



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, i Medicina Preventiva

VALOR PREDICTIU DE LES CÈL·LULES NK EN L'EVOLUCIÓ DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL GRAU 2

Tesis doctoral presentada per la Llicenciada

ESTER MIRALPEIX ROVIRA

per optar al grau de Doctora en Medicina

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Escola de Doctorat

VALOR PREDICTIU DE LES CÈL·LULES NK EN L'EVOLUCIÓ DE LA NEOPLÀSIA INTRAEPITELIAL CERVICAL GRAU 2

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, i Medicina Preventiva

Directors : Ramon Carreras Collado
Gemma Mancebo Moreno
Francesc Alameda Quitllet

Autora: Ester Miralpeix Rovira

Barcelona, 2016

*We shall not cease from exploration
and the end of all our exploring
will be to arrive where we started
and know the place for the first time.
Through the unknown, remembered gate
when the last of earth left to discover
is that which was the beginning;
At the source of the longest river
the voice of the hidden waterfall
and the children in the apple-tree
not known, because not looked for
but heard, half heard, in the stillness
between the two waves of the sea.
Quick now, here, now, always
a condition of complete simplicity
(Costing not less than everything)
and all shall be well and
all manner of things shall be well
when the tongues of flame are in-folded
into the crowned knot of fire
and the fire and the rose are one.*

*Little Gidding,
T.S. Eliot (1943)*

AGRAÏMENTS

Al Professor Ramon Carreras Collado, Cap del Servei d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital del Mar, per la seva confiança dipositada en mi, per la seva incansable energia i per posar-me totes les facilitats existents per la realització d'aquest treball i seguir millorant personal i professionalment.

Al Professor Francesc Alameda Quitllet, Cap del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar, pel seu suport i inestimable ajuda projectes d'investigació i especialment en la direcció d'aquesta tesis.

A la Dra. Gemma Mancebo, responsable de la Unitat de Tumors Ginecològica a l'Hospital del Mar, per ser una excepcional mentora en la meva formació personal i especialment com a ginecòloga oncòloga, pel seu suport diari, per confiar en mi, pels seus ànims i per idear aquest treball de tesis doctoral.

Al Dr. Josep M Solé-Sedeño per ajudar-me en els meus primers passos en el món de la patologia cervical, la seva constant paciència, disponibilitat i valuosos consells.

A Silvia Agramunt, companya i metge del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital del Mar, no només per la seva amistat, sinó també pel seu esforç per la realització d'aquesta tesis.

Als meus companys del PASSIR (Programa d'Atenció Sanitària a la Salut Sexual i Reproductiva), pel seu important treball per fer possible aquesta tesis.

A Sergi Mojal, responsable del Departament d'assessorament en investigació biomèdica a IMIM, pel seu imprescindible i immillorable treball en el maneig estadístic d'aquestes dades, per la seva disponibilitat i comprensió.

Als meus companys del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital del Mar, per la seva docència i coneixements transmesos els quatre anys de formació com especialista i per la seva ajuda i comprensió durant la realització d'aquesta tesis. Per fer que anar a treballar cada dia no sigui una obligació.

Al professor Pedro T Ramirez professor del MD Anderson Cancer Center of Texas, pel seu entusiasme transmès en el camp de la ginecologia oncològica durant la meva estada a Houston.

Als companys del Servei d'Immunologia de l'Hospital del Mar i a l'IMIM, especialment a Ramon Gimeno, per ajudar-me al laboratori a realitzar aquests procediments. Aquesta tesis no s'hauria pogut realitzar sense la seva col·laboració.

A totes les pacients que de manera desinteressada han col·laborat en aquest estudi.

Als meus amics, per seguir sent els meus amics després de tants anys. Pels seus consells i vivències entre guàrdies i estudis.

I sobretot, als meus pares, pel seu exemple en el treball i en la vida, pels valors que m'han inculcat i per ajudar-me sempre a fer els meus somnis realitat.

ACRÒNIMS I ABREVIATURES

- ACHO:** Anticonceptius hormonals orals
- ADN:** Àcid desoxiribonucleic
- AGC:** Atípia de cèl·lules glandulars (Atypical Glandular Cells)
- APC:** Aloficocianina.
- ARC:** Agència de Recerca del Càncer (Agency for research of Cancer)
- ASCUS:** Cèl·lules escamoses atípiques de significat indeterminat (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)
- ASC-H:** Cèl·lules escamoses atípiques suggestives de lesió d'alt grau (Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL)
- ASCCP:** Societat Americana de Colposcòpia i Patologia Cervical
- CAP:** Col·legi Americà de Patòlegs
- CEIC-IMAS:** Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Institut Municipal d'Assistència Sanitària de Barcelona
- CHL:** Chlamydia trachomatis
- CIN:** Neoplàsia intraepitelial cervical (cervical intraepithelial neoplasia)
- CIN1:** Neoplàsia intraepitelial cervical grau 1
- CIN2:** Neoplàsia intraepitelial cervical grau 2
- CIN3:** Neoplàsia intraepitelial cervical grau 3
- CIS:** Carcinoma in situ
- CMV:** Citomegalovirus
- CO-TEST:** test combinat de citologia i del VPH
- Curva ROC:** Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating Characteristic)
- CTL:** limfòcits T citotòxics
- DIU:** Dispositiu intrauterí
- E6:** gen d'expressió primerenca número 6 del virus del papil·loma humà
- E7:** gen d'expressió primerenca número 7 del virus del papil·loma humà
- Fc:** fracció constant de la immunoglobulina
- FDA:** agència de drogues i aliments (Food and Drug Administration)
- FICT:** isotiocianat de fluoresceïna
- HbsAg:** Antigen de superfície de l'Hepatitis B
- HC2:** captura d'híbrids de segona generació
- HSIL:** Lesió escamosa intraepitelial d'alt grau (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
- IC:** Interval de confiança
- IFN:** interferó
- Ig:** Immunoglobulina
- IL:** interleucines
- ILT/LIR:** Immunoglobulin-like transcripts o leucocyte immunoglobulin-like receptors

KIR: Killer immunoglobulin-like receptors
L1: gen d'expressió tardana número 1 del virus del papil·loma humà
L2: gen d'expressió tardana número 2 del virus del papil·loma humà
LAST: Lower Anogenital Squamous Terminology
LCR: regió de control de l'expressió dels gens del VPH (long control region)
LT: Limfòcits T
LSIL: Lesió escamosa intraepitelial de baix grau (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
LTh1: limfòcit T cooperador tipus 1
LTh2: limfòcit T cooperador tipus 2
MHC: Complex major d'histocompatibilitat
MTS: Malalties de Transmissió Sexual
NK: Natural Killer
NKR: receptors de les cèl·lules NK
OMS: Organització Mundial de la Salut
OR: raó de possibilitats (odds ratio)
p53: proteïna 53
PBMC: cèl·lules mononucleades de sang perifèrica
PBS: tampó fosfat salí (Phosphate Buffered Saline)
PCR: reacció en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PerRCP: proteïna clorofil peridina
pRb: proteïna del retinoblastoma
RCBPs: Registres de càncer de base poblacional
RLB: model multivariant de regressió logística binària
RNA: àcid ribonucleic
RR: risc relatiu
SEGO: Societat Espanyola de Ginecologia i Obstetrícia
TCR: Receptors de cèl·lules T
TNF: factor de necrosis tumoral
VHS2: virus de l'herpes simple tipus 2
VHC: virus hepatitis C
VIH: virus de la immunodeficiència humana
VLP: partícules similars als virus (Virus like particles)
VPH: Virus del Papil·loma Humà
VPN: valor predictiu negatiu

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ:	17
1.1. EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE CÈRVIX	19
1.2. LESIONS INTRAEPITELIALS CERVICALS	21
1.3. EL VIRUS DEL PAPIL·LOMA HUMÀ	22
1.3.1. GENOTIPS VIRALS	23
1.3.1.1. Mètodes de genotipat del VPH.....	24
1.3.2. HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PEL VPH.....	25
1.4. MANEIG ACTUAL DE LA INFECCIÓ DEL VPH	27
1.4.1. PROGRAMA DE CRIBATGE	27
1.4.2. MANEIG DE LES LESIONS INTRAEPITELIALS CERVICALS.....	30
1.4.2.1. Maneig de la displàsia moderada o CIN2	32
1.5. COFACTORS IMPLICATS EN LA CARCINOGENÈSIS DEL VPH	36
1.5.1. EDAT	36
1.5.2. CONDUCTA SEXUAL.....	40
1.5.3. PARITAT	40
1.5.4. TABAC.....	41
1.5.5. ANTICONCEPCIÓ HORMONAL	41
1.5.6. IMMUNITAT.....	42
1.5.6.1. Vacunes del VPH.....	43
1.6. RESPOSTA IMMUNITÀRIA A LA INFECCIÓ DEL VPH	44
1.6.1. CONCEPTES BÀSICS D'IMMUNOLOGIA.....	44
1.6.2. EL SISTEMA IMMUNITARI I LES INFECCIONS VÍRIQUES	45
1.6.2.1. Les cèl·lules NK.....	46
1.6.3. LA INFECCIÓ DEL CMV I LES CÈL·LULES NK INVOLUCRADES EN LA SEVA IMMUNITAT.....	50
1.6.4. RESPOSTA IMMUNITÀRIA DAVANT LA INFECCIÓ DEL VPH.....	55
1.6.4.1. Acció de les cèl·lules NK contra el VPH.....	57
2. HIPÒTESI	61
3. OBJECTIUS	65
4. MATERIAL I MÈTODES	69
4.1. DISSENY DE L'ESTUDI	71
4.2. RECLUTAMENT I SEGUIMENT DE LES PACIENTS	72
4.3. VARIABLES	74
4.4. DEFINICIONS	75
4.5. ANÀLISIS DE LES MOSTRES BIOLÒGIQUES	76
4.5.1. ANÀLISIS DE LES MOSTRES ANATOMO-PATOLÒGIQUES.....	76
4.5.2. ANÀLISIS DELS RECEPTORS DE LES CÈL·LULES NK.....	77
4.5.2.1. Criopreservació les cèl·lules mononuclears en sang perifèrica	77
4.5.2.2. Citometria de flux.....	78
4.5.2.3. Genotipat del NKG2C	80
4.6. ANÀLISIS ESTADÍSTIC	80
4.7. CRONOGRAMA	81
4.8. IMPLICACIONS ÈTIQUES	82
5. RESULTATS	83
5.1. POBLACIÓ D'ESTUDI	85
5.2. ANÀLISIS DE LES VARIABLES EPIDEMIOLÒGIQUES	88
5.3. ANÀLISIS DELS FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS	90
5.3.1. Citologia prèvia	90

5.3.2. Genotipat del VPH	91
5.4. ANÀLISIS DE L'ESTAT IMMUNOLÒGIC ENVERS LES MTS.....	93
5.5. ANÀLISIS DE LES CÈL·LULES NK.....	94
5.5.1. Població de les cèl·lules NK i la infecció pel CMV	94
5.5.2. Població de les cèl·lules NK segons el genotipat del NKG2C.....	95
5.5.3. Població de les cèl·lules NK i possibles factors de confusió	99
5.5.3.1. Edat	99
5.5.3.2. Tabac	100
5.5.3.3. Paritat.....	101
5.5.3.4. Vacunació del VPH.....	101
5.5.3.5. Virus herpes simple 2.....	102
5.5.3.6. <i>Chlamydia trachomatis</i>	103
5.5.3.7. VPH.....	105
5.6. EVOLUCIÓ DE LES LESIONS DE CIN2	108
5.7. VARIABLES EPIDEMIOLÒGIQUES I EVOLUCIÓ DEL CIN2	110
5.7.1. Edat	110
5.7.2. Ètnia	113
5.7.3. Tabac.....	113
5.7.4. Paritat i Gestació	115
5.7.5. Mètode anticonceptiu	116
5.7.6. Conducta sexual.....	117
5.7.6.1. Activitat sexual.....	118
5.7.6.2. Malalties de transmissió sexual.....	118
5.7.7. Vacunació del VPH i evolució de les lesions de CIN2.....	120
5.8. FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS I EVOLUCIÓ DEL CIN2	120
5.8.1. Citologia prèvia	120
5.8.2. Genotip del VPH a la citologia	124
5.8.3. Anàlisi de l'evolució del CIN2 en funció de la citologia i el genotip del VPH	127
5.9. CÈL·LULES NK I EVOLUCIÓ DEL CIN2	130
5.9.1. Anàlisi de l'evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK.....	130
5.9.2. Anàlisi de l'evolució del CIN2 en funció de la infecció del CMV	132
5.9.3. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i el CMV	134
5.9.4. Evolució del CIN2 en funció de la genètica NKG2C	138
5.9.5. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i el VPH	139
5.9.7. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i la infecció pel VHS2.....	140
5.9.8. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i la infecció per <i>Chlamydia trachomatis</i>	141
5.10. MODEL MULTIVARIANT	142
5.10.1. Model multivariat de regressió logística binària de CIN2+	142
5.10.2. Model multivariat de regressió logística binària a CIN3.....	145
5.11. TEMPS DE PROGRESSIÓ A CIN3	146
6. DISCUSSIÓ	149
6.1. POBLACIÓ D'ESTUDI.....	151
6.2. EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ DEL CIN2	153
6.2.1. FACTORS SOCIO-EPIDEMIOLÒGICS.....	154
6.2.1.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	157
6.2.2. FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS.....	159
6.2.2.1. Citologia prèvia.....	159
6.2.2.2. Genotip del VPH.....	160
6.2.3. FACTORS IMMUNOLÒGICS	164
6.3. LIMITACIONS DE L'ESTUDI.....	168
6.4. LINIES DE FUTUR.....	168
7. CONCLUSIONS	171
8. BIBLIOGRAFIA.....	175
9. ANNEXES.....	189

