepancias entre nuestros resultados y los obtenidos con el estudio ALTS.

De los análisis estadísticos que realizamos con los datos clínicos el único significativamente estadístico fue el uso de anovulatorios orales, los cuales favorecieron la progresión de la LSIL. Estos datos concuerdan con lo publicado en la literatura (55,56). No pudimos demostrar asociación entre el tabaco con la progresión o curación de la LSIL, a diferencia de lo publicado en la literatura (57). El motivo puede ser la dificultad de obtener a través de un análisis retrospectivo de la historia clínica dicho dato, ya que no podemos diferenciar entre las pacientes habitualmente fumadoras de las que lo son esporádicamente, ni obtener el número de cigarrillos fumados al día. Igualmente el uso del preservativo es difícil de analizar en un estudio retrospectivo, ya que dicho dato hace referencia a su uso en algún momento del seguimiento, pero no se recoge si su uso es sistemático, ocasional o sólo por un período de tiempo.

El tiempo de seguimiento establecido en nuestra muestra de 2 años fue escogido por ser el período de tiempo en el que se recomienda realizar una conización según los protocolos actuales en aquellos casos en los que la lesión de LSIL persiste (36). Al llegar a los 2 años, aquellas pacientes que no se habían curado ni habían progresado a CIN2+ fueron tratadas en nuestra Unidad de Patología Cervical mediante tratamiento exéretico en forma de conización. Seguimientos menores se explican por la progresión a CIN2+ o la curación antes de los 2 años, en los que dicho seguimiento finalizaba al alcanzar uno de los resultados posibles para la LSIL.

Hasta un 16.8% de nuestra muestra no disponía de controles previos. La interpretación lógica y que todos deseáramos es la de que corresponde a la mujeres jóvenes que inician su cribado. Pero un análisis por edades como hicimos demuestra que no es así, poniendo de manifiesto las limitaciones del cribado oportunista existente hoy en día. Según un reciente trabajo de Rodríguez-Salés *et al.* (58) sobre la población de Catalunya, la cobertura del cribado de cáncer de cérvix entre las mujeres entre 25 y 65 años fue del 32.4% de la población, y si nos centramos en aquellas mujeres que solicitaron alguna intervención por parte de los equipos de intervención primaria la cobertura aumenta a un 40.8%. Concluyeron que la cobertura del sistema público en Catalunya incluía una de cada tres mujeres. Este estudio no tiene en cuenta el cribado realizado en el sistema privado por lo que está subestimando la cobertura real, pero de todo modos es evidente a luz de sus datos que el programa de cribado adolece de una cobertura que se encuentra lejos de lo deseable.



El número de colposcopias realizadas fue imposible de recoger a partir de los datos de la historia clínica informatizada. El objetivo de la colposcopia en las lesiones de bajo grado es la de realizar una biopsia dirigida del cérvix para descartar una lesión de alto grado, lo que alteraría la conducta clínica. En nuestra serie encontramos 18 pacientes con biopsias (un 12.6%), dato que dado su bajo número nos hace sospechar que no se llevaron a cabo colposcopias en todas las pacientes en el momento del diagnóstico. Si hubiésemos podido obtener esa información podríamos valorar la correcta aplicación del protocolo actual de la LSIL, habiendo servido como un control de calidad de nuestra práctica asistencial.

## **6.2. Distribución de los genotipos del HPV**

Obtuvimos un resultado de un 72.1% de positividad para hrHPV de las LSIL, aproximándose al 80% en las pacientes menores de 30 años. Dichos datos son análogos a los publicados hasta ahora. En el estudio ALTS(38), uno de los más importantes no sólo pero también por el número de mujeres reclutadas, la proporciones de LSIL positivas para hrHPV fue del 85% (testadas con HC2). Recordemos que la edad media en ALTS fue menor que en nuestra serie, motivo por el que podríamos explicar que nuestro resultado sea discretamente menor. En la revisión Cochrane sobre este tema (43) el resultado obtenido fue de 76% en global, superando el 80% en el caso de mujeres jóvenes. Corroboramos pues con nuestros datos la poca utilidad de la detección de los genotipos de alto riesgo del HPV en su conjunto, en un único resultado, dada su altísima prevalencia. No es posible usarlo ni como método de cribado ni como método de triage.

En cuanto a la participación de los distintos genotipos HPV16, HPV18 y HPVno16no18 estudiados por nosotros, los valores vuelven a ser similares a los publicados, excepto para HPV18. En nuestra cohorte el resultado más frecuente fue el de HPVno16no18, pero porque engloba hasta 14 virus de alto riesgo distintos. El HPV16 lo encontramos en casi el 20% de las pacientes, que se encuentra dentro de los rangos publicados por otros autores, pudiendo afirmar que es el virus más prevalente en las LSIL. En cuanto a las discrepancias observadas con el HPV18, recientemente Alemany *et al.* (21) ha reportado una menor prevalencia de HPV18 en el cáncer de cérvix invasor en nuestro país en comparación con

el resto del mundo. Nuestros datos, y también los de Delgado *et al.* (20,59), confirman que dicha menor prevalencia se observa también las LSIL, por lo que podemos asumir que dichas diferencias son debidas a una diferente distribución geográfica del genotipo en el mundo.

Disponemos de muchos datos respecto a las variaciones en la distribución de los genotipos de HPV en función de la edad. Bosch *et al.* (19,60) en su revisión sobre HPV de 2008, observó que la prevalencia de hrHPV presentaba dos picos máximos, en las jóvenes y alrededor de los 45 años. No obstante estos datos hacían referencia a pacientes con citologías normales. En el reanálisis de ALTS efectuado por Gage *et al.* (47,60) de las LSIL, se observó que la prevalencia de HPV16 era menor por encima de los 30 años respecto a las más jóvenes, aunque no aportaron datos de su significancia estadística. San José *et al.* (22,61) analizó la variación de la contribución de HPV16 y HPV18 al cáncer invasor de cérvix, observando una disminución de la misma entre los grupos formados por mujeres más jóvenes o mayores de 65 años. Finalmente, en el estudio ATHENA (24,31) utilizando el método Cobas para el genotipado de HPV en lesiones ASCUS observaron una disminución de la prevalencia tanto de HPV16, como de HPV18 y de HPVno16no18 con la edad. Cuando correlacionan sus resultados con el diagnóstico histológico de CIN1, se sigue observando la disminución. Es decir, estos estudios apuntan a que a mayor edad menor prevalencia de HPV de alto riesgo y menor prevalencia de HPV16. En nuestra serie no conseguimos replicar estos resultados ni con el análisis por grupos de 10 años, ni con los puntos de corte para los 30 o 40 años. Observamos una disminución en valores absolutos de los distintos genotipos a partir de los 40 años, pero también los diagnósticos de LSIL, por lo que las diferencias no fueron significativas. La excepción fue para el HPV18, en donde a partir de los 40 años es más frecuente, y es estadísticamente significativo. De los estudios reflejados anteriormente, realmente los únicos datos comparables serían los de Gage *et al.* (47,62) que es el único que parte de citologías LSIL. El resto o bien son citologías normales, o ASCUS, o cánceres invasores. Unos de los motivos de nuestros distintos resultados podría ser el volumen de la muestra. Los trabajos publicados con muestras similares a la nuestra no aportaron ningún dato respecto a la edad. Los estudios citados anteriormente en este párrafo son todos grandes ensayos clínicos con un número muy elevado de participantes. Así por ejemplo en nuestra serie encontramos un caso de HPV16 en una paciente mayor, este hallazgo ha podido hacer perder significancia

a una hipotética diferencia en la distribución de dicho genotipo según la edad. Que ese caso sea un hecho aislado o no es lo que podríamos dilucidar en una muestra más amplia, lo cual podría llevar a cambiar nuestra conclusión. Otra posible explicación podría deberse a las diferencias geográficas observadas en la distribución de los distintos genotipos. No obstante Alemany *et al.* (21,37) en su estudio de los cánceres invasores de cérvix en España sí encontró diferencias, encontrando que HPV16 y HPV18 eran más frecuentes por debajo de los 30 años, en una población comparable a la nuestra en términos geográficos. Nos inclinamos más por lo tanto a que nuestros resultados podrían diferir de los publicados más por motivos de tamaño muestral, que por otros motivos.