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: Distribució mundial de la incidència del càncer de cèrvix segons <i>GLOBOCAN</i>	19
Figura 2: Distribució europea de la incidència i mortalitat del càncer de cèrvix el 2012.....	20
Figura 3: Estructura del virus del Papil·loma Humà segons <i>López i col</i>	23
Figura 4: Integració del VPH a les cèl·lules de l'epiteli cervical segons <i>Egawa i col</i>	26
Figura 5: Història natural de la infecció del VPH.....	27
Figura 6: Imatge d'un colposcop (esquerra) i biòpsia colpo-dirigida (dreta)	31
Figura 7: Algoritme del diagnòstic histològic de HSIL/CIN2-3 de la SEGO	35
Figura 8: Història natural de la infecció del VPH i el càncer de cèrvix en relació a l'edat.....	37
Figura 9: Representació del sistema immunitari innat i adquirit.....	44
Figura 10. Regulació del funcionalment de les cèl·lules NK mitjançant receptors activadors i inhibidors de les cèl·lules NK	48
Figura 11: Representació de les possibles respostes entre les cèl·lules NK i la cèl·lula diana segons <i>Lanier</i>	48
Figura 12: Estructura del virió del Citomegalovirus humà.....	51
Figura 13: Representació de la reconfiguració del compartiment de les cèl·lules NK en resposta a la infecció del CMV en funció del fenotip del NKG2C	53
Figura 14: Distribució de les cèl·lules NK en funció del genotip del NKG2C i la infecció pel CMV	54
Figura 15: Resposta immunitària davant la infecció pel VPH segons <i>Rincon i col</i>	56
Figura 16. Separació de PBMCs mitjançant la centrifugació en gradient de densitat utilitzant el Ficoll	78
Figura 17: Estratègia de selecció cel·lular i anàlisi del percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK.....	80

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Classificació dels genotips del VPH segons la Agència de Recerca del Càncer....	24
Taula 2: Evolució de les displàsies cervicals segons <i>Östor</i>	26
Taula 3. Recomanacions d'estratègies de cribratge de la SEGO.....	29
Taula 4. Resum dels estudis que reporten maneig conservador del CIN2.....	33
Taula 5: Relació entre el càncer de cèrvix i el nombre de citologies per grups d'edat segons <i>Bernard i col</i>	38
Taula 6. Risc acumulat en 5 anys de CIN3+ i càncer segons l'edat i la citologia prèvia segons <i>Katki i col</i>	39
Taula 7: Criteris d'inclusió i exclusió del maneig conservador del CIN2.....	71
Taula 8: Definició de l'evolució de les lesions de CIN2 i actitud a seguir a l'estudi	76
Taula 9: Diagnòstic de la conització segons el motiu d'exclusió personal o mèdic	88
Taula 10: Característiques epidemiològiques de la població d'estudi	89
Taula 11: Citologia prèvia al diagnòstic histològic de CIN2 de la població d'estudi.....	90
Taula 12: Genotipat del VPH de la població d'estudi.....	91
Taula 13: Estat immunològic de les serologies de les pacients incloses en l'estudi.....	93
Taula 14: Poblacions de cèl·lules NK segons el CMV	94
Taula 15: Genotipat del NKG2C de les pacients amb CIN2 incloses a l'estudi	95
Taula 16: Poblacions de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C	96
Taula 17: Poblacions de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C en pacients CMV positives	97
Taula 18: Poblacions de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C en pacients CMV negatives	97
Taula 19: Poblacions de cèl·lules NK segons l'hàbit tabàquic.....	100
Taula 20: Poblacions de cèl·lules NK segons la paritat.....	101

Taula 21: Poblacions de cèl·lules NK segons la vacunació del VPH.....	102
Taula 22: Poblacions de cèl·lules NK segons el virus herpes simple 2	103
Taula 23: Poblacions de cèl·lules NK segons la immunitat per <i>Chlamydia trachomatis</i> (IgG) 104	
Taula 24: Poblacions de cèl·lules NK segons la immunitat per <i>Chlamydia trachomatis</i> (IgA) 104	
Taula 25: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH d'alt risc	105
Taula 26: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH d'alt risc en pacients CMV positives	106
Taula 27: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH16	107
Taula 28: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH16 en pacients CMV positives 107	
Taula 29: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH18	108
Taula 30: Anàlisis dels casos de CIN3 ocults	110
Taula 31: Resultat del seguiment del CIN2 segons l'edat	111
Taula 32: Resultat del seguiment del CIN2 segons l'edat, amb punt de tall els 25, 30 i 40 anys 112	
Taula 33: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons l'edat amb punt de tall als 25, 30 i 40 anys	112
Taula 34: Comparació regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons l'edat amb punt de tall als 25, 30 i 40 anys.....	112
Taula 35: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons l'edat amb punt de tall als 25, 30 i 40 anys	113
Taula 36: Resultats de l'evolució del CIN2 segons l'ètnia	113
Taula 37: Resultats del seguiment del CIN2 segons l'hàbit tabàquic	114
Taula 38: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons l'hàbit tabàquic	114
Taula 39: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons l'hàbit tabàquic 114	
Taula 40: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons l'hàbit tabàquic	114
Taula 41: Resultat del seguiment del CIN2 segons la paritat	115
Taula 42: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la paritat.....	115
Taula 43: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la paritat .	116
Taula 44: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la paritat	116
Taula 45: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el mètode anticonceptiu.....	117
Taula 46: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons l'ús del preservatiu	117
Taula 47: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons l'ús de preservatiu.....	117
Taula 48: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons l'ús de preservatiu 117	
Taula 49: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el nombre de parelles sexuals totals	118
Taula 50: Resultats de l'evolució del CIN2 segons l'edat a d'inici de les relacions sexuals .	118
Taula 51: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la <i>Clamydía trachomatis</i>	119
Taula 52: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la <i>Clamydía trachomatis</i>	119
Taula 53: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la <i>Clamydía trachomatis</i>	119
Taula 54: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la <i>Clamydía trachomatis</i>	120
Taula 55: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la vacunació al VPH.....	120
Taula 56: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la citologia prèvia	121
Taula 57: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la citologia prèvia.....	122

Taula 58: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la citologia prèvia.....	122
Taula 59: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la citologia prèvia	122
Taula 60: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la citologia prèvia agrupada en HSIL o noHSIL	123
Taula 61: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la citologia prèvia HSIL o no HSIL	123
Taula 62: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la citologia prèvia HSIL o no HSIL.....	123
Taula 63: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la citologia prèvia HSIL o no HSIL	123
Taula 64: Distribució de l'evolució del CIN2 segons els genotip del VPH	124
Taula 65: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons el VPH	125
Taula 66: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons el VPH....	126
Taula 67: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons el VPH.....	126
Taula 68: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia ASC-US.....	127
Taula 69: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia LSIL	128
Taula 70: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia ASC-H	129
Taula 71: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia HSIL	130
Taula 72: Poblacions de cèl·lules NK segons l'evolució de les lesions de CIN2	131
Taula 73: Poblacions de cèl·lules NK segons curació vs no curació del CIN2	131
Taula 74: Poblacions de cèl·lules NK segons regressió vs persistència/progressió del CIN2	131
Taula 75: Poblacions de cèl·lules NK segons progressió vs no progressió del CIN2.....	131
Taula 76: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la infecció del CMV	133
Taula 77: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la infecció del CMV.....	133
Taula 78: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la infecció del CMV	133
Taula 79: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la infecció del CMV	133
Taula 80: Poblacions de cèl·lules NK segons l'evolució del CIN2 i la infecció pel CMV	134
Taula 81: Poblacions de cèl·lules NK comparant curació vs no curació de les lesions de CIN2 en funció de la infecció pel CMV	136
Taula 82: Poblacions de cèl·lules NK comparant regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la infecció pel CMV	137
Taula 83: Poblacions de cèl·lules NK comparant progressió vs no progressió del CIN2 segons la infecció pel CMV.....	137
Taula 84: Relació de l'evolució del CIN2 segons el genotip del NKG2C	138
Taula 85: Relació de l'evolució del CIN2 segons el genotip del NKG2C en pacients CMV negatives	138
Taula 86: Relació de l'evolució del CIN2 segons el genotip del NKG2C en pacients CMV positives	138
Taula 87: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció del VPH	139
Taula 88: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció del VPH16	140
Taula 90: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció pel virus herpes simple 2	141

Taula 91: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció per <i>Chlamydia Trachomatis</i>	142
Taula 92: Model multivariant de regressió logística binària de CIN2+	143
Taula 93: Taula mostrant del model multivariant en les pacients incloses a l'estudi	144
Taula 94: Model multivariant de regressió logística binària de CIN3	145

ÍNDEX DE GRÀFICS

Gràfic 1: Motiu d'exclusió de les pacients amb diagnòstic de CIN2.....	87
Gràfic 2: Diagnòstic de la conització segons el motiu d'exclusió	87
Gràfic 3: Distribució per edat de les pacients incloses.....	90
Gràfic 4: Distribució dels genotips del VPH segons la citologia	92
Gràfic 5: Distribució dels genotips del VPH segons l'edat (anys)	92
Gràfic 6: Representació del percentatge d'expressió de les cèl·lules NK en funció del CMV en pacients amb CIN2.....	95
Gràfic 7: Diagrama de caixes de les poblacions de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C	96
Gràfic 8: Diagrama de caixes de la població de les cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C i la infecció del CMV.....	98
Gràfic 9: Poblacions de cèl·lules NK segons l'edat.....	100
Gràfic 10: Evolució de les lesions de CIN2 el primer any de seguiment.....	109
Gràfic 11: Evolució de les lesions de CIN2 el segon any de seguiment	109
Gràfic 12: Representació de l'evolució del CIN2 en funció de l'edat en grups de 5 anys....	111
Gràfic 13: Distribució de la l'evolució del CIN2 segons la citologia prèvia	121
Gràfic 14: Distribució de l'evolució del CIN2 segons els genotips del VPH.....	117
Gràfic 15: Representació del percentatge d'expressió del receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2.....	124
Gràfic 14: Distribució de l'evolució del CIN2 segons els genotips del VPH.....	125
Gràfic 15: Representació de la proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2	132
Gràfic 16: Representació de la proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 en pacients CMV negatives	135
Gràfic 17: Representació de la proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 en pacients CMV positives.....	135
Gràfic 18: Corba ROC de la capacitat de discriminació del model multivariant de RLB de CIN2+	143
Gràfic 19: Corba ROC de la capacitat de discriminació del model multivariant de RLB de CIN3	145
Gràfic 20: Corbes de Kaplan-Meier per la progressió a CIN3 de les lesions de CIN2.....	146

ÍNDEX D'ALGORITMES

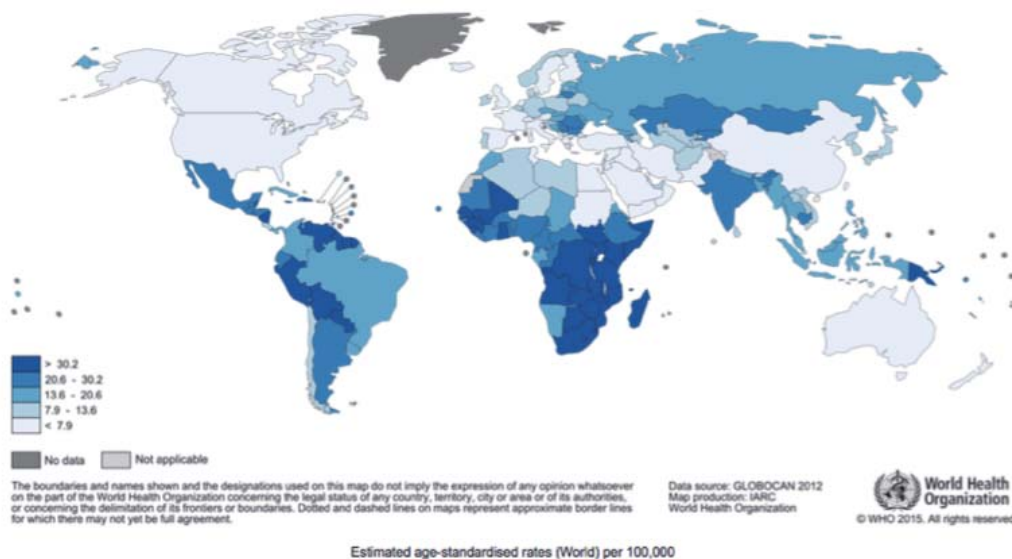
Algoritme 1: Reclutament i seguiment de les pacients a l'estudi	73
Algoritme 2: Diagrama de flux de la població d'estudi	86

1. INTRODUCCIÓ:

1.1. EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE CÈRVIX

El càncer de cèrvix és considerat un problema de salut pública degut a la seva alta incidència i mortalitat en dones relativament joves. La infecció pel Virus del Papil·loma Humà (VPH) representa una de les infeccions de transmissió sexual més comú i responsable principalment de la patogènia del càncer de cèrvix. A nivell mundial és el quart càncer més comú en les dones. S'estima que cada any es diagnostiquen aproximadament 500.000 casos nous d'aquest càncer dels qual el 85% es localitzen en regions menys desenvolupades (Figura 1) La mortalitat estimada és de 260.000 morts anuals i aquesta varia 18 vegades entre les diferents regions del món que va des de menys de 2 per 100.000 a Àsia Occidental, Europa i Austràlia a més de 20 per 100.000 a Àfrica [1].