En cuanto a la mayor prevalencia de HPV18 en las pacientes de más edad podemos explicarlo por la historia natural particular de este genotipo. Su evolución más lenta (como ya hemos comentado con anterioridad (22)) hace que las lesiones que produce se encuentren más frecuentemente en pacientes mayores. Es lógico entonces encontrar en las LSIL de las pacientes de 40 años o más una mayor prevalencia comparado con el resto de genotipos.

### **6.3. Comparación método Cobas con HC2**

Nuestros valores de sensibilidad y especificidad tanto de Cobas como de HC2 para la detección de CIN2+ son comparables a los publicados en muestras LSIL. Para Cobas encontramos una sensibilidad mayor que para HC2, llegando a tener un valor predictivo negativo del 100%. La sensibilidad es elevada del 90-100% como en la abundante literatura publicada sobre el tema, como ejemplo en Lloveras *et al.* (32). Observamos que el hecho de aplicar el test en LSIL empeora la especificidad de manera drástica, como se observa en el trabajo de Arbyn *et al.* (33) en donde la especificidad es de 46.8% para citologías ASCUS o más, mientras que para citologías LSIL disminuye a 28.6% (en línea con nuestros resultados).

Concluimos que el método Cobas es un método válido para sustituir al HC2 para la detección de HPV de alto riesgo.

#### 6.4. Evolución y resultado final de la lesión LSIL

En nuestra muestra observamos unas tasas de curación (74.1%) y progresión a CIN2+ (9.8%) a los dos años distintas de la reportadas clásicamente en la literatura. Los datos más difundidos son los de Östor *et al.* (6) que se refieren a datos histológicos, con una curación del 57% y progresión del 11%. Melnikow *et al.* (7) hizo lo propio con resultados citológicos con unos resultados de 47.4% de curación frente a un 20.8% de progresión.

Los motivos para estas diferencias pueden ser múltiples. Los factores de riesgo que sabemos influyen en la evolución de la LSIL pueden ser distintos en los distintos estudios (no se informan en los estudios citados anteriormente). Además, estamos hablando de estudios realizados en la década de los 90. Factores de riesgo tan importantes como el tabaco ha experimentado un cambio social, hoy en día el hábito tabáquico ha disminuido (63) con lo que puede haber favorecido un incremento en las tasas de curación. Otros factores de riesgo como el uso de anovulatorios orales o el de métodos de barrera son más difíciles de valorar.

Además, el diagnóstico citológico de LSIL y los métodos para su diagnóstico han experimentado cambios que pueden haber provocado que las LSIL diagnosticadas en los años 90 (cuando fueron realizados los estudios citados) hoy fuesen clasificadas como citologías normales, ASCUS o HSIL. Nuestros casos han sido procesados y examinados con la plataforma Thin-Prep, que incluye lectura automatizada de citología ginecológica, obteniendo en general mejores resultados diagnósticos que la citología convencional (64).

Estudios más recientes(54,62) muestran otros datos también discrepantes entre ellos, evidenciando que el hecho de la complejidad de factores que influyen en la evolución de la LSIL hace difícil su comparación entre los distintos estudios.

Podemos afirmar no obstante que la tasa de curación observada en nuestra serie es mayor que la clásicamente reportada. Prácticamente tres de cada cuatro lesiones LSIL evolucionaron espontáneamente a su resolución en 2 años, lo que confirma el buen pronóstico de esta lesión.

En algunos casos encontramos un diagnóstico de progresión de la LSIL a los pocos meses de la primera citología. Podemos interpretar estos resultados no como una progresión real, sino como el diagnóstico histológico de una lesión de alto grado ya existente en el inicio, pero que la citología infra-diagnosticó. Este hallazgo es un argumento más para reforzar la importancia de la colposcopia ante una LSIL con HPV16, ya que la tres pacientes con diagnóstico de CIN2+ dentro de los primeros 100 días posteriores al diagnóstico de la LSIL eran HPV16 positivas.

Analizamos la influencia de la edad en las tasas de curación, persistencia o progresión de la LSIL, sin obtener ningún resultado significativo. Matsumoto *et al.* (53) y Quint *et al.* (65) obtienen ambos que la probabilidad de persistencia es mayor en pacientes mayores de 30 años, con lo que su riesgo de progresión sería mayor. Discacciati *et al.* (66) siguieron durante una año a pacientes afectas de CIN2, con un seguimiento trimestral. En dicho estudio analizaron la influencia de la edad en su resolución o progresión, sin encontrar que tuviese ninguna relación. Los resultados de nuestro estudio en este aspecto coinciden con los de los trabajos en donde la edad no es un factor pronóstico, como clásicamente se había postulado. En nuestra serie la edad no es un factor pronóstico para la curación o progresión de la LSIL. En el siguiente apartado (6.5.2), cuando discutamos la influencia de la edad junto con el genotipo, intentaremos dar explicación a esta aparente paradoja.

Como era esperable y de acuerdo con la literatura publicada, proporcionalmente el virus HPV16 se encontraba con mucha más frecuencia en las lesiones que progresaron a CIN2+. Pese a ser estudios transversales, dicho dato ya se observa en la serie de Zuna *et al.* (18) y en el meta-análisis de Clifford *et al.* (17). Observamos lo contrario para HPVneg, hasta el punto de no encontrarlo nunca en las lesiones CIN2+. Otras series publicadas sí que encuentran algunas lesiones de alto grado con HPVneg, aunque en una proporción mínima y con la duda de si realmente es así o bien se trata de un falso negativo de la técnica de detección de HPV(11). No conseguimos obtener resultados significativos para HPV18, probablemente por el bajo número de casos obtenidos en nuestra muestra. Además se ha postulado que las lesiones por HPV18 serían más difíciles de diagnosticar y más lentas en su evolución, por lo que nuestro período de seguimiento de 2 años podría haber sido insuficiente(22) para poder detectar la progresión a CIN2+.

En nuestro estudio, únicamente la presencia de HPV16 en las lesiones de LSIL conllevó un riesgo estadísticamente significativo de progresión de las mismas a CIN2+.

## 6.5. Riesgos para progresión a CIN2+

### 6.5.1. Riesgos globales

En nuestra muestra los únicos riesgos significativos para progresión a CIN2+ los encontramos en los casos de presencia de HPV16, HPVno16no18 y la coinfección de HPV16 con otros virus de alto riesgo. Dado que no encontramos ningún caso de progresión para HPVneg en nuestra serie ese riesgo sería 0. Es posible que al aumentar el tamaño muestral se encontrara algún caso de CIN2+ dentro del grupo de HPVneg, lo que atribuiríamos a falsos negativos de la técnica de HPV(11) más que a la posibilidad de que estas lesiones estuvieran producidas por virus de bajo riesgo. En estos casos podríamos calcular ese riesgo como otros autores si bien estos utilizan otros métodos menos sensibles para la detección de HPV. Un hallazgo de una LSIL con HPVneg podría por lo tanto ser considerada como una lesión benigna, ya que no tendría la potencialidad de evolucionar a una lesión neoplásica. Las implicaciones para la práctica clínica serían muy importantes, porque hoy en día una LSIL de 2 años de evolución, pese a no ser causada por un hrHPV, es tratada según las guías clínicas vigentes. El motivo es que se trataría de una lesión persistente, de una infección por HPV persistente, y sabemos que la persistencia es un importante indicador de riesgo de progresión. Pero si la lesión carece de virus de alto riesgo el riesgo de progresión desaparece, independientemente de la persistencia de la misma. Parece lógico pues plantear que en este subgrupo de LSIL, aquellas en la que no se detecta un virus de alto riesgo, la actitud expectante *sine die* sería una opción válida.

En todos los trabajos revisados que han estudiado el riesgo de progresión a CIN2+, el riesgo absoluto para HPV16 es del orden de 3 a 4 veces mayor que para otros virus de alto riesgo. En la tabla 70 podemos comparar dichas cifras. En nuestra serie encontramos una diferencia mucho mayor, hasta 6 veces mayor. Es decir, el riesgo relativo de progresión de HPV16 vs HPVno16no18 es más elevado en nuestra cohorte que en las otras cohortes publicadas. De hecho se aproximan a los resultados de Khan(22), aunque en su trabajo analizase la progresión a CIN3+ y no a CIN2+, o a los del estudio ATHENA, que se llevó

a cabo con citologías ASCUS y no LSIL. Observamos que los valores para los distintos estudios son muy variables, con riesgos absolutos que van del 17.1 al 31.5 para citologías ASCUS HPV16.

**Tabla 69:** Riesgos absolutos para CIN2+ de los distintos genotipos en la literatura (con IC 95%)

	Grupo citológico	HPV16	HPV18	HPVno16no18	hrHPV	HPVneg
ATHENA(59)	ASCUS	31.5 (24.2-40.0)	4.3 (1.2-14.5)	8.6 (6.0-12.1)	14.0 (11.3-17.3)	0.75 (0.4-1.5)
Gage(60)<30a	LSIL	50.3	-	21.0	30.7	-
Gage(60)>30	LSIL	56.8	-	29.8	29.9	-
Khan(22) (riesgo a CIN3+)	LSIL	30.0 (1.6-58.4)	0.0	4.0(0.0-11.7)	9.1(0.0-26.1)	-
Berkhof(24)	ASCUS- LSIL	48 (38-58)	29 (15-47)	27 (21-33) <sup>5</sup>	-	-
Einstein(67)	ASCUS	17.1 (13.0-22.2)		4.0 (2.6-6.1)	-	-
Matsumoto(53) (hazard ratio)	LSIL	7.63 (0.9-64.6)	0.0	5.94 (0.9-44.4)	-	-
Serie presente	LSIL	32.1 (17.1-47.2)	14.3 (0.0-38.5)	5.8 (0.4-11.1)	-	0.0

Es difícil encontrar un motivo para estas discrepancias. Diferencias en las poblaciones estudiadas podrían ser una razón de la diferencia en los riesgos. Observamos en los datos publicados también muchas variaciones entre ellos. En el estudio ATHENA el riesgo de CIN2+ para citologías ASCUS HPVno16no18 es de 8.6%, mientras que para Einstein es de 4% y para Berkhof (incluyendo LSIL junto a los ASCUS) del 27%. La influencia de la

<sup>5</sup> Incluye HPV18

población en estos resultados tanto se puede explicar por las diferencias en la edad de las cohortes, como por una diferente distribución de los distintos genotipos dentro del grupo HPVno16no18. Sabemos que no todos los HPVno16no18 tienen el mismo riesgo de progresión, y el hecho de que en una población estén más representados algunos genotipos más agresivos que otros nos haría obtener un riesgo para HPVno16no18 más elevado que para otras poblaciones.

Como en estas series publicadas encontramos que el riesgo para progresión es máximo para HPV16, seguido por HPVno16no18. Para HPV18 muchos estudios no encuentran un riesgo elevado, y en nuestro caso pese a ser de 14.3 no fue significativo. Atribuimos dicho resultado a la baja prevalencia de HPV18 en nuestra muestra, lo que hace que los márgenes de confianza sean tan amplios que incluso incluyen el 0. En las otras series esto viene explicado por el hecho que las lesiones producidas por HPV18 son más lentas en aparecer, y a que su diagnóstico es más difícil por localizarse sobretodo lesiones en el canal cervical. Estos dos hechos hacen que el diagnóstico de las lesiones producidas por HPV18 aparezcan mucho después de los tiempos de seguimiento de la mayor parte de los estudios, por lo que no llegan a detectar ningún riesgo significativo. En el estudio de Khan *et al.* (22) en el que el seguimiento de 10 años es mucho mayor que el habitualmente analizado se observa este dato. Es por tanto lógico que con el seguimiento de 2 años el posible riesgo añadido para este genotipo no sea observado.

El riesgo para los genotipos HPVno16no18 es inferior al observado para hrHPV. La contribución de HPV16 a ese pool de genotipos que llamamos hrHPV hace aumentar el riesgo. Observamos que gracias a la tipificación, de ese conjunto diverso de genotipos de alto riesgo somos capaces de discernir dos poblaciones distintas: aquellas que son HPV16 a las que les elevamos de manera muy importante el riesgo para CIN2+, y las que no lo son el riesgo de las cuales lo disminuimos. Nos ofrecería esta distinción alguna ventaja clínica? Muchos trabajos han explorado esta opción de cribado de la LSIL, pero hasta el momento no han concluido que pueda ser útil. El motivo es que el riesgo para CIN3+ es igual o superior a 10, que es el límite a partir del cual Castle *et al.* (46) cree indicada la realización de una colposcopia. Como podemos observar en la tabla 71, la mayor parte de estudios incluyen dentro de sus límites de confianza este valor. No obstante en nuestra serie encontramos un riesgo inferior, que aunque no es significativo, en su límite superior sí



sobrepasaría el límite referido. Es importante remarcar que nuestro resultado hace referencia al riesgo para CIN2+, cuando Castle *et al.* se refiere al riesgo de CIN3+.

**Tabla 70:** Riesgos absolutos para CIN2+ y CIN3+ en la literatura para HPVno16no18

	Grupo citológico	HPVno16no18	HPVno16no18
		Riesgo Absoluto CIN2+	Riesgo Absoluto CIN3+
ATHENA(59)	ASCUS	8.6 (6.0-12.1)	4.4 (2.7-7.2)
Gage(60)<30a	LSIL	21.0	10.0
Gage(60)>30	LSIL	29.8	12.8
Khan(22)	LSIL	-	4.0(0.0-11.7)
Berkhof(24)	ASCUS- LSIL	27 (21-33) <sup>6</sup>	12 (8-17)
Serie presente	LSIL	5.8 (0.4-11.1)	-

En nuestro caso no lo calculamos debido al escaso número de eventos encontrados (3 CIN3+, de los cuales sólo 1 era HPVno1618 positivo sin HPV16, el resto todos incluían HPV16), lo cual nos llevaría a un resultado con poca potencia. Observamos que la diferencia de riesgo absoluto entre la progresión a CIN2+ y a CIN3+ en los distintos trabajos suele ser de 2, es decir, el riesgo a evolucionar a CIN3+ es la mitad que el progresar a CIN2+. Esta diferencia también se observa en los distintos intervalos de confianza. Extrapolando esta relación a nuestros datos, el riesgo para progresión a CIN3+ sería la mitad de 5.8 (1.4-11.9), es decir, 2.9 y con un límite de confianza superior por debajo de 10. De hecho, calculándolo con nuestros datos (y sabiendo su poca fiabilidad dado el escaso número de casos), el resultado es de 1.4 (0.0-4.8).

Analizando los resultados de las conizaciones realizadas obtenemos más datos a favor de dicho planteamiento. Los CIN3 hallados en nuestra serie fueron sometidos a tratamiento exéretico, siendo la anatomía patológica (AP) definitiva de la conización de CIN3 para los 2 casos HPV16, mientras que para el caso HPVno16no18 fue de CIN1. Si ampliamos esta

<sup>6</sup> Incluye HPV18

selección a las pacientes diagnosticadas de CIN2+ por biopsia dirigida por colposcopia, observamos que los 2 casos tratados en los que exclusivamente intervenían virus HPVno16no18 en la AP de la conización encontramos lesiones tipo CIN1. Para las lesiones CIN2+ producidas por HPV16 encontramos un resultado diametralmente opuesto, las 6 pacientes fueron diagnosticadas de CIN2 o CIN3+ en la AP de la conización. Sintetizando, todas las histologías de los conos realizados con motivo de un diagnóstico de CIN2+ en biopsia dirigida fueron CIN1. Y los únicos conos que fueron CIN2 en pacientes HPVno16no18 se realizaron con la indicación de LSIL persistente. Estos datos refuerzan la importancia de la colposcopia y el tratamiento si la lesión progresa sobretodo en las pacientes HPV16 positivas, mientras que para las que presentan HPVno16no18 la actitud podría ser más conservadora, empezando quizás por no proponer una colposcopia inmediata en el momento del diagnóstico. Los resultados hallados, ¿son una sobreestimación de la lesión por parte de la biopsia dirigida para los casos HPVno16no18, o bien la lesión se encontraba en proceso de curación? O quizás las lesiones producidas por HPVno16no18 serían de menor tamaño que las producidas por HPV16, por lo que la biopsia diagnóstica y su inflamación posterior ¿podrían haber provocado su regresión? No podemos afirmar cuál de estas opciones es la correcta, pero sí que los CIN2+ por HPV16 se confirmaron en el estudio histológico de la pieza de conización, mientras que en los casos HPVno16no18 esto no fue así.