Figura 1: Distribució mundial de la incidència de càncer de cèrvix segons GLOBOCAN [1]



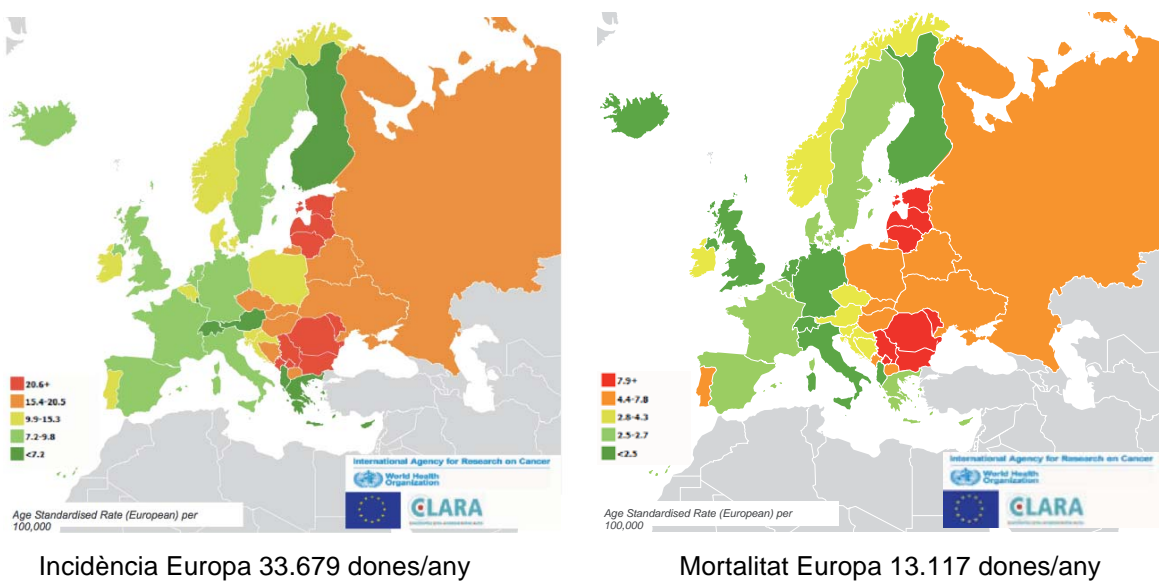
A nivell europeu el càncer de cèrvix ocupa la sisena posició després del càncer de mama, colon-recte, pulmó, úter i ovari. La taxa mitjana europea d'incidència és de 11,3 per 100.000 dones, el que a l'any 2012 va representar una incidència de 33.679 dones i una mortalitat de 13.117 dones [2] (Figura 2). En comparació amb els països europeus, el càncer de cèrvix a Espanya ocupa la dotzena posició en freqüència amb una taxa ajustada per edat a la població estàndard mundial de 7,7 casos per 100.000 dones-any, amb una mortalitat de

3,6 per 100.000, sobretot en dones entre 45-55 anys. S'estima que el 2014 es van diagnosticar 2.375 nous casos a Espanya [3].

La baixa incidència en països desenvolupats es deu, en part, a l'efectivitat dels programes de cribratge organitzats i al cribratge oportunista basats en la citologia cervical. El cribratge té com a objectiu detectar lesions precursoras a l'epiteli cervical que serien l'antecedent del càncer invasor i que són completament tractables. Tot i així, cap programa ha aconseguit erradicar totalment la malaltia.

L'edat mitjana de diagnòstic és de 48 anys, encara que aproximadament el 47% de les dones amb càncer de cèrvix es diagnostiquen abans dels 35 anys i només un 10% dels diagnòstics es fan en dones majors a 65 anys. El tipus histològic més comú és el carcinoma de cèl·lules escamoses, que representa el 80% de tots els càncers invasors de cèrvix [4]. La supervivència global als 5 anys estandaritzada per edat de les pacients amb càncer de cèrvix a Espanya és aproximadament del 63,9%, un punt per sobre la mitjana dels països europeus (62,4%) [5]. En països en vies de desenvolupament, donada l'absència de programes de cribratge, el diagnòstic sol fer-se en estadis avançats, reduint la supervivència global fins un 30% [6].

Figura 2: Distribució europea de la incidència i mortalitat del càncer de cèrvix el 2012 [2]



1.2. LESIONS INTRAEPITELIALS CERVICALS

L'aparició del càncer de cèrvix està normalment precedida per un llarg període de temps en el que es desenvolupen lesions preinvasives conegudes com a CIN/SIL o "cervical intraepithelial neoplasia/squamous intraepithelial lesion", en funció de si descrivim una lesió histològica o citològica, respectivament.

Existeix una gradació caracteritzada microscòpicament per una sèrie d'alteracions cel·lulars que orienta amb la seva gravetat el risc de progressió a càncer invasor. La nomenclatura citològica i histològica de les alteracions premalignes de l'epiteli cervical ha evolucionat paral·lelament a l'avenç del coneixement de la seva biologia i història natural.

El 1928 el patòleg Papanicolau va descriure la presència d'unes alteracions citològiques característiques que permetien detectar unes lesions a nivell cervical amb un cert potencial de desenvolupar càncer de cèrvix. La terminologia citològica s'unifica el 1989 amb la descripció del Sistema Bethesda [7] que inclou nous conceptes relacionats amb la infecció pel VPH, classificant les lesions escamoses intraepiteliais (SIL), en dues categories: baix grau (LSIL) i alt grau (HSIL). Addicionalment, la terminologia Bethesda obliga a incloure a l'informe citològic la qualitat de la mostra (adequada o inadequada). D'altra banda, també incorpora un nou terme per classificar aquelles alteracions citològiques que no permeten descartar totalment la presència d'una lesió intraepiteliais, però tampoc són suficients per diagnosticar-la, conegudes com a ASC-US "Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance" o ASC-H "Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL" en funció de la probabilitat de correspondre a lesions intraepiteliais de baix o alt grau. Finalment, la nova terminologia també incorpora el concepte AGC "Atypical Glandular Cells" per aquelles lesions que podrien precedir un adenocarcinoma in situ o alguna lesió més greu.

Com hem anat introduint, aquestes lesions citològiques cervicals tenien un equivalent histològic. De fet, posteriorment a l'establiment de la citologia cervico-vaginal com a mètode de cribratge per càncer cervical, el 1949 Papanicolau va introduir el terme "displàsia" per designar canvis histològics epiteliais menys evidents que el carcinoma in situ. Als anys seixanta, Richart va ser un dels primers a afirmar que el càncer de cèrvix era conseqüència de

l'evolució de les lesions premalignes no invasores introduint el terme de neoplàsia cervical intraepitelial o CIN classificant-se en 3 grups en funció del grau d'afectació epitelial per part d'aquestes lesions, les quals mai sobrepassaven la membrana basal. CIN1 corresponia a displàsia lleu, afectant el terç inferior de l'epiteli, CIN2 a displàsia moderada afectant els dos terços inferiors de l'epiteli, i CIN3 corresponia a displàsia severa incloent el concepte de carcinoma in situ que abarcava tot el gruix de l'epiteli, respectant la membrana basal.

Recentment, amb la finalitat d'homogeneïtzar la terminologia i de facilitar reproductibilitat i la comunicació entre professionals, s'ha sotmès aquesta nomenclatura a revisió i el Col·legi Americà de Patòlegs (CAP) i la Societat Americana de Colposcòpia i Patologia Cervical (ASCCP) han establert una nova terminologia histopatològica denominada LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) [8]. La novetat d'aquesta terminologia és que inclou els coneixements actuals sobre la infecció pel VPH, incorporant l'ús de biomarcadors. Aquesta terminologia ha estat recollida en la última classificació de la OMS (Organització Mundial de la Salut) per les neoplàsies del tracte genital femení publicat el 2014 [9]. La terminologia LAST simplifica les lesions escamoses intraepitelials histològiques en dos grups: lesions de baix grau (LSIL) i lesions d'alt grau (HSIL) utilitzant la mateixa terminologia citològica, i prescindint de la diferència entre CIN2 i CIN3, les quals són considerades lesions d'alt grau. Un altre canvi que suposa és que es pot aplicar a totes les altres lesions precursors produïdes pel VPH en altres àrees genitals (vagina, vulva, periné i anus) [8].

1.3. EL VIRUS DEL PAPIL·LOMA HUMÀ

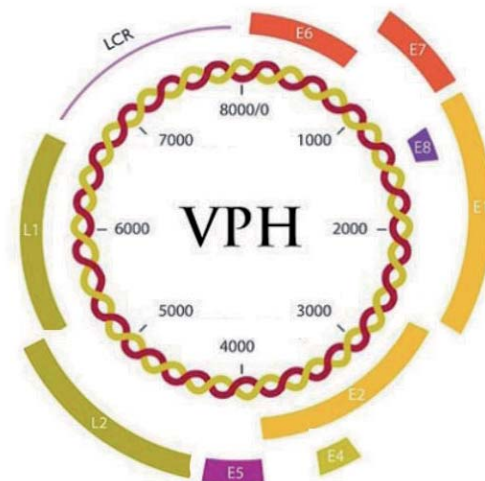
El càncer de cèrvix té una història natural ben definida, ja que pel seu desenvolupament és indispensable però no suficient la infecció pel VPH [10].

El VPH és un ADN virus circular de la família dels *papovaviridae*, de petit tamany (55nm), que comprèn més de 100 genotips diferents dels que existeixen 30 amb un especial tropisme per la mucosa anogenital. La infecció per VPH representa una de les infeccions de transmissió sexual més comú i

responsable principalment de la patogènia del càncer del tracte genital inferior [11].

El VPH consta de varis gens: 8 d'expressió primerenca (E1-E8), l'expressió dels quals es tradueix en proteïnes implicades en la regulació i replicació viral; 2 gens d'expressió tardana (L1, L2) l'expressió dels quals genera les proteïnes per la unió de la coberta viral, la càpsida; i una regió de control que serà l'encarregada de controlar l'expressió dels gens (LCR). Mentre que els gens d'expressió primerenca difereixen notablement en la seva seqüència entre els diferents tipus de VPH, els gens d'expressió tardana presenten notables similituds entre ells, fet que permet que, especialment L1 sigui la diana principal de detecció general d'ADN viral, mentre que els gens E6 i E7 s'utilitzen per detectar el tipus específic de VPH (Figura 3) [12].

Figura 3: Estructura del virus del Papil·loma Humà segons *López i col. [12]*.



1.3.1. GENOTIPS VIRALS

La família del VPH consta amb més de 150 genotips virals diferents que, en relació a la seva patogènia oncològica es classifiquen en alt i baix risc oncogènic. El paradigma dels VPH d'alt risc són els tipus 16 i 18 i els de baix risc són els tipus 6 i 11. Les infeccions pel VPH d'alt risc tendeixen a tenir un curs silent establint infeccions persistents que generen alteracions citològiques i histològiques amb més freqüència que el grup dels de baix risc que rarament es troben en lesions neoplàsiques i cursen predominantment amb infeccions clínicament visibles, denominades condilomes acuminats.