Del ejercicio matemático propuesto anteriormente para calcular nuestro riesgo para CIN3+ evidentemente no podemos emitir conclusiones significativas, pero sí apuntar que quizás con una mayor muestra y calculando entonces el riesgo de CIN3+ para HPVno16no18 nos alejaríamos del límite del 10%, con lo que en estos casos podríamos no indicar la realización de una colposcopia de manera inmediata a la detección de una lesión tipo LSIL. Nuestros hallazgos en las piezas de las conizaciones refuerzan esta hipótesis. Las conclusiones que obtendríamos son tan interesantes que hemos decidido continuar y ampliar este mismo estudio.

### 6.5.2. Riesgos por grupos de edad

El análisis por grupos de edad mostró leves diferencias entre pacientes menores de 30 años y las de 30 años o más, con un mayor riesgo para HPV16 y HPVno16no18 (éste último no significativo) para las pacientes mayores. En el análisis con el corte a los 40 años las diferencias para HPVno16no18 disminuyen (pero siguen sin ser significativas), y para HPV16 sorprendentemente cambia la tendencia. Es en las pacientes de menos de 40 años en donde el riesgo de progresión es mayor. Llegamos a esta afirmación con sólo 4 pacientes, de las cuales ninguna progresó a CIN2+, por lo que este hallazgo ¿podría ser explicado por problema en el tamaño muestral? En un estudio de Rodríguez *et al.* (14) observamos resultados similares. En sus datos un 12.2% (5 de 41) de las nuevas infecciones producidas por HPV16 en pacientes menores de 34 años progresaron a CIN3, mientras que de las 17 pacientes de 34 años o más con HPV16 ninguna evolucionó a CIN3. Estos datos son análogos a nuestros hallazgos.

Para HPVno16no18 el riesgo absoluto perdió su significancia, pudiendo ser explicado por el volumen muestral.

La relación de la edad con el riesgo de progresión ha sido objeto de numerosos trabajos con resultados dispares. Según el estudio de Khan *et al.* (22) los genotipos HPV16 y HPV18 contribuyen más a las lesiones CIN3+ en las pacientes mayores de 30 años que los otros virus de alto riesgo. En un subanálisis del estudio ATHENA(68) Stoler *et al.* reporta que el riesgo absoluto de HPV16 de CIN2+ en pacientes de 40 años o más es inferior al de las pacientes menores de 40, y que para HPVno16no18 ese riesgo es constante para cualquier edad. Gage *et al.* (60) por contra encuentra un riesgo absoluto para HPV16 menor en las pacientes mayores de 30 años, aunque no es estadísticamente significativo. Nosotros en nuestra serie obtenemos un resultado acorde con Gage *et al.* (60), las pacientes de más de 30 años de nuestra serie tienen un riesgo superior pero no significativo para evolución a CIN2+ si hay presencia de HPV16. No obstante, asumiendo un punto de corte en los 40 años obtuvimos el resultado aportado por Stoler *et al.* Parece que la cohorte formada por las pacientes entre 30 y 40 años es un grupo importante ya que es capaz de cambiar el signo de los resultados, hipótesis apoyada por los datos ya comentados de Rodríguez *et al.* (14), en donde el punto de corte lo sitúan en los 34 años.

El motivo de la discrepancia en cuanto a la edad en la evolución de las LSIL parece esclarecido en el trabajo citado de Rodríguez *et al.*, y apoyado por Castle *et al.* (69) y Maucort-Boulch *et al.* (13). Castle *et al.* encuentra que la persistencia en un período de 1 año de HPV16 confiere un riesgo anual del 65.9% de CIN2+ en las pacientes menores de 30 años, mientras que en las pacientes de 30 años o más disminuye al 27.2%. La respuesta a estos datos nos la ofrece Maucort-Boulch *et al.*, en donde estudian por separado las infecciones prevalentes (pacientes con positividad para HPV sin saber el momento de la infección) de las incidentes (pacientes en las que tenían historia previa de negatividad para HPV). Publican que para las infecciones prevalentes, la edad sí es un factor pronóstico (a más edad más riesgo de progresión a CIN2+), mientras que para las incidentes no hallan dicha relación. Según ellos, los estudios que avalan la tesis que las pacientes mayores tendrían más riesgo de progresión a CIN2+ en realidad lo que están estudiando es un grupo de pacientes con infección persistente por HPV (con un riesgo mayor por lo tanto de progresión) con otro más joven con infecciones incidentes y de menor persistencia (y por lo tanto con menor riesgo de progresión). En nuestra serie más de la mitad de las pacientes disponían de dos citologías negativas inmediatamente anteriores, y más del 80% tenían al menos una. Es decir, podemos afirmar que la mayor parte de nuestras pacientes presentaban una infección incidente, que no prevalente, y con lo expuesto hasta ahora en estos casos a más edad menos riesgo de progresión. Este hallazgo es precisamente el que obtuvimos en nuestros datos.

Con lo comentado hasta ahora, podríamos afirmar que en una paciente de más de 40 años con un cribado correcto, el hallazgo de un HPV16 no le conllevaría mayor riesgo de progresión a CIN2+ que a una paciente joven. Sin embargo, en una paciente sin el cribado adecuado, este riesgo sí que se vería incrementado de forma importante, no ya por la edad de la paciente, sino por que podemos estar diagnosticando una infección persistente, la cual sí presenta un riesgo mayor. Es importante este punto ya que en el protocolo actual de cribado, la detección de HPV se indica precisamente en las pacientes mal cribadas mayores, que es donde vemos que nos puede seleccionar una población de riesgo.

## 6.6. Riesgos para curación

Pese a ser un parámetro poco estudiado, creímos que era de interés también calcular el riesgo que aporta cada genotipo para la curación de la LSIL. Si bien es cierto que el objetivo principal es la detección de CIN2+, los datos referentes a la curación podrían dibujarnos un grupo de mujeres a las que podríamos tranquilizar, no ya informándolas de una baja probabilidad de progresión, sino de una alta tasa de curación, lo que incluso podría llevar a ofrecerles un manejo aún más conservador de sus lesiones. Así mismo, los intervalos entre controles también podrían ser superiores a los seis meses, pasando a ser anuales con una seguridad elevada.

Otras ventajas podíamos obtener de este análisis ya que las alteraciones leves de las citologías cérvico-vaginales pueden afectar psicológicamente a las pacientes. El hecho de tener una infección por HPV que no progresa, pero a la vez no poder adoptar ninguna actitud (exceptuando abandonar el tabaquismo) ni recibir ningún tratamiento para ayudar en la curación les produce a determinadas pacientes ansiedad. Poder ofrecer una información fidedigna y tranquilizadora respecto a sus probabilidades de curación podría ser de ayuda.

Consideramos que las pacientes con el resultado de citología normal pero hrHPV positivo en el último control del seguimiento presentaban persistencia de la LSIL. Dado que no disponían de citologías previas normales, y que clínicamente las manejaríamos como persistencia de la lesión (realizaríamos un nuevo control a los seis meses ya que no disponíamos de dos citologías normales), consideramos más ajustado a la realidad englobarlas dentro del grupo de persistencia de la lesión.

En nuestros resultados observamos que la no detección de HPV por parte de Cobas nos ofrece un riesgo altísimo de curación de la LSIL, del 87.5%, y dicho resultado no se ve afectado por la edad. Maucort-Boulch *et al.* (13) ya nos refiere en su trabajo que la edad no es factor pronóstico para el aclaramiento de las infecciones incidentes, que serían la mayoría de las que aparecen en nuestro estudio. No obstante, es necesario remarcar que las 4 pacientes con 40 años o más con resultado HPVneg se curaron en su totalidad, con lo que

el riesgo absoluto de curación en este subgrupo sería del 100%, datos que como ya hemos citado anteriormente son análogos a los encontrados por Rodríguez *et al.* (14).

Según nuestra serie, por lo tanto, un resultado negativo para HPV mediante Cobas nos permitiría tranquilizar mucho a las pacientes, e incluso alargar el período existente entre los controles seriados. Ninguna paciente progresó, la mayor parte regresaron, y por encima de los 40 años todas ellas se curaron. Como comentamos este dato es idéntico al ofrecido por Rodríguez *et al.* (14), en dónde ninguna paciente con infección nueva por HPV16 de 34 años o más progresó a CIN3+.

Para HPV16 observamos que el riesgo de curación es superior en las pacientes mayores (ya sea con el punto de corte en los 30 o en los 40 años), y observamos una tendencia en el mismo sentido para el resto de genotipos. De nuevo encontramos paralelismo con el estudio de Rodríguez *et al.*, el motivo para este hallazgo es desconocido por el momento.

En los riesgos relativos observamos que la magnitud de los resultados observados es mucho menor que para la progresión. El genotipo es mucho más importante para predecir la progresión de una lesión que no para su curación. Intuimos de esta manera que los cofactores que intervendrían en la curación/progresión de la lesión tendrían un papel más importante en la resolución de la lesión que no en la progresión, en relación al genotipo de HPV, con lo que podría ser una línea interesante de investigación en el futuro.

## **6.7. Tiempos de evolución de las lesiones**

Hicimos dos análisis distintos con el tiempo de evolución de las lesiones. El primero fue con los distintos resultados de Cobas, el segundo en base a la edad (de nuevo 30 y 40 años).

Para el estudio con la edad, obtuvimos unos resultados similares con cualquiera de los cuatro grupos de edades. Este efecto lo observamos tanto en el tiempo de progresión a CIN2+, como el tiempo de curación. Para el punto de corte de 40 años la diferencia fue algo mayor, sugiriendo una velocidad de curación mayor y de progresión menor, pero esta

diferencia está lejos de ser significativa. Estos resultados no obstante apuntan en la dirección de que la infección por HPV en mujeres mayores probablemente tenga un curso más indolente, tal como hemos visto anteriormente (13,14).

Cuando analizamos el tiempo en aparición de lesiones CIN2+ observamos que para HPV16 el tiempo es mucho más corto que para HPVno16no18. HPV18 estaría entre los dos, pero debido al bajo número de eventos CIN2+ no podemos obtener conclusiones definitivas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Schlecht (62) en 2003, aunque en su estudio no genotipó las infecciones. En dicho trabajo concluyó que la velocidad de progresión era superior en las lesiones producidas por virus de alto riesgo respecto a los de bajo riesgo, y estos a su vez mayores que en los casos en los que no se había detectado ningún HPV.

Este resultado nos permitiría postular que el tiempo entre los diferentes controles en las pacientes con LSIL podría ser superior en aquellas con HPVno16no18, en contraposición a un control más estricto para las pacientes HPV16 y HPV18.

La velocidad de aparición de estas lesiones es distinta según el resultado de la técnica Cobas. Así vemos que para HPV16 al año de seguimiento ya habían progresado la mayor parte de las lesiones que evolucionaron a CIN2+, mientras que para HPVno16no18 sólo el 50% ocurrió este primer año. A partir de estos resultados podemos recomendar que el control de las LSIL producidas por HPV16 sea muy estricto el primer año, ya que la mayor parte de progresiones serán observadas en ese periodo de tiempo.

Para la velocidad de curación observamos como era de esperar unos resultados inversos. Para HPVno16no18 y HPVneg la velocidad de curación es muy rápida, mientras que es mucho más lenta en los otros casos. Datos similares encontró Muñoz *et al.* (70) en 2004 cuando calculó que las infecciones por virus de alto riesgo tardaban más en curarse que las de bajo riesgo (14.8 vs. 11.1 meses). Así, mientras que sólo un tercio de las lesiones LSIL producidas por HPV16 regresaron durante el primer año, para HPVno16no18 y HPVneg más del 50% regresaron.

Vemos por lo tanto que la infección por HPV16 en las LSIL no solo conlleva un mayor riesgo de progresión a CIN2+, sino que la velocidad de evolución es mucho más rápida que en los otros casos. Un resultado HPV16 positivo para una lesión de bajo grado tendría que ser visto como una alarma, y la paciente en cuestión ser controlada con especial dedicación y asegurarse que no abandona los controles pautados.

## **6.8. Limitaciones del estudio**

Nuestro trabajo presenta una serie de limitaciones por lo que necesitamos más datos antes de adoptar esta estrategia. Nuestra muestra, pese a no ser pequeña, en algunos análisis se mostró insuficiente para alcanzar la significancia estadística dada la baja prevalencia de CIN2+. La mayor parte de los trabajos que han tenido repercusión en las políticas de cribado son poblacionales, estudios en los que la potencia estadística permite obtener resultados con gran evidencia. Una muestra de este tipo sobre el genotipado con LSIL sería de gran interés y muy clarificadora. Estos estudios a nivel poblacional nos aportarían datos mucho más significativos, y nos permitirían calcular los riesgos para CIN3+, que es realmente el objetivo del cribado y del control de la LSIL.

Además se trata de una serie retrospectiva con todos los problemas que conlleva, y con un seguimiento limitado por lo que las posibles progresiones o curaciones a largo plazo no las hemos podido observar. El protocolo actual en el que se propone el tratamiento para las LSIL de 2 años de evolución hace imposible una valoración a largo plazo.

## **6.9. Líneas de futuro**

Este trabajo de investigación presenta varios resultados que anticipan un futuro prometedor para el genotipado del virus del papiloma humano.

La importancia tanto en el riesgo de progresión a CIN2+ como en la rapidez en que se produce para el HPV16 nos dibuja un subgrupo de pacientes de alto riesgo. La incorporación de esta técnica al control de las LSIL permitiría un triage mejor de las pacientes, y adecuar la actitud al riesgo individual.



Otros datos aportados nos hacen sospechar de otras aplicaciones del genotipado muy interesantes. Parece que el genotipo tendría relación con el resultado anatómico-patológico de la conización en aquellas pacientes con progresión, por lo que el genotipo involucrado podría ser un aspecto a tener en cuenta a la hora de proponer el tratamiento quirúrgico a las pacientes.

Los protocolos existentes podrían sufrir modificaciones en el futuro al incorporar el genotipado en su toma de decisiones. Actualmente las guías clínicas americanas (37) ya han incorporado el genotipado con HPV como una opción de manejo en aquellas pacientes con un resultado citológico normal y una determinación de HPV de alto riesgo positiva. En estos casos la presencia de HPV16 o HPV18 obligarían a la realización de una colposcopia, mientras que su ausencia permitiría realizar un control al año sin colposcopia inmediata.

A la luz de nuestros resultados, creemos que esta estrategia podría extenderse a las lesiones LSIL. Hemos visto en nuestro estudio que el riesgo de CIN2+ para las pacientes HPVno16no18 es inferior a 10, y el riesgo de CIN3+ sería incluso menor. Dicho valor es el límite a partir del cual Castle *et al.* (46) recomienda la realización de una colposcopia inmediata. Si bien es cierto que el límite superior del intervalo de confianza en nuestra serie es ligeramente superior a 10, Castle *et al.* propone ese punto de corte para el riesgo de CIN3+. Remarcamos de nuevo que nuestro valor es para CIN2+, y sería menor para CIN3+ si lo hubiésemos podido calcular.

Este factor es sobretodo muy importante en el sistema sanitario americano en donde la colposcopia es considerada una prueba complementaria que conlleva una visita adicional por un subespecialista. Hay que tener en cuenta que en nuestro medio, en donde el ginecólogo general está capacitado para realizar una colposcopia, y muchos consultorios disponen de el utillaje necesario, quizás son más importantes los efectos psicológicos de la colposcopia sobre la paciente (ansiedad, estigmatización de la misma) que podríamos evitar.