En la població general, el 80% dels càncers genitals s'atribueixen a 4 genotips d'alt risc: VPH16, VPH18, VPH45 i VPH31. Es considera que el VPH16 és responsable de més del 50% dels casos de carcinoma de cèl·lules escamoses i junt amb el VPH18 són responsables del 70% dels casos de carcinoma de cèl·lules escamoses [13]. Quan es diferencia segons tipus histològics de càncer de cèrvix, el VPH16 segueix sent el més freqüent en totes les histologies, però el VPH18 és molt més freqüent en aquelles varietats amb component d'adenocarcinoma [14,15].

Actualment s'utilitza la classificació de la Agència de Recerca del Càncer (ARC) pels diferents genotips del VPH [16] (Taula 1).

Taula 1: Classificació dels genotips del VPH segons ARC [16].

Tipus	Genotip VPH
Alt risc	
- Carcinògens	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59
- Probablement carcinògens	68
- Possiblement carcinògens	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82
Baix Risc	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89

1.3.1.1. Mètodes de genotipat del VPH

Les tècniques de genotipat del VPH es basa en la detecció del material genètic del virus en diferents mostres biològiques, i en particular la citologia. Existeixen diferents tècniques:

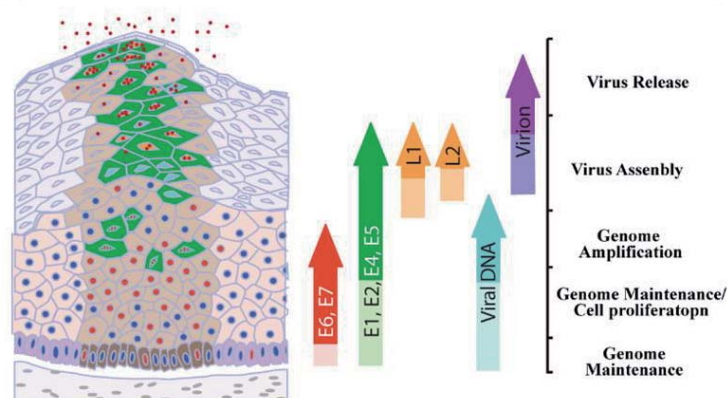
- *Mètodes de sonda directa:* És el mètode utilitzat clàssicament, però avui en dia no s'utilitza degut a la baixa sensibilitat, el temps de realització i la necessitat de grans quantitats de DNA altament purificat.
- *Mètodes d'amplificació de senyal per Captura d'híbrids:* L'actual captura d'híbrids de segona generació (HC2) va ser el primer mètode de detecció del VPH aprovat per la FDA. Utilitza 2 sondes de RNA específiques per determinades parts del genoma, una per a la detecció de 13 virus d'alt risc i l'altre per virus de baix risc. El punt de tall de significació clínica s'ha establert a 1pg/ml d'ADN, equivalent a 100.000 còpies de virus.

- *Mètodes basats en tècniques PCR:* Existeixen múltiples kits comercials basats en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) com és el cas de COBAS 4800 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA). Es basa en l'amplificació d'un fragment de DNA utilitzant l'enzim PCR polimerasa que permet detectar fins a 10 còpies de ADN entre 1 milió de cèl·lules. Detecta de manera aïllada un tipus específic de virus, com és el VPH16, VPH18 i els 12 VPH-AR restants (31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68).

1.3.2. HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PEL VPH

La transmissió del VPH es produeix majoritàriament per via sexual, essent la zona de transformació del cèrvix la part més susceptible per iniciar una transformació neoplàstica. A aquest nivell existeix un continu recanvi cel·lular, degut a que l'epiteli cervical passa de ser estratificat a columnar. El virus aprofita la maquinària de les cèl·lules basals de l'epiteli cervical per la seva síntesis, integració, replicació i amplificació, originant alteracions del cicle cel·lular. Quan infecta les cèl·lules basals pot romandre en elles de forma episomal, en estat latent, o bé abandonar aquesta latència i aprofitar la diferenciació cel·lular pròpia de l'epiteli cervical. D'aquesta manera, paral·lelament a la maduració de l'epiteli cervical, els VPH expressen els seus gens de forma seqüencial: en primer lloc, els gens primerencs (E1-E8) en les capes basals, i posteriorment les proteïnes tardanes (L1 i L2) en les capes superficials de l'epiteli més diferenciat que formaran la càpsida i permetran la unió de noves partícules virals per repetir el cicle. En determinades circumstàncies fisiològiques i posterior a un període de persistència de la infecció generalment llarg, les partícules d'ADN viral que es troben en forma episomal s'integren dins del genoma cel·lular bloquejant les proteïnes amb funcions importants en el cicle cel·lular (p53 i pRb). Com a conseqüència d'aquesta integració es provoquen alteracions en el creixement normal i diferenciació de l'epiteli cervical seguides d'una acumulació d'errors genètics que poden ser la base de la transformació tumoral. La Figura 4 mostra una representació gràfica d'aquest procés descrit [17].

Figura 4: Integració del VPH a les cèl·lules de l'epiteli cervical segons *Egawa i col* [17].



S'estima que al voltant del 70-80% de dones i homes sexualment actius, han estat exposats al VPH en algun moment de la seva vida. En la gran majoria dels casos tindrà lloc una infecció transitòria, que es farà indetectable en 6-12 mesos, gràcies al propi sistema immunitari de l'hoste [18]. Per altra banda, s'estima que prop del 10% de les infeccions del VPH persisteixen més de 3 anys, disminuint la probabilitat de ser aclarides espontàniament i són les responsables de desenvolupar les lesions preinvasives. Quan la lesió precursora i el VPH d'alt risc es mantenen, existeix un risc més elevat de progressar i desenvolupar carcinoma invasiu [19, 20]. En global, es considera que el 5% d'infeccions produïdes pel VPH d'alt risc progressen a càncer en poblacions sense cribratge, i un 1-2% en poblacions cribades [21].

El risc de desenvolupar un càncer de cèrvix està directament relacionat amb la severitat de la lesió precursora preinvasiva coneguda com a CIN. Varies revisions a la literatura han establert un risc de desenvolupar un càncer invasiu de l'1% en pacients amb CIN1, del 5% en pacients con CIN2 i del 15% en pacients con CIN3. Dit d'altra manera, la taxa de regressió espontània pot arribar al 65% dels CIN1, el 50% dels CIN2 i un 30% dels CIN3 [22-25], tal com es mostra a la Taula 2.

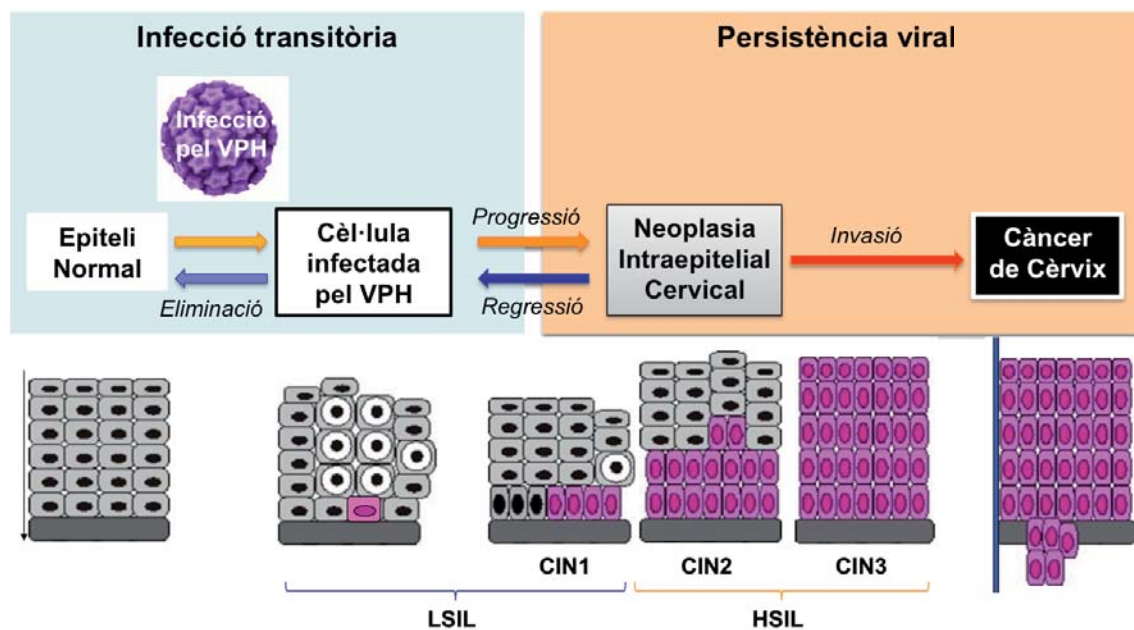
Taula 2: Evolució de les displàsies cervicals segons Östor [25]

	Regressió	Persistència	Progressió	Invasió
CIN1	57%	32%	11%	1%
CIN2	43%	35%	22%	5%
CIN3	33%	<56%	14%	>12%

En general el càncer de cèrvix es considera una malaltia amb un llarg interval de temps entre la primoinfecció per VPH i la presentació clínica de la neoplàsia. S'ha calculat un temps mig entre la infecció pel VPH i el desenvolupament de CIN3 de 7 a 15 anys, tot i que en cohorts prospectives amb seguiment estricte s'han registrat evolucions ràpides a CIN2 i CIN3 als pocs mesos de la infecció [26].

La història natural de la oncogènesis cervical pel VPH podria seguir un model representat esquemàticament a la Figura 5.

Figura 5: Història natural de la infecció del VPH (adaptat de *Gravitt PE*) [27]



1.4. MANEIG ACTUAL DE LA INFECCIÓ DEL VPH

A partir del coneixement de la història natural del VPH s'han establert els programes de cribatge i maneig de les lesions intraepitelials per tal de prevenir l'evolució de les lesions a càncer cervical.

1.4.1. PROGRAMA DE CRIBATGE

El fet de que càncer de cèrvix tingui una història natural ben definida amb un llarg període de temps en el que es desenvolupen lesions preinvasives que es poden diagnosticar i tractar abans de la seva transformació invasiva, permet que sigui una patologia cribable. L'objectiu del cribatge és identificar les dones amb infeccions del VPH o lesions cervicals precursors amb major risc de

progressió a càncer invasor, evitant la detecció i tractament innecessària de lesions benignes associades al VPH que no progressen. Els programes de cribratge de càncer de cèrvix a nivell de la població general mitjançant citologia cervical han demostrat ser efectius en la reducció de la seva incidència i mortalitat en diferents països [28].

A Espanya existeix un cribratge oportunista basat en la realització de la citologia cervical cada 3 anys que inclou una part important de la població finançat amb fons públics i una altra part de la població realitzat a la medicina privada. Els resultats de l'estudi AFRODITA [29], en el que s'avalua la situació del cribratge de cèrvix en Espanya amb una mostra de 6.852 dones, indiquen que la cobertura del cribratge oportunista del càncer de cèrvix realitzant una citologia cada 3 anys, és del 75,6% en dones de 18 a 65 anys. A més a més, l'estudi també evidencia una cobertura insuficient en dones majors de 55 anys (66%), en dones que viuen en àrees rurals (66%) i amb un nivell socioeconòmic baix (65%).

Un altre treball realitzat a Catalunya durant el 2008-2011 que inclou 758.690 citologies cervicals realitzades en 595.868 dones en una població d'estudi que cobreix dos milions de dones, mostra una cobertura del cribratge del càncer de cèrvix del 40,8% per les dones entre 25-65 anys, dada que s'ha mantingut estable respecte estudis previs [30]. S'ha de destacar que el 30% de l'activitat del cribratge a Catalunya es realitza en el sector privat.

La principal limitació del programa de cribratge oportunista és la falta de cobertura suficient de tota la població, ja que el 80% de les dones que desenvolupen càncer de cèrvix no tenien citologies prèvies [31]. Aquestes dades reforcen la necessitat d'implementar programes de cribratge poblacional per tal de garantir la cobertura poblacional [32].

Tot i l'èxit de la citologia en el cribratge de càncer de cèrvix, s'ha observat que té una baixa sensibilitat [33]. Per aquest motiu es suggereix realitzar el test del VPH en dones majors de 30-35 anys, per la seva millor reproductibilitat i elevat valor predictiu negatiu (VPN) proper al 99% per lesions d'alt grau [34]. Això significa que una determinació negativa del VPH té una molt baixa probabilitat de tenir una lesió CIN2+, mostrant un risc de desenvolupar una CIN3 en els següents 6 anys de 0,27%. Aquest valor és semblant a un resultat negatiu del test combinat de citologia i test del VPH (co-test) i representa un

risc de 0,28%, mentre que l'estimació de risc pel mateix període posterior a una citologia negativa és de 0,97% [35]. La millor sensibilitat de la prova del VPH davant la citologia es confirma al observar una menor incidència de càncer de cèrvix als 5 anys d'una prova VPH negativa que als 3 anys de una citologia negativa [36,37]. En aquesta línia, un recent estudi que analitza els resultats dels primers 3 anys posterior a l'assaig prospectiu del test del VPH com a cribratge primari en dones de més de 25 anys, conegut com a ATHENA, demostren que el test del VPH té una major sensibilitat ajustada pel CIN3+ (76,1% IC del 95%: 70,3-81,8%) en comparació amb les sensibilitats ajustades del co-test i la citologia 61,7% (IC del 95% 56.0- 67.5%) i 47.8% (IC 95% 41,6-54,1%), respectivament [38].

Degut a la baixa incidència de càncer de cèrvix per sota els 25 anys i la alta prevalença de la infecció del VPH per sota 30 anys, no s'ha demostrat que el cribratge sistemàtic amb co-test d'aquestes pacients redueixi la seva incidència [39,40]. Actualment s'accepta la realització d'una citologia cervico-vaginal trianual o una determinació del VPH d'alt risc cada 5 anys com a estratègies vàlides per el cribratge a partir dels 25 o 30 anys, respectivament.

Les últimes recomanacions del cribratge de càncer de cèrvix de la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia) del 2014 [41] estableixen alguns canvis respecte a guies anteriors, que es resumeixen a la Taula 3:

Taula 3. Recomanacions d'estratègies de cribratge de la SEGO [41]

Edat	Estratègia
<25 anys	No cribratge
25-30 anys	Citologia cada 3 anys
30-65 anys	Test del VPH cada 5 anys Alternatives acceptades: Citologia cada 3 anys Co-test (citologia + VPH) cada 5 anys
>65 anys	Fi del cribratge si: 3 citologies negatives prèvies o 2 test del VPH o co-test negatius i No antecedents de CIN en els 20 anys previs

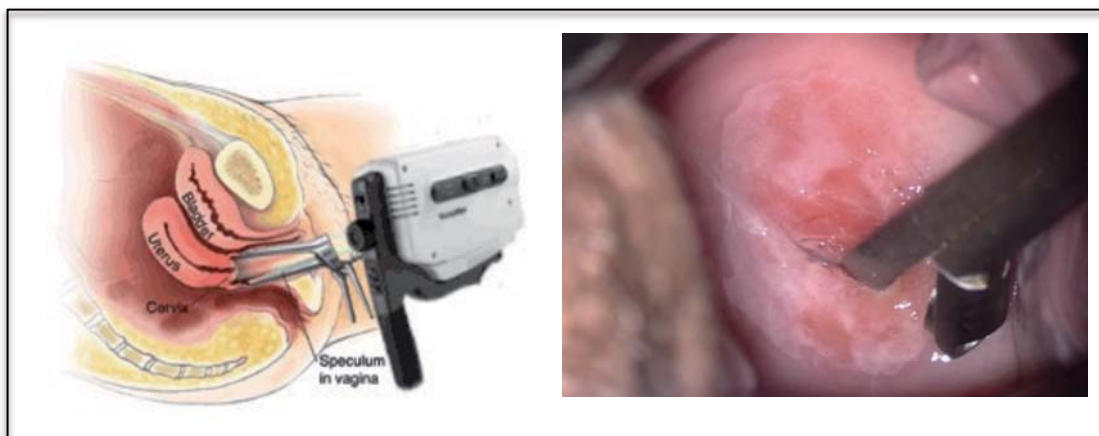
Degut a la introducció de la vacuna contra el VPH, es preveu que en un futur tant la incidència com la mortalitat per càncer de cèrvix disminueixin, encara que a curt període no s'evidenciaran canvis, i la incidència dependrà més d'altres factors com per exemple els fenòmens migratoris, els canvis en les conductes sexuals i les característiques dels programes de cribratge.

1.4.2. MANEIG DE LES LESIONS INTRAEPITELIALS CERVICALS

La citologia o el test del VPH són les proves de cribratge destinades a identificar les pacients que poden tenir una lesió precursora cervical o invasora del càncer de cèrvix que requereixi estudis posteriors. S'ha de considerar el fet que un diagnòstic definitiu de la neoplàsia intraepitelial o carcinoma de cèrvix només pot fer-se a través de la biòpsia d'una lesió sospitosa identificada mitjançant colposcòpia.

La *colposcòpia* consisteix en l'exploració magnificada dels epitelis del cèrvix uterí amb l'objectiu fonamental d'identificar imatges sospitoses de lesions invasives o precursors de càncer, per tal de realitzar una biòpsia dirigida. Tal i com es mostra a la Figura 6. Al realitzar la colposcòpia s'ha d'identificar la zona de la unió escamo-columnar o zona de transformació, que és on es situen amb més freqüència les lesions. Si aquesta zona es visualitza amb la seva totalitat, es considera que la colposcòpia és satisfactòria, en cas contrari es considera no satisfactòria i s'ha de descartar lesió endocervical. La colposcòpia té com objectiu augmentar la sensibilitat de la citologia. L'ús conjunt d'ambdues tècniques té un VPN pràcticament del 100% per detectar CIN2-3 o càncer invasor i permet localitzar les àrees més sospitoses per dirigir biòpsies, millorant l'exactitud de la histologia. Com passa amb la majoria de tècniques d'imatge, el seu rendiment és explorador dependent i varia en funció del grau d'entrenament i experiència del professional que la realitza.

Figura 6: Imatge d'un colposcop (esquerra) i biòpsia colpo-dirigida (dreta)



La conducta davant un resultat histològic anormal depèn del grau i característiques de la lesió, edat de la pacient i resultat de la citologia prèvia, entre d'altres. El fet que les lesions precursors puguin ser detectades i tractades adequadament, permeten la prevenció del càncer invasor.

El tractament de les neoplàsies cervicals intraepitelials té per objectiu impedir la progressió a càncer utilitzant els procediments més conservadors, amb menys seqüeles i conseqüències reproductives. Donat l'elevat potencial de regressió i la lenta evolució d'aquestes lesions, en ocasions es pot plantejar una actitud conservadora basada en un seguiment estricte amb la finalitat d'evitar un important número de tractaments innecessaris.

Les lesions escamoses intraepitelials de baix grau (LSIL/CIN1) són l'expressió histològica d'una infecció del VPH que la majoria de les vegades (60-80%) regressa espontàniament, de fet només un 5-10% de les lesions de CIN1 progressen a CIN3 i tenen molt baixa probabilitat de desenvolupar càncer invasor de cèrvix [42-44]. El seguiment estricte d'aquestes dones amb lesió de LSIL mitjançant el co-test o colposcòpia segons resultats, permet la identificació precoç de les lesions que progressen i minimitzen el risc de càncer de cèrvix, però en la majoria dels casos suposa un consum innecessari de recursos humans, tecnològics i econòmics. Actualment, i donat la seva capacitat de regressió, només es pot considerar el tractament exèrètic de la lesió si la citologia prèvia informa de HSIL i la colposcòpia és insatisfactòria o la presa endocervical presenta alguna alteració. En casos en què la lesió de CIN1 persisteixi 2 anys existeix la opció de fer un seguiment anual mitjançant co-test o tractar la lesió amb tractament exèrètic o destructiu [41].

Per altra banda, les lesions d'alt grau CIN3/AIS es consideren autèntiques neoplàsies intraepitelials amb alt potencial de progressió a càncer de cèrvix pel que es recomana realitzar un tractament exèrètic, sovint en forma de conització. Les pacients amb CIN3 que no es tracten, presenten un risc de progressió a càncer de cèrvix del 30% als 30 anys i del 50% a més llarg termini, mentre que en les pacients tractades inicialment, el risc de càncer als 30 anys és del 0,7% [45].

1.4.2.1. Maneig de la displàsia moderada o CIN2

La lesió CIN2 té un significat biològic i evolució mal definida. Es troba descrita entre la lesió del CIN1 que majoritàriament regressa espontàniament i la lesió del CIN3 que té un major potencial d'evolució a càncer.

Degut a la seva història natural incerta i el seu risc de progressió, actualment la terminologia de LAST [8] tendeix a agrupar el CIN2 i el CIN3 en una mateixa categoria considerada d'alt grau (HSIL). Contràriament, altres tendències defensen que el CIN2 continua essent una lesió clínico-patològica ben diferenciada amb taxes de regressió majors que el CIN3. Estudis recents mostren que fins un 40-74% de les pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 poden regressar espontàniament en els 2 anys següents al diagnòstic. Aquest fet sumat a que el CIN2 afecta sobretot a dones joves, molts autors estant promovent un maneig conservador per evitar qüestions relacionades amb la fertilitat i altres morbiditats relacionades amb la conització.

Globalment, els factors més freqüentment associats a la regressió de les lesions de CIN2 són: edat inferior a 25 anys, lesions poc extenses, negativització del VPH, baix nombre de parelles sexuals, citologia prèvia de LSIL, absència d'infecció pel VPH d'alt risc, sobretot del VPH16 i 18.

A continuació es presenta la Taula 4 que inclou un resum dels estudis presents a la literatura que realitzen un maneig conservador en pacients amb diagnòstic histològic de CIN2, i les respectives taxes de regressió i progressió amb mitjanes de seguiment que varien entre 1 i 2 anys.

Taula 4: Resum dels estudis que reporten maneig conservador del CIN2

Autor	Data	Nombre pacients	Edat (anys)	Període de seguiment	Taxa de regressió	Taxa de progressió
Chan JK [46]	2003	38	19-55	2 anys	58%	
Moore K [47]	2007	23	13-21	1,5 anys	65%	5%
Fuchs K [48]	2007	36	11-21	2 anys	50%	8%
Guedes AC [49]	2010	45	18-61	1 any	44%	23%
Castle P [50]	2009	357	18-62	2 anys	40%	22%
Moscicki AB [51]	2010	95	13-24	2 anys	62%	12%
McAllum B [52]	2011	157	< 25	1 any	62%	18%
Discacciati M [53]	2011	42	17-47	1 any	74%	24%
Ho GY [54]	2011	63	18-40	1 any	54%	5%
Wang SM [55]	2013	30	35-45	6 anys	56%	16%
Bleecker E [56]	2014	21	< 30	2 anys	52%	24%

Destacar l'estudi del grup de *Moscicki i col.* [51] que va realitzar un maneig conservador en 95 pacients diagnosticades de CIN2, descrivint taxes de regressió de fins un 62% en pacients menors de 25 anys posterior a un seguiment de 2 anys. En la mateixa línia es troben les conclusions extreïdes de l'estudi ALTS dut a terme per *Castle i col.* [50] l'objectiu principal del qual era establir un millor maneig (seguiment o intervenció) de les pacients amb citologies de ASC-US i LSIL. Entre els seus resultats va registrar una major incidència de CIN2 en aquelles dones que van ser sotmeses a proves diagnòstiques en el moment de la citologia comparada amb la incidència de CIN2 en aquelles pacients que van ser assignades al grup de seguiment. Aquest grup descriu una regressió del CIN2 de fins un 40% dels casos, una evolució a CIN3 del 22% i a carcinoma invasor del 5% (en més de 12 mesos després del diagnòstic). Posteriorment *Discacciati i col.* [53] en un estudi prospectiu de 42 pacients amb biòpsia de CIN2 i citologia prèvia de LSIL sotmeses a un maneig conservador durant 1 any, va descriure taxes de regressió de fins a un 74% incloent tots els grups d'edat amb una mitjana d'edat de la població inclosa de 25 anys.

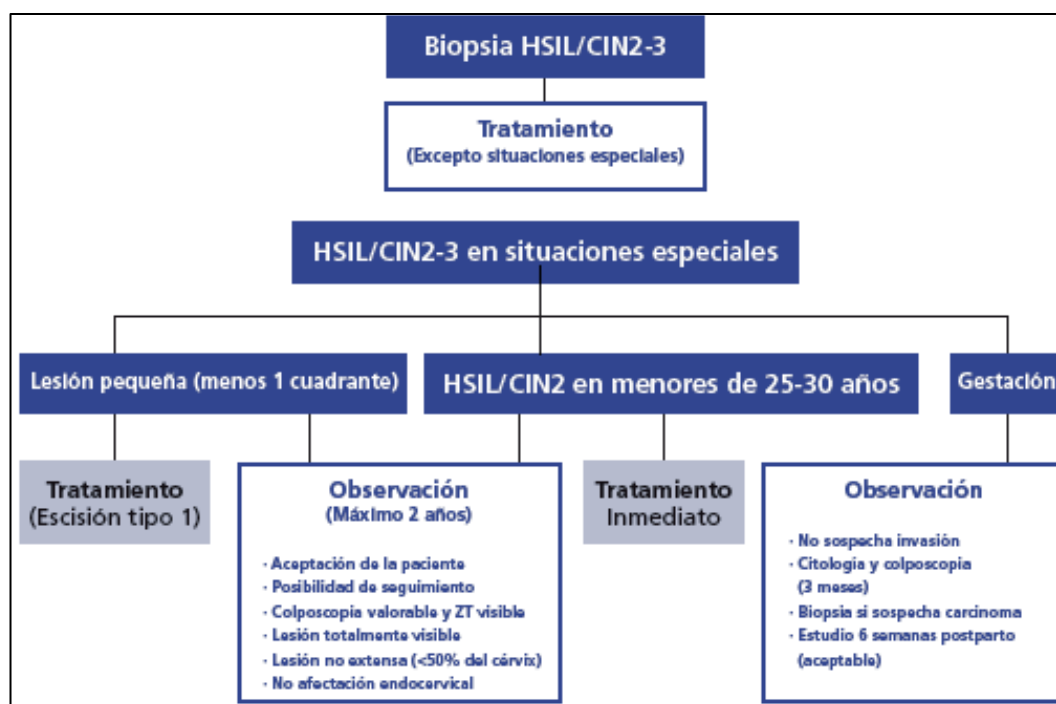
De la revisió de la literatura s'extreu que el CIN 2 és un tipus de lesió amb una alta taxa de regressió. Aquest fet permetria optar pel seu maneig conservador en determinades circumstàncies, per tant l'evitar el tractament exerètic innecessari mitjançant la conització, no exempta de morbiditats i costos derivats.

El *tractament exerètic o conització* és un procediment quirúrgic estandaritzat, que es defineix com l'exèresi de la porció més caudal del cèrvix uterí al voltant del canal cervical, incloent la zona de transformació amb una nansa diatèrmica o bé amb bisturí fred, per tal d'extirpar la totalitat de la lesió, permetent la valoració histològica exacte i els marges quirúrgics. Idealment s'hauria de realitzar sota visualització colposcòpica, per tal d'adaptar-se al tamany i característiques de la lesió. En general la conització té baixos riscos quirúrgics a curt termini que permeten la seva realització de manera ambulatoria majoritàriament. Malgrat això, s'han descrit conseqüències negatives immediates derivades la conització com pot ser el sagnat intraoperatori, la perforació uterina o vesical, el sagnat post-operatori i la infecció [57,58]. A mig o llarg termini, s'ha demostrat un increment del risc d'aquestes pacients a presentar part prematur, ruptura prematura de membranes preterme i esdeveniments obstètrics desfavorables a conseqüència de la prematuritat. Concretament, la conització amb bisturí fred té un risc relatiu (RR) de 2,59 (1,80-3,72, IC 95%) de part prematur, un RR de 2,53 (1,19 – 5,36, IC 95%) de baix pes al néixer (inferior a 2500g) i una tendència no significativa a un augment de la mortalitat perinatal [59-62]. Aquest risc és superior a major tamany de la peça quirúrgica i nombre de conitzacions realitzades. Una segona conització s'associa a un risc 12 vegades major de part prematur [63]. Per altre banda, la realització d'una conització cervical implica una major dificultat en el seguiment posterior degut a la presència de una cèrvix cicatricial, factor especialment important en aquestes pacients degut al risc de recurrència del 5 al 40%, major segons la severitat de la lesió. S'han descrit unes taxes de curació (90-97%) i de CIN residual post-tractament semblants, sense diferències significatives entre els diferents tècniques exerètiques (conització amb làser, conització amb bisturí i exèresis amb nansa diatèrmica) [64,65].

Per tal d'evitar el sobretractament de les lesions de CIN2 amb la conització, les actuals guies americanes proposen un maneig conservador en

les pacients joves amb CIN2 [66]. El protocol actual de la SEGO [41] recomana la observació sense tractament de lesions que ocupen menys d'un quadrant i sense afectació endocervical, en dones de menys de 25-30 anys i en gestants. En cas d'augmentar el tamany de la lesió, biòpsia de CIN3 o persistència als 24 mesos, es recomana realitzar tractament exerètic (Figura 7). El protocol de seguiment proposat es basa en realitzar control citològic i colposcòpic cada 6 mesos durant un màxim de 2 anys; repetir la prova del VPH als 12 mesos; si la citologia, la prova del VPH i la colposcòpia són negatives als 12 mesos es repetiran als 3 anys i si són negatives es passarà al cribratge rutinari; si la citologia o la colposcòpia de la lesió persisteix als 12 mesos: cal repetir la biòpsia; en cas de HSIL/CIN2-3 persistent s'aconsella realitzar tractament exerètic.

Figura 7: Algoritme del diagnòstic histològic de HSIL/CIN2-3 de la SEGO 2014 [41]



No obstant cal identificar factors predictors que ajudin a distingir les lesions de CIN2 que regressen de les que progressen, pel risc que podria suposar les pèrdues d'aquestes pacients durant el seguiment. De tal manera que es podria oferir un tractament exerètic immediatament a les pacients amb més risc de progressió, i un maneig més conservador a les pacients que majoritàriament regressaran.

1.5. COFACTORS IMPLICATS EN LA CARCINOGENÈSIS DEL VPH

Tot i que la infecció pel VPH és un factor indispensable per la carcinogènesi cervical, no és un factor suficient, cal la presència de cofactors pel seu desenvolupament i progressió fins a càncer invasor.

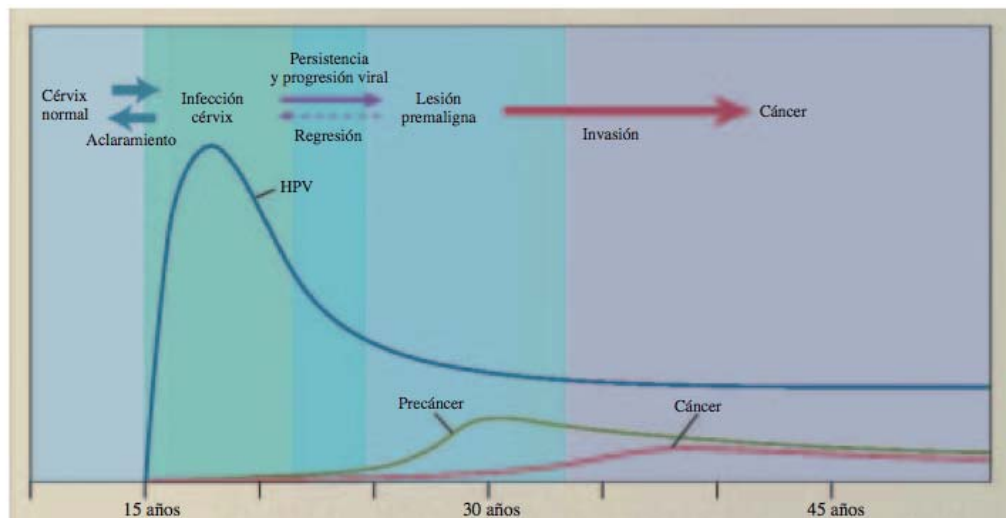
Algunes conductes i pràctiques sexuals, com per exemple, un major nombre de parelles sexuals i una menor edat d'inici de les relacions sexuals, es relacionen amb un major risc de progressió o persistència [67]. La major edat en el moment de la infecció, un estat d'immunosupressió o la infecció pel VIH, la multiparitat, el tabac, l'ús prolongat d'anticonceptius hormonal orals i algun component de la dieta, s'ha proposat com a factors determinants per la persistència de la infecció i juguen un paper com a factors de risc [68,69].

1.5.1. EDAT

Un dels principals factors associats amb la infecció del VPH és l'edat. A la Figura 8, es mostra que generalment la prevalença del VPH és més alta en edats immediates a l'inici de les relacions sexuals dels 15 als 25 anys. Aquest primer pic, va seguit d'una disminució molt marcada i estable al voltant dels 25-40 anys que correspondria al grup de dones portadores cròniques de la infecció viral i al grup d'alt risc per la progressió a càncer. És important ressaltar que en edats joves i de major activitat sexual, tot i que la infecció pel VPH és molt freqüent, la gran majoria de dones infectades (més del 90%) resolen la infecció de manera espontània en 2-3 anys i només una petita fracció de dones la infecció persisteix [70,71]. Aquest petit grup de dones portadores cròniques del VPH d'alt risc és el que té un risc més elevat de progressió i desenvolupar lesions neoplàsiques del tracte genital [72,73]. A mesura que augmenta l'edat, les dones tendeixen a tenir menys noves parelles sexuals, i la prevalença del VPH disminueix. Després dels 45 anys, les infeccions pel VPH d'alt risc tendeixen a estabilitzar-se, i menys del 5% de les dones a la població general són positives pel VPH d'alt risc. En algunes poblacions, s'observa un segon pic de la prevalença del VPH en les dones post-menopàusiques que podria reflectir la reactivació d'una infecció latent o a una reducció fisiològica de la immunitat natural en les dones amb edat avançada, en relació a la menor probabilitat de noves infeccions en aquest grup d'edat. La resolució de la infecció sembla oferir un cert grau de protecció davant a reinfeccions pel mateix

tipus de VPH, havent-se descrit un cert grau de immunitat creuada entre els tipus virals [20]. Actualment, es impossible distingir entre la reactivació d'una infecció pel VPH latent o una recentment adquirida. La reactivació de la infecció latent del VPH pot explicar-se per moltes de les infeccions per VPH que són detectades en dones grans amb una història prèvia de despistatge negativa i sense noves parelles sexuals [19]. L'exposició a noves parelles sexuals i la reactivació d'una infecció latent són possibles raonaments per explicar el segon pic d'infecció pel VPH observada en dones en edat avançada [15]. Tot i això el risc de desenvolupar un càncer de cèrvix després de la reactivació d'una infecció latent, sembla ser relativament baix [74].

Figura 8: Història natural de la infecció del VPH i el càncer de cèrvix en relació a l'edat (adaptat de *Schiffman i col*) [75].



La incidència del VPH i la mortalitat per càncer de cèrvix es comporta de manera desigual en relació a l'edat. En els grups d'edat avançada, la incidència del VPH i la mortalitat tendeixen a confluir, reflexant per un costat el pitjor pronòstic dels tumors en edats avançades i, per l'altre, la relativa absència de diagnòstics precoços en aquests grups d'edat. Les dones d'edat avançada acostumen a quedar fora dels programes de cribratge i, és en aquest grup d'edat on la citologia convencional té una sensibilitat inferior. Tot això podria explicar perquè les lesions d'aquestes dones acostumen a ser més avançades en el moment del diagnòstic. Aquest patró observat és reproductible per la

majoria de poblacions europees ja sigui en l'àmbit de programes de cribratge establerts o oportunistes [2].

D'altra banda, s'observa que la distància entre la incidència del VPH i la mortalitat és màxima entre les dones més joves. En un estudi epidemiològic de *Bernard i col. 2012* [76], que cobreix el 92% de la població d'Estats Units durant el període de 1999 a 2008 es va estudiar la incidència ajustada per edat de càncer de cèrvix (incloent tots els subtipus de càncer de cèrvix). Per dones menors a 40 anys, el 78% de càncer de cèrvix era diagnosticat en dones entre 30-39 anys, el 21% en dones entre 20-29 anys i 1% en dones amb menys de 20 anys. Hi va haver una mitjana de 3063 casos de carcinoma cervical invasiu anual entre aquest període, amb una mitjana de 14 càncers per any entre els 15-19 anys (taxa de 0,5 per 100.000) i de 125 càncers per any entre els 20-24 anys (taxa de 1,4 per 100.000). La incidència anual a Estats Units de càncer de cèrvix en dones entre 21 i 24 anys és de 1,4 per 100.000 habitants, i gairebé s'han de realitzar 55.000 citologies per cada càncer de cèrvix diagnosticat en aquest grup d'edat. Com es pot observar a la Taula 5, la rentabilitat de la citologia és major en la franja de més edat.

Taula 5: Relació entre el càncer de cèrvix i el nombre de citologies per grups d'edat segons *Bernard i col* [76]

Edat (anys)	Mitjana anual de càncer de cèrvix	Taxa de citologies (95% IC)*	Nº de citologies/càncer de cèrvix**
15-19	14	0,15 (0,13-0,18)	194,113
20-24	125	1,40 (1,33-1,48)	54,753
25-29	519	5,94 (5,78-6,10)	14,444
20-34	1035	11,54 (11,32-11,76)	6,275
35-39	1369	14,16 (13,92-14,40)	4,921
Tots els casos	3063	4,30 (4,26-4,35)	

*Taxa calculada per 100.000 dones

**Nombre de citologia per cada cas de càncer de cèrvix

Un altre estudi que mostra les baixes taxes de càncer de cèrvix en pacients joves és el de *Katki i col.* [40]. Aquest grup va estudiar el risc de CIN3+ i càncer en 5 anys segons els diferents grups d'edat de les dones sotmeses a un programa de cribratge entre el 2003 i 2010 en una determinada zona de Califòrnia. En el grup de 130.000 dones entre 21 i 24 anys es va

diagnosticar 3 casos de càncer de cèrvix durant el seguiment. Els 3 casos corresponien a un carcinoma escamós i dos adenocarcinomes que van ser diagnosticats posterior a una citologia de ASCUS VPH positiu, AGC i citologia normal, respectivament. Tal com es mostra a la Taula 6, en pacients entre 21 i 24 anys amb ASCUS/LSIL presenten un risc de CIN3+ del 3% en els posteriors 5 anys, mentre que els casos amb citologia prèvia de HSIL, el risc de desenvolupar CIN3+ i càncer és del 28% i 0% respectivament. En majors de 30 anys i citologia prèvia de HSIL aquest risc de CIN3+ i càncer passa a 47% i 7,3%, respectivament.

Taula 6. Risc acumulat en 5 anys de CIN3+ i càncer segons l'edat i la citologia prèvia segons *Katki i col.* [40]

	Risc de CIN3+			Risc de càncer		
	21-24	25-29	30-64	21-24	24-29	30-64
HSIL	28	28	47	0	2	7,3
ASC-H	16	35	8	0	1,5	2,6
AGC	6,9	14	8,5	1,1	1,1	2,7
LSIL	3	5	5,2	0	0	0,16
ASC-US	3	3,9	2,6	0,032	0,12	0,18
VPH+	4,4	7,1	5,8	0,055	0,16	0,41
VPH -	0,57	0,59	0,43	0	0,018	0,05
NORMAL	0,2	0,36	0,26	0,004	0,027	0,011

Aquestes dades posen de manifest la baixa incidència de càncer de cèrvix per sota els 25 anys i que el cribratge sistemàtic no ha demostrat cap benefici en la reducció de la incidència del càncer de cèrvix [39,77]. El contrari, el cribratge en dones joves comporta a la detecció d'un elevat nombre de casos amb alteracions citològiques menors i infecció del VPH transitòries que comporta a un elevat cost econòmic i emocional derivats del sobrediagnòstic i sobretractament [78,79]. En aquest sentit els nous protocols de la SEGO no recomanen l'inici del cribratge per càncer de cèrvix fins als 25 anys. Abans dels 25 anys s'ha de promoure la prevenció primària del càncer de cèrvix, inculcant mesures de salut destinades a la planificació familiar i prevenció d'altres malalties de transmissió sexual [79].

1.5.2. CONDUCTA SEXUAL

El contagi del VPH es produeix per contacte sexual majoritàriament i el lloc més susceptible d'invasió viral són aquelles on es produeix ràpida replicació i diferenciació cel·lular, com la zona de transformació escamo-columnar del cèrvix. Per tant és lògic pensar que la conducta sexual pot ser un cofactor en el desenvolupament del càncer de cèrvix.

Nombrosos estudis han mostrat que la conducta sexual, específicament el nombre de parelles sexuals és el factor determinant per l'augment de la detecció del VPH, ja que en dones dedicades a la prostitució, la prevalença del VPH està més augmentada: al voltant del 48% a Japó, del 50% a Mèxic i del 61,6% a Espanya [80-82]. Aquestes dones en conseqüent tenen més risc de lesions preinvasives i càncer de cèrvix [83,84]. Tanmateix, l'edat de la primera relació sexual és un conegut factor de risc per la infecció del VPH, ja que la prevalença del VPH més alta es troba en edats immediates a l'inici de les relacions sexuals, i respon a patrons de comportament sexual de la comunitat. En grups d'edat entre 15 i 25 anys, si es tenen diferents parelles sexuals, la infecció pel VPH arriba a tenir una prevalença del 30-40% [85].

Altres estudis epidemiològics en dones d'edats avançada reporten també una forta associació entre les noves parelles sexuals i la incidència d'infecció pel VPH, concloent que un major nombre de parelles sexuals condueix a un major nombre d'infeccions pel VPH, també en dones en edat avançada [86,87].

També s'han descrit com a cofactors de la infecció del VPH, les infeccions cervico-vaginals concomitants que indueixen la inflamació crònica, com és el cas de la *Chlamydia trachomatis* i l'*Herpes simple tipus 2* [88-91]. Recentment s'han començat a descriure associacions entre la vaginosis bacteriana i la infecció pel VPH amb citologia de LSIL [92-94].

1.5.3. PARITAT

Les associacions del càncer de cèrvix i l'alta paritat han estat descrites per varis autors [68, 95] tot i que aquesta relació és ferma, el mecanisme per explicar-ho no està clar. Es suggereix que les dones amb tres o quatre embarassos tenen un risc 2,6 vegades més elevat de càncer que les nul·líparas, i les dones amb set o més parts, presenten un risc de 3,8 vegades major [96]. Les explicacions proposades inclouen el manteniment durant molts

anys de la zona de transformació a l'exocèrvix, fet que pot facilitar l'exposició al VPH. Els factors hormonals de l'embaràs [97] o els traumatismes cervicals durant el part també podrien afavorir la progressió de les lesions [98].

1.5.4. TABAC

El tabac és un dels principals agents carcinogènics coneguts. Les pacients amb VPH positiu i fumadores tenen un risc de 2 a 4 vegades més de desenvolupar CIN3 i càncer de cèrvix que les no fumadores, augmentant el risc amb el nombre de cigarrets per dia i amb l'edat d'inici de fumar [99]. Per altre banda, estudis mostren que deixar de fumar o disminuir el consum de tabac s'ha associat amb un augment de les taxes de regressió de les infeccions del VPH [100,101]. L'associació del consum de tabac amb el càncer de cèrvix en dones amb VPH positiu és biològicament plausible, ja que substàncies carcinogèniques presents en el tabac s'han aïllat de forma consistent en el moc cervical, contribuint a cronificar la infecció pel VPH. Tot i això la dinàmica de la seva interacció en el cicle vital del VPH és poc coneguda [102].

1.5.5. ANTICONCEPCIÓ HORMONAL

La relació entre l'ús *d'anticoncepció hormonal oral (ACHO)* i el risc de càncer de cèrvix és controvertida i complexa. Tot i que el risc de molts altres càncers és menor entre les usuàries de ACHO que en les no usuàries, les taxes de càncer de cèrvix són generalment més altes entre les usuàries. Les revisions sistemàtiques d'estudis epidemiològics observacionals han trobat una associació entre el risc de càncer de cèrvix i l'ús prolongat d'anticonceptius hormonals durant 5 anys o més, encara que el risc tendia a disminuir, però no a desaparèixer, quan deixaven de prendre'ls [103,104]. Encara que l'evidència sigui suggestiva de la relació entre el càncer de cèrvix i ACHO, hi ha altres factors confusos que poden portar a aquesta relació com pot ser la reducció de l'ús del mètode barrera en dones que utilitzen ACHO, la multiparitat, l'edat d'inici de les relacions sexuals, la història familiar, entre d'altres.

Per altre banda, el *preservatiu* s'ha comprovat que és un factor protector i ajuda a promoure la regressió de les lesions intraepiteliais amb l'eliminació del VPH, però no evita de forma total per el contagi ni l'adquisició de les lesions precursors [105-107].

En relació al *dispositiu intrauterí (DIU)* i el VPH, existeix poca literatura al respecte. Destaca el treball de *Castellsagué i col.* [108] en el que es realitza un anàlisi combinat de les dades individuals a partir de 2 estudis a gran escala de l'Agència Internacional per a la Investigació del Càncer i de l'Institut Català d'Oncologia. Es van incloure 2.205 dones amb càncer de cèrvix, 2.214 dones control sense càncer de cèrvix i 15.272 dones sanes de les enquestes del VPH. Després d'ajustar, es va trobar una forta associació inversa entre l'ús dels DIU i en càncer de cèrvix, però no es va trobar associació entre l'ús del DIU i la detecció del VPH en dones que no tenien càncer de cèrvix. Aquestes dades suggereixen que l'ús del DIU podria actuar com un cofactor de protecció en la carcinogènesis cervical. Els autors hipotitzen que la immunitat cel·lular provocada pel dispositiu podria ser un dels diversos mecanismes que podrien explicar els resultats.

1.5.6. IMMUNITAT

L'increment de les lesions associades al VPH en casos de deficiències immunitàries adquirides com la infecció pel VIH, tractaments immunosupressors en receptors de trasplants; o bé, congènites com les respostes immunològiques anormals, els polimorfismes del complex major d'histocompatibilitat (HLA) i del gen supressor tumoral p53, són determinants immunològics de susceptibilitat que promouen el paper del control immunològic sobre el VPH [109-111].

La relació entre els factors immunitaris i l'evolució de les lesions cervicals preinvasives sorgeix a partir de l'observació de la major incidència i taxes de progressió de la malaltia en dones infectades pel VIH [112]. En aquest sentit, un estudi longitudinal realitzat el 2000 va objectivar taxes d'infecció persistent majors en dones VIH respecte a dones sanes (79 versus 48%), així com una major prevalença del VPH en aquelles dones amb recompte de cèl·lules CD4 menor a 200 cèl·lules/mcL en comparació a la resta de dones VIH (93 versus 48%) [113]. Respecte a les lesions preinvasives també es va registrar una incidència significativament major de CIN3+ i CIN2+ en dones VIH positives, respecte dones sanes (5% i 12% versus 2% i 4%) [114]. Una recent revisió sistemàtica de 5882 dones VIH positives va mostrar una incidència mitjana de les lesions cervicals tres vegades major en comparació a dones

VIH-negatives. D'altra banda, la mateixa revisió conclou que l'efecte de la teràpia antiretroviral sobre la història natural del càncer de cèrvix continuava sent poc clara, tot i que la incidència i la progressió de les lesions cervicals augmenten en dones amb un menor recompte de limfòcits T i CD4 [115]. Altres estudis han objectivat una relació entre la major activitat de les cèl·lules T i una menor taxa de progressió de les lesions cervicals preinvasives [116].

Per tant, sembla que la immunitat cel·lular és crítica en el control i aclariment del VPH i, consegüentment en el desenvolupament, persistència i/o progressió de les lesions displàsiques [117].

1.5.6.1. Vacunes del VPH

Demostrat l'origen viral del càncer de cèrvix, es van obrir noves i interessant opcions de prevenció i tractament. Els primers assajos clínics preliminars en humans van començar a la dècada dels 90 amb la síntesis de les partícules semivalents o partícules similars als virus (Virus like particles VLPs) [118]. La major dificultat en la investigació de les vacunes profilàctiques contra el VPH, ha estat la impossibilitat de reproduir el procés de creixement epitelial i diferenciació en cultius cel·lulars, pel que la replicació del virus *in vitro* no ha estat possible. Per tant, en la prevenció primària davant el VPH, s'utilitzen vacunes formades per subunitats virals sintetitzades mitjançant enginyaria genètica [119]. Actualment, gràcies a tot l'esforç, es disposa de vacunes contra el VPH amb les que és possible la prevenció primària del càncer de cèrvix. Aquestes vacunes són efectives pràcticament al 100% per prevenir la infecció pel genotips 16 i 18 i es recomana administrar abans d'iniciar les relacions sexuals.

Actualment, al nostre medi estan comercialitzades, existeixen 2 vacunes profilàctiques:

- Vacuna bivalent VPH16 i 18
- Vacuna tetravalent VPH 6, 11, 16 i 18

En breu s'espera la comercialització d'una vacuna nonavalent ja aprovada per la FDA i que protegirà contra els genotips: VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 [120]. Les vacunes terapèutiques de lesions ja establertes encara es troben en fase encara experimental.

1.6. RESPOSTA IMMUNITÀRIA A LA INFECCIÓ DEL VPH

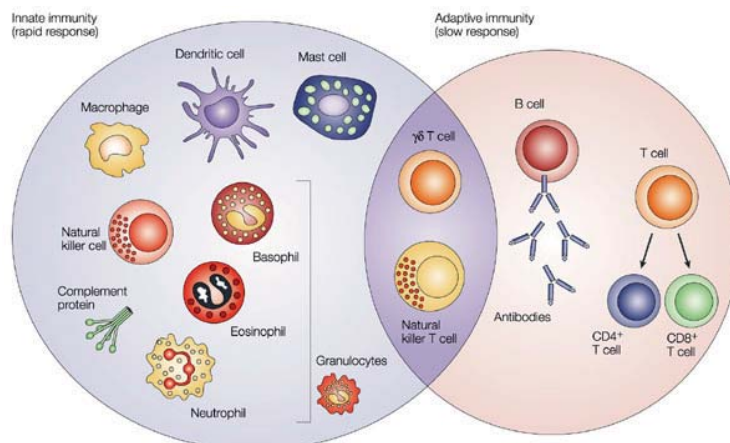
1.6.1. CONCEPTES BÀSICS D'IMMUNOLOGIA

El sistema immunitari és l'encarregat de protegir el cos davant de malalties infeccioses detectant la presència d'agents estranys, destruint-los i generant memòria immunitària amb la finalitat de defensar-se de futures reinfeccions, al mateix temps que manté la tolerància als components del propi organisme. La resposta immunològica també és considerada com un mecanisme de resistència als tumors detectant mutacions espontànies, exposició a carcinògens del medi o activació viral des de la iniciació fins al creixement i progressió [121]. Existeixen dos tipus de resposta (Figura 9):

- El *sistema immunitari innat* que constitueix la primera línia de defensa, utilitza certes estratègies poc evolucionades per provocar una resposta ràpida i general desencadenada per determinades senyals d'infecció. Inclou barreres físiques (epitelis, cilis, fluids, flora bacteriana), químiques (secrecions mucoses, pH, lactoferrina, lisozima), cel·lulars (macròfags, neutròfils, cèl·lules NK) i mediadores (sistema del complement, citocines, reactants de fase aguda). Aquest sistema innat manca d'especificitat i no té memòria.

- El *sistema immunitari adaptatiu o adquirit*, capaç de desenvolupar respostes altament específiques i persistents, a través de la memòria immunològica per atacar la infecció amb una extraordinària precisió. Ambdós sistemes treballen estretament coordinats, i de fet, l'activació del sistema adaptatiu recau en la primera activació del sistema innat.

Figura 9: Representació del sistema immunitari innat i adquirit



Nature Reviews | Cancer

Els responsables principals de la immunitat adquirida són els limfòcits, encarregats d'activar 2 classes de resposta segons el procés que s'origini, encara que ambdós tipus de resposta es complementen i interactuen:

- *Resposta cel·lular*: desencadenada per infeccions intracel·lulars sobretot causades per virus, cèl·lules tumorals produïdes per proteïnes anòmales i macròfags carregats de productes de difícil digestió. En aquest tipus de resposta intervenen principalment les **cèl·lules T** que reconeixen els antígens a través dels seus receptors T (TCR) quan són presentats per les molècules d'Histocompatibilitat (MHC) classe I o HLA. Si reconeixen a un antigen, és una senyal d'infecció o malignitat, i per tant poden induir apoptosi de les cèl·lules diana.

- *Resposta humoral*: s'especialitza en l'eliminació d'antígens presents en la sang o en els teixits i fluids del nostre organisme, com les bacteries extracel·lulars clàssiques, les toxines i els helmints. Aquest tipus de resposta està mediada principalment per **cèl·lules B** que produeixen anticossos, que seran les efectors de la resposta immunitària. Els anticossos poden reconèixer l'antigen directament a través de les immunoglobulines presents a la seva membrana sense necessitat de presentació a través d'un receptor (HLA independents).

1.6.2. EL SISTEMA IMMUNITARI I LES INFECCIONS VÍRIQUES

La relació entre el virus i l'hoste en un procés dinàmic en el qual el virus intenta minimitzar la seva visibilitat mentre que l'hoste intenta prevenir i eradicar la infecció sense efectes colaterals. Al principi el virus ha de reconèixer, unir-se i entrar a la cèl·lula diana, migrant al compartiment cel·lular apropiat. El genoma es transcriu, es tradueix i es replica donant lloc a virions que permeten l'acoplament de les diferents proteïnes. L'exportació dels nous virions permetran que la infecció es pugui estendre a altres cèl·lules i disseminar-se a altres hostes. La majoria dels tipus cel·lulars són capaços de detectar molècules de doble cadena de RNA que es produeixen durant la replicació de molts virus DNA o RNA. La detecció de RNA implica la introducció de citocines antivíriques tals com els IFN tipus I que inhibeixen un o més passos del cicle

víric i contribueixen a activar la resposta immunitària. Altres virus activen ràpidament els macròfags i la secreció d'altres citocines tals com quimiocines i TNF- α . Posteriorment, les citocines recluten leucòcits en el teixit infectat, activen les seves funcions efectores i incrementen l'expressió de molècules MHC perquè puguin ser presentats en la superfície de les cèl·lules infectades. Les cèl·lules que són atretes per les citocines i que constitueixen la primera línia de defensa són els bàsicament els granulòcits i les cèl·lules NK.

Davant la presència viral també s'inicien mecanismes de resposta immunitària adaptativa provocant l'activació dels limfòcits T. Aquesta activació té lloc en els ganglis limfàtics regionals on els antígens han estat transportats per les cèl·lules presentadores d'antígens. Posteriorment els limfòcits T indueixen una diferenciació que desencadenen una resposta cel·lular que desemboca en la secreció de interferó (IFN), el factor de necrosis tumoral (TNF) i interleucines (IL). Conseqüentment s'activa la immunitat humoral o producció d'anticossos específics per antígens vírics que són responsables de prevenir la disseminació i de la resistència a les reinfeccions [122].

En ocasions l'hoste no és capaç d'eliminar completament el patogen, fet que pot desenvolupar una infecció crònica o quedar latent, com és el cas de la infecció del CMV. La persistència de la infecció viral requereix de l'evasió de la detecció i eliminació de les cèl·lules virals per part del sistema immune. Aquests processos d'evasió poden ocórrer per diferents vies; en certs casos els virus presenten antígens de superfície molt variables que condueixen a la síntesis de un excés d'anticossos, no neutralitzats, que poden arribar a interferir amb els que si tenen aquesta capacitat de neutralització. Un altre mecanisme d'evasió s'ha observat en certs tumors en els que la resposta immunitària s'evita mitjançant la depleció de l'expressió de MHC, fet que fa que no siguin reconeguts i no puguin ser atacats.

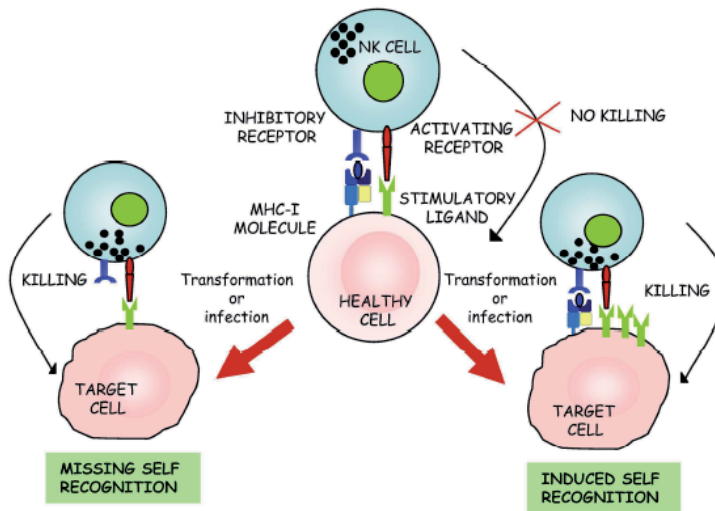
1.6.2.1. Les cèl·lules NK

Les cèl·lules NK són limfòcits amb múltiples capacitats immunològiques, incloent citotoxicitat directa o mitjançant anticossos, producció i resposta a citocines i proliferació clonal a partir dels progenitors limfoides comuns de la medul·la. Les cèl·lules NK formen part de la primera línia de defensa davant

infeccions vials i bacterianes, i cèl·lules tumorals, aparentment sense existir sensibilització prèvia [123,124]. Morfològicament són cèl·lules grans amb abundants grànuls que contenen substàncies citotòxiques. Aquests cèl·lules representen el 10% dels limfòcits en sang perifèrica. Fenotípicament les cèl·lules NK en humans es defineixen com limfòcits CD3⁻ CD56⁺ i tenen varis tipus de receptors. Segons els nivells d'expressió del CD56 es poden diferenciar dos poblacions NK: *CD56dim* i *CD56bright*. Les primeres posseeixen una funció predominantment citotòxica i les segones tenen més capacitat secretora de citocines.

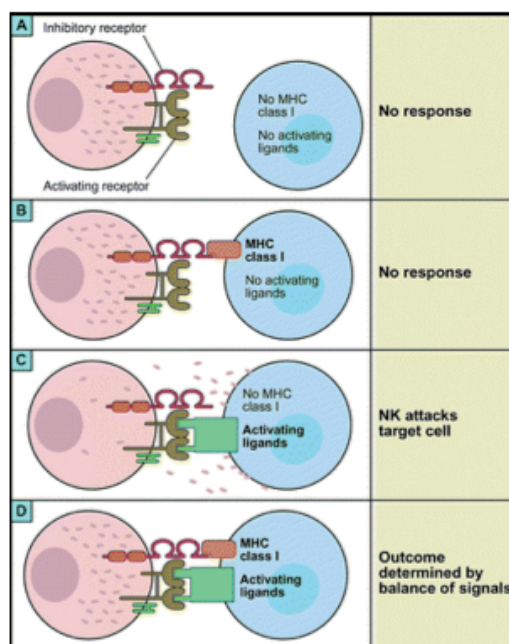
El funcionament de les cèl·lules NK es basa en la hipòtesis del “missing self hypothesis”, descrita pel grup de *Kärre* a finals dels 80 [125], i confirmada posteriorment per altres autors. La hipòtesis suggereix que les cèl·lules NK tenen capacitat per destruir aquelles cèl·lules que han perdut en condicions patològiques l'expressió de molècules del Complex Major d'Histocompatibilitat de classe I (MHC I o HLA) sempre que rebin senals a través dels receptors activadors. Per tal de no atacar les cèl·lules sanes, les cèl·lules NK expressen receptors inhibidors que reconeixen el MHC de classe I de les cèl·lules sanes per induir una senyal d'inhibició a les cèl·lules activadores NK. La interacció amb les molècules del MHC promou la senyalització pels receptors inhibidors que, reprimeixen la funció de l'altre grup de molècules amb funció activadora, evitant així la resposta contra les cèl·lules normals. En canvi les cèl·lules tumorals o infectades per virus, sovint disminueixen la quantitat de molècules MHC de classe I com a mecanisme per evadir el sistema immunitari adaptatiu, i no són capaces d'enviar una senyal d'inhibició potent, i per tant les cèl·lules NK les atacaran i eliminaran. Tot i això, les cèl·lules NK no lisen cèl·lules pròpies com els eritròcits que no tenen molècules MHC de classe I, ni altres tipus cel·lulars que tenen nivells baixos d'expressió d'aquests (ex. hepatòcits, fibroblasts) perquè la cèl·lula diana no presenta lligands per receptors activadors (Figura 10):

Figura 10. Regulació del funcionalment de les cèl·lules NK mitjançant receptors activadors i inhibidors de les cèl·lules NK



Tal i com mostra la Figura 11, les cèl·lules NK poden activar-se i reconèixer patògens per diferents mecanismes: reconeixent directament una proteïna vírica; o mitjançant cèl·lules tumorals o infectades per l'increment de l'expressió o de l'afinitat dels lligands propis per receptors activadors de la cèl·lula NK; o a través de la pèrdua o reducció de l'expressió de les molècules MHC classe I en condicions patològiques [126].

Figura 11: Representació de les possibles respostes entre les cèl·lules NK i la cèl·lula diana segons Lanier [126].



Resumint, es pot concloure que les funcions de les cèl·lules NK estan regulades per un equilibri establert entre els diferents senyals activadores i inhibidores [127]. Els receptors activadors estimulen la citotoxicitat natural i secreció de citocines, mentre que els receptors inhibidors reconeixen principalment les molècules MHC de classe I que protegeixen de l'atac de les cèl·lules NK.

En l'espècie humana les cèl·lules NK presenten tres tipus de receptors inhibidors:

- CD94/NKG2 són glicoproteïnes tipus II formades per dos cadenes de la família de les lecitines tipus C. S'expressen en les cèl·lules NK i en algunes subpoblacions de limfòcits T [128]. La subunitat comú CD94 s'uneix a diferents proteïnes de la família NKG2 [129] permetent el transport i la unió de les molècules NKG2 a la superfície cel·lular. La família NKG2 consta de quatre gens NKG2A, C, E i F. Alguns receptors tenen funció antagònica, de tal manera que per exemple, tot i que NKG2A i NKG2C comparteixen un 94% de la seva regió extracel·lular, al dimeritzar amb CD94 formen un receptor inhibidor i un altre activador, respectivament. Els receptors NKG2A i NKG2C reconeixen la molècula del MHC de classe I HLA E i altres lligands.
- KIR (Killer immunoglobulin-like receptors). Els receptors KIR s'expressen específicament en les cèl·lules NK i subpoblacions de limfòcits T. Hi ha una important variabilitat en la dotació de gens KIR que presenta cada individu, identificant-se diferents haplotips i la seva combinació varia en diferents poblacions; en la població caucàsica, prop del 50% dels individus presenta l'haplotip A [130]. Els receptors KIR amb una regió citoplasmàtica llarga són responsables de la funció inhibidora, mentre que els KIR amb regions curtes són receptors activadors. La interacció entre els receptors KIR i MHC I sembla influir en la resistència a certes infeccions, la incidència de malalties autoimmunes i algunes