Además, hemos encontrado que en ningún caso de LSIL con HPVneg apareció un CIN2+. La literatura apoya este dato, asumiendo los casos que evolucionan como falsos negativos

de la técnica. Entonces, por qué someter a tratamiento a estas pacientes a los dos años de seguimiento? Hoy en día, con lo que datos publicados, parece más una estrategia dirigida a poder finalizar los controles semestrales y a tranquilizar a la paciente que no una necesidad para evitar una progresión a CIN2+. ¿Tendríamos que asumir quizás que podría tratarse de una infección crónica, leve, sin riesgo de progresión y por lo tanto sin necesidad de control? Esta actitud quizá es demasiado transgresora, y hoy en día quizá no aplicable, sobretodo sabiendo la existencia de falsos negativos para HPV. Pero, ¿y si planteásemos citologías anuales? O quizá co-tests (citología y HPV) durante 2 o 3 años, para eliminar la posibilidad de falsos negativos, y después controles más espaciados. Tenemos poca información para saber qué estrategia podría ser la más correcta hoy en día. Además, ¿estaría nuestra población preparada psicológicamente para asumir una infección crónica por HPV (de bajo riesgo)? La gran información aportada al gran público estos años sobre el HPV y sus riesgos ha hecho que las lesiones leves se hayan magnificado para estas pacientes, y su preocupación de si mañana tendrán cáncer o su capacidad infecciosa con sus parejas se haya convertido en un problema social y sanitario importante.

Creemos que el tipado de HPV en las LSIL puede ser una buena herramienta de triaje, diferenciándonos aquellas lesiones que podría requerir de colposcopia inmediata y controles semestrales (HPV16 y HPV18), de las que podríamos diferir la colposcopia (HPVno16no18) y de aquellas que podríamos asumir como crónicas o más bien no susceptibles de tratamiento (HPVneg).

## 7. Conclusiones

1. Las pacientes de nuestra área de influencia con presencia de una LSIL diagnosticada *de novo* presentaban una edad media de  $33.8 \pm 11.1$  años, un 89.1% eran premenopáusicas, un 57.4% no fumadoras, un 36.4% usaban preservativo, un 26.5% tomaban anovulatorios orales y un 16.8% no presentaban un control citológico previo en los anteriores 3 años.
2. Del total de lesiones, 19.6% eran positivas para HPV16, 4.9% para HPV18 y 63.6% para HPVno16no18. 48.3% de las pacientes eran positivas para hrHPV diferentes al HPV16 o al HPV18. Un 15.6% del total además de presentar un resultado positivo para HPVno16no18 también eran positivos bien para HPV16 o bien para HPV18. La diferente distribución según la edad sólo fue significativa para HPV18, siendo más frecuente en las pacientes de más de 39 años.
3. El método Cobas fue más sensible y con un valor predictivo negativo superior al del HC2. Para el método Cobas, la sensibilidad para detectar CIN2+ fue del 100%, la especificidad de 27.4%, el valor predictivo positivo de 16.7% y el negativo de 100%. Para el método HC2 los resultados fueron similares, sensibilidad de 88.9%, especificidad de 29.5%, valor predictivo positivo 15.7% y negativo 94.7%.
4. A los dos años, la tasa de curación de las LSIL fue de 74.1%, de persistencia de 16.3%, de progresión a CIN2+ de 9.8% y a CIN3+ 2.1%.
5. La edad, el uso del preservativo o el tabaco no se demostraron como factores de riesgo independientes para la evolución de las lesiones, pero sí la toma de anovulatorios orales.
6. La positividad para HPV16 fue más frecuente en las lesiones que progresaron a CIN2+, mientras que la no detección de hrHPV lo fue para las lesiones que regresaron.
7. El riesgo absoluto de HPV16 para progresión a CIN2+ fue de 32.1%, para HPV18 de 14.3%, para HPVno16no18 de 5.8%. Ningún caso HPVneg evolucionó a CIN2+. Ninguna paciente con LSIL producida por HPV16 de más de 39 años progresó a CIN2+.

8. La presencia de HPV16 en las lesiones confería un riesgo de 7.4 veces mayor para desarrollar CIN2+ que la ausencia del mismo. Dicho riesgo relativo fue el único estadísticamente significativo. En las pacientes mayores (ya sea más de 29 o 39 años) el riesgo relativo fue menor que para las jóvenes.
8. Los riesgos absolutos para curación fueron para HPV16 de 53.6%, para HPV18 de 57.1%, para HPVno16no18 de 75.4% y para HPVneg de 87.5%. En las pacientes mayores (ya sea más de 29 o 39 años) el riesgo absoluto de curación fue mayor que para las jóvenes. Los riesgos relativos para HPV16 de 0.7 y de HPVneg de 1.3 fueron los únicos estadísticamente significativos, los cuales fueron mayores para las pacientes de más de 39 años.
9. De las 8 pacientes que fueron tratadas mediante conización tras el diagnóstico previo de CIN2+, ninguna de las infectadas exclusivamente por HPVno16no18 presentó CIN2+ en la pieza de conización, en contraposición con el 100% de la infectadas por HPV16.
10. El tiempo medio de progresión a CIN2+ fue de  $16.2 \pm 15.8$  meses desde el diagnóstico. El tiempo medio de regresión fue de  $13.5 \pm 9.2$  meses.
11. La edad no influyó en el tiempo medio de progresión a CIN2+.
12. La edad no influyó en el tiempo medio de curación de la LSIL.
13. Las lesiones LSIL producidas por HPV16 progresan de forma más rápida a CIN2+ que las producidas por HPV18, y estas que las producidas por HPVno16no18. Dicha diferencia es estadísticamente significativa.
14. Las lesiones LSIL producidas por HPV16 evolucionan a su curación de forma más lenta que las producidas por otros genotipos virales. Las producidas por HPVno16no18 y HPVneg evolucionan a su curación de forma similar, a una mayor velocidad que el resto.

15. Las lesiones LSIL producidas por HPV16 tienen más riesgo de progresar a CIN2+ y de forma más rápida, por lo que su control estricto y la realización de una colposcopia inmediata son de vital importancia.

16. Las lesiones LSIL en las que no se detecta un virus de alto riesgo no progresan a CIN2+, por lo que su control debería ser diferente al resto de LSIL, siendo una conducta conservadora *sinedie* asumible desde el punto de vista clínico según nuestros datos.

## 8. Bibliografía

1. Gurumurthy M, Peevor R, Fiander A. Human papillomavirus update (including vaccination). *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. Elsevier Ltd; 2013 Aug 1;23(8):231–7.
2. Vilos GA. The history of the Papanicolaou smear and the odyssey of George and Andromache Papanicolaou. *Obstet Gynecol*. 1998. pp. 479–83.
3. Ault KA. Cervical Cancer Prevention: Better Tests, Better Tools, and More Equitable Outcomes. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2011 Sep 20;103(18):1352–3.
4. Chhieng D, Hui P. *Squamous Lesions of the Cervix*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. pp. 35–58.
5. Selvaggi SM. Clinical significance of atypical squamous cells cannot exclude high grade squamous intraepithelial lesion with histologic correlation-: A 9-Year experience. *Diagn. Cytopathol*. 2013 Nov;41(11):943–6.
6. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol*. 1993 Apr;12(2):186–92.
7. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998 Oct;92(4 Pt 2):727–35.
8. Hausen zur H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Research*. 1976 Feb;36(2 pt 2):794.
9. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Hausen zur H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983 Jun;80(12):3812–5.
10. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013 Sep 7;382(9895):889–99.
11. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003 Feb 6;348(6):518–27.
12. Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK. Human papillomavirus: what every provider should know. *YMOB*. Elsevier Inc; 2013 Mar 1;208(3):169–75.
13. Maucort-Boulch D, Plummer M, Castle PE, Demuth F, Safaeian M, Wheeler CM, et al. Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int. J. Cancer*. 2010 Feb 1;126(3):684–91.
14. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *JNCI*



- Journal of the National Cancer Institute. 2010 Mar 3;102(5):315–24.
15. Clifford GM, SMITH JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jul 7;89(1):101–5.
  16. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod. Pathol*. 2004 Jul 16;17(11):1314–22.
  17. Clifford GM. Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2005 May 1;14(5):1157–64.
  18. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Mod. Pathol*. 2006 Dec 22;20(2):167–74.
  19. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjosé S, Bruni L, et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine*. 2008 Aug;26:K1–K16.
  20. Delgado D, Marín JM, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios JL, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012 May;30(5):230–5.
  21. Alemany L, Pérez C, Tous S, Llobart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol*. 2012 Mar;124(3):512–7.
  22. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2005 Jul 19;97(14):1072–9.
  23. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM, for the ALTS Group. Human Papillomavirus Type 16 Infections and 2-Year Absolute Risk of Cervical Precancer in Women With Equivocal or Mild Cytologic Abnormalities. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2005 Jul 19;97(14):1066–71.
  24. Berkhof J. Human Papillomavirus Type-Specific 18-Month Risk of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with a Normal or Borderline/Mildly Dyskaryotic Smear. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006 Jul 1;15(7):1268–73.
  25. Bulk S, Bulkman NWJ, Berkhof J, Rozendaal L, P Boeke AJ, Verheijen RHM, et al. Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months. *Int. J. Cancer*. 2007;121(2):361–7.

26. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003 Aug;127(8):940–5.
27. Arney A, Bennett KM. Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. *Laboratory Medicine.* 2010 Aug 19;41(9):523–30.
28. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol. J.* 2012;9:262.
29. Hologic. *Cervista® HPV: The Next Generation in HPV Testing* [Internet]. [www.thinprep.com](http://www.thinprep.com). [cited 2013 Oct 13]. Available from: [http://www.thinprep.com/hcp/cervista\\_hpv.html](http://www.thinprep.com/hcp/cervista_hpv.html)
30. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs.* 2003;(31):80–8.
31. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *YMOB.* Elsevier Inc; 2012 Jan 1;206(1):46.e1–46.e11.
32. Lloveras B, Gomez S, Alameda F, Bellosillo B, Mojal S, Muset M, et al. HPV testing by cobas HPV test in a population from Catalonia. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e58153.
33. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, Cuzick J, Szarewski A, Ratnam S, et al. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *Int. J. Cancer.* 2013 Jan 1;132(1):101–8.
34. Alaghebandan R, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Lear A, et al. Performance of proex c and prepect hpv-proofer e6/e7 mrna tests in comparison with the hybrid capture 2 hpv dna test for triaging ascus and lsil cytology. *Diagn. Cytopathol.* 2013 Sep;41(9):767–75.
35. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer.* 2013 Mar 5;108(4):908–13.
36. Algoritmos de Prevención del Cáncer de Cuello de Utero. *Progresos de Obstetricia y Ginecología.* 2006 Sep 17;49(Supl. 2):5–62.
37. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2013. pp. S1–S27.
38. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *YMOB.* 2003 Jun;188(6):1393–400.
39. Cortes J, Martín-Torres F, Ramón y Cajal JM, Gil Á, Velasco J, Abizanda M, et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva:

- recomendaciones para la práctica clínica. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2010 Jun 1;53(Supl 1):1–19.
40. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003 Aug;127(8):946–9.
  41. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012. pp. 516–42.
  42. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Oct;197(4):346–55.
  43. Arbyn M, Roelens J, Simoons C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PPL, et al. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;3:CD008054.
  44. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, et al. Five-year risks of CIN 2+ and CIN 3+ among women with HPV-positive and HPV-negative LSIL Pap results. *J Low Genit Tract Dis.* 2013 Apr;17(5 Suppl 1):S43–9.
  45. Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL, et al. High-Risk Human Papillomavirus Testing in Women With ASC-US Cytology: Results From the ATHENA HPV Study. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011 Feb 24;135(3):468–75.
  46. Castle PE, Sideri M, Jeronimo J, Solomon D, Schiffman M. Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Oct;197(4):356.e1–356.e6.
  47. Gage JC, Sadorra M, Lamere BJ, Kail R, Aldrich C, Kinney W, et al. Comparison of the cobas Human Papillomavirus (HPV) test with the hybrid capture 2 and linear array HPV DNA tests. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012 Jan;50(1):61–5.
  48. Tropé A, Sjøborg KD, Nygård M, Røysland K, Campbell S, Alfsen GC, et al. Cytology and human papillomavirus testing 6 to 12 months after ASCUS or LSIL cytology in organized screening to predict high-grade cervical neoplasia between screening rounds. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012 Jun;50(6):1927–35.
  49. Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, Gudlaugsson E, Munk AC, Malpica A, et al. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN2–3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN2–3. *Gynecol Oncol.* Elsevier Inc; 2011 Nov 1;123(2):278–83.
  50. Tsoumpou I, Valasoulis G, Founta C, Kyrgiou M, Nasioutziki M, Daponte A, et al. High-risk human papillomavirus DNA test and p16(INK4a) in the triage of LSIL: a prospective diagnostic study. *Gynecol Oncol.* 2011 Apr;121(1):49–53.

51. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, European CINtec Cytology Study Group. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.* 2011 Jun 25;119(3):158–66.
52. Saranath D, Khan Z, Tandle AT, Dedhia P, Sharma B, Contractor R, et al. HPV16/18 Prevalence in Cervical Lesions/Cancers and p53 Genotypes in Cervical Cancer Patients from India. *Gynecol Oncol.* 2002 Aug;86(2):157–62.
53. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: A prospective cohort study. *Int. J. Cancer.* 2010 Oct 13;128(12):2898–910.
54. Quint KD, de Koning MNC, van Doorn L-J, Quint WGV, Pirog EC. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* Elsevier Inc; 2010 May 1;117(2):297–301.
55. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet.* 2003 Apr 5;361(9364):1159–67.
56. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet.* 2007 Nov 10;370(9599):1609–21.
57. Guarisi R, Sarian LO, Hammes LS, Longatto-Filho A, Derchain SFM, Roteli-Martins C, et al. Smoking worsens the prognosis of mild abnormalities in cervical cytology. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(5):514–20.
58. Rodríguez-Salés V, Roura E, Ibáñez R, Peris M, Bosch FX, E EC, et al. Cobertura del cribado de cáncer de cuello uterino en Cataluña (2008-2011). *Gaceta Sanitaria. SESPAS;* 2013 Aug 3;:1–7.
59. Wright TC, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, et al. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011 Oct;136(4):578–86.
60. Gage JC, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Castle PE, et al. Risk of precancer determined by HPV genotype combinations in women with minor cytologic abnormalities. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013 Jun;22(6):1095–101.
61. de Sanjosé S, Wheeler CM, Quint W, Hunt WC, Joste NE, Alemany L, et al. Age-specific occurrence of HPV16- and HPV18-related cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013 Apr 30.
62. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JCM, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical

- intraepithelial neoplasia. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2003 Sep 3;95(17):1336–43.
63. Giskes K. Trends in smoking behaviour between 1985 and 2000 in nine European countries by education. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 2005 May 1;59(5):395–401.
  64. 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 Feb 2;84(3):360–6.
  65. Quint KD, de Koning MNC, Quint WGV, Pirog EC. Progression of cervical low grade squamous intraepithelial lesions: in search of prognostic biomarkers. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Ireland Ltd; 2013 Aug 8;:1–6.
  66. Discacciati MG, de Souza CAS, d’Otaviano MG, Ângelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH, et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Apr 1;155(2):204–8.
  67. Einstein MH, Garcia FAR, Mitchell AL, Day SP. Age-stratified performance of the Cervista HPV 16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2011 Jun;20(6):1185–9.
  68. Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Zhang G, Apple R, Wright TL, et al. The interplay of age stratification and HPV testing on the predictive value of ASC-US cytology. Results from the ATHENA HPV study. *Am. J. Clin. Pathol*. 2012 Feb;137(2):295–303.
  69. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, et al. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ*. 2009;339:b2569.
  70. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJC, 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 Dec 15;190(12):2077–87.

## 9. Anexos

## 9.1. Índice de Tablas

Tabla 1: Evolución de las displasias cervicales según Ostor <i>et al.</i> .....	13
Tabla 2: Evolución de las displasias cervicales según Melnikow <i>et al.</i> .....	13
Tabla 3: Clasificación de los genotipos de HPV según la ARC .....	15
Tabla 4: Distribución en % de los genotipos de HPV en HSIL y SCC según Clifford <i>et al.</i> .....	17
Tabla 5: Distribución en % del HPV16 y otros hrHPV en distintas lesiones de alto grado según Zuna <i>et al.</i> .....	17
Tabla 6: Distribución de los genotipos de HPV en LSIL y SCC según Clifford <i>et al.</i> ....	18
Tabla 7: Distribución de los genotipos en % en distintas lesiones cervicales según Zuna <i>et al.</i> .....	19
Tabla 8: Distribución de los genotipos HPV (%) en el SCC y el Adenocarcinoma, según Bosch <i>et al.</i> .....	20
Tabla 9: Distribución genotipos HPV en el País Vasco según Delgado <i>et al.</i> .....	21
Tabla 10: Distribución de genotipos de HPV en el cáncer de cérvix invasor según el tipo histológico, según Alemany <i>et al.</i> .....	22
Tabla 11: Riesgo de SCC según el genotipo de HPV, a partir de Muñoz <i>et al.</i> .....	23
Tabla 12: Tasa de incidencia acumulada (en %) de CIN3+ a los 10 años, según el genotipo de HPV y el resultado de la citología al inicio del reclutamiento, en las pacientes de 30 años o más, según Khan <i>et al.</i> .....	24
Tabla 13: Odds ratio para CIN3+ según distintos parámetros, según Castle <i>et al.</i> .....	25
Tabla 14: Riesgo acumulado a los 18 meses para CIN2+ y CIN3+ según el genotipo de HPV y el resultado de la citología inicial, según Berkhof <i>et al.</i> .....	26
Tabla 15: Riesgo para CIN2+ y CIN3+ según resultado citológico y para determinación de HPV basal y a los 6 meses, según Bulk <i>et al.</i> .....	27
Tabla 16: Resumen de los tests aprobados por la FDA para detección de HPV .....	34
Tabla 17: Número de colposcopias realizadas y CIN3+ detectados en cada rama del estudio ALTS.....	38
Tabla 18: Riesgos para CIN3 según citología y HPV, clasificados según el nivel de riesgo utilizado en las guías clínicas para determinar la actitud ante el resultado del cribado, según Katki <i>et al.</i> .....	40
Tabla 19: Riesgo absoluto para CIN2+ y CIN3+ en citologías ASCUS en pacientes de más de 20 años, según el estudio ATHENA .....	41

Tabla 20: Parámetros de las diferentes pruebas para detección de CIN2+, según Tsoumpou <i>et al</i> .....	44
Tabla 21: Población a estudio .....	58
Tabla 22: Patología cervical previa.....	60
Tabla 23: Resumen del episodio inicial .....	62
Tabla 24: Genotipos de HPV en las LSIL .....	63
Tabla 25: Distribución de los genotipos según la edad.....	65
Tabla 26: Distribución de genotipos HPV entre pacientes menores de 30 años y de 30 años o más .....	66
Tabla 27: Distribución de genotipos HPV entre pacientes menores de 40 años y de 40 años o más .....	67
Tabla 29: Sensibilidad y Especificidad para HC2 y Cobas .....	68
Tabla 30: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad .....	70
Tabla 31: Resultado del seguimiento de las LSIL según la edad, con el punto de corte en los 30 años.....	70
Tabla 32: Resultado del seguimiento de las LSIL según la edad, con el punto de corte en los 40 años.....	70
Tabla 33: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por curación vs no curación.....	71
Tabla 34: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por curación vs no curación, con el punto de corte en los 30 años .....	71
Tabla 35: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por curación vs no curación, con el punto de corte en los 40 años .....	72
Tabla 36: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión.....	72
Tabla 37: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión, con el punto de corte en los 30 años .....	73
Tabla 38: Resultado del seguimiento de la LSIL según la edad, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión, con el punto de corte en los 40 años .....	73
Tabla 39: Resultado de la LSIL en relación al uso del preservativo .....	74
Tabla 40: Resultado de la LSIL en relación al uso de anovulatorios orales .....	74
Tabla 41: Resultado de la LSIL según el hábito tabáquico .....	74



Tabla 42: Resultado de la LSIL según el uso de preservativo, agrupando por curación vs no curación.....	75
Tabla 43: Resultado de la LSIL según el uso de anovulatorios orales, agrupando por curación vs no curación .....	75
Tabla 44: Resultado de la LSIL según el hábito tabáquico, agrupando por curación vs no curación.....	76
Tabla 45: Resultado de la LSIL según el uso del preservativo, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión.....	76
Tabla 46: Resultado de la LSIL según el uso de anovulatorios, agrupando según progresión a CIN2+ vs no progresión .....	77
Tabla 47: Resultado de la LSIL según el hábito tabáquico, agrupando por progresión a CIN2+ vs no progresión.....	77
Tabla 48: Distribución de los resultados Cobas según el resultado de la LSIL.....	78
Tabla 49: Riesgos absolutos para CIN2+.....	80
Tabla 50: Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo HPV en pacientes menores de 30 años.....	81
Tabla 51: Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes de 30 años o más .....	81
Tabla 52: Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años.....	82
Tabla 53: Riesgo absoluto de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más .....	82
Tabla 54: Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV .....	84
Tabla 55: Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años.....	85
Tabla 56: Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años o más .....	86
Tabla 57: Riesgo relativo de progresión a CIN2 según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años.....	86
Tabla 58: Riesgo relativo de progresión a CIN2+ según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más .....	87
Tabla 59: Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV .....	88

Tabla 60: Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años .....	89
Tabla 61: Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 30 años o más .....	89
Tabla 62: Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años .....	90
Tabla 63: Riesgo absoluto de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más .....	90
Tabla 64: Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV .....	91
Tabla 65: Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 30 años .....	91
Tabla 66: Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 30 años o más .....	92
Tabla 67: Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes menores de 40 años .....	92
Tabla 68: Riesgo relativo de curación según el genotipo de HPV en pacientes de 40 años o más .....	93
Tabla 69: Relación entre la AP de la conización y el genotipo viral entre las pacientes diagnosticadas de CIN2+ mediante biopsia dirigida por colposcopia .....	94
Tabla 70: Riesgos absolutos para CIN2+ de los distintos genotipos en la literatura ....	111
Tabla 71: Riesgos absolutos para CIN2+ y CIN3+ en la literatura para HPVno16no18113	

## 9.2 Índice de Gráficos

Gráfico I: Riesgo acumulado para CIN2+ y CIN3+ entre mujeres de 30 a 64 años, según la citología y resultado HPV basales, según Katki <i>et al.</i> ....	39
Gráfico II: Distribución de edades .....	59
Gráfico III: Edades entre las pacientes sin citología previa.....	61
Gráfico IV: Distribución de genotipos.....	64
Gráfico V: Distribución de genotipos según la edad .....	66
Gráfico VI: Evolución de las LSIL .....	69

Gráfico VII: Distribución de los genotipos de HPV según el resultado de la evolución de la LSIL .....	78
Gráfico VIII: Riesgos absolutos para CIN2+ debido a HPV16, con los intervalos de confianza, según el corte del grupo de edad .....	83
Gráfico IX: Riesgos relativos para CIN2+ debido a HPV16, con los intervalos de confianza, según el corte de edad .....	87
Gráfico X: Riesgos relativos para curación según el resultado HPVneg, con los intervalos de confianza, según el corte de edad.....	93
Gráfico XI: Curvas Kaplan-Meier para la aparición de CIN2+ según el resultado Cobas	96
Gráfico XII: Curvas Kaplan-Meier para la aparición de CIN2+ según el grupo de edad de menos de 30 años, o de 30 años o más .....	97
Gráfico XIII: Curvas Kaplan-Meier para la aparición de CIN2+ según el grupo de edad de menos de 40 años, o de 40 años o más .....	98
Gráfico XIV: Curvas Kaplan-Meier para la curación según el resultado Cobas .....	99
Gráfico XV: Curvas Kaplan-Meier para la curación según los grupos de edad de 30 años .....	100
Gráfico XVI: Curvas Kaplan-Meier para la curación según los grupos de edad de 40 años .....	101

### 9.3. Índice de Ilustraciones

Ilustración 1: Representación gráfica de HC2, extraído de ArneyGráfico extraído de Arney .....	29
Ilustración 2: Esquema de la Reacción en cadena de la Polimerasa .....	31
Ilustración 3: Varios de los <i>primers</i> usados para la detección de HPV por PCR .....	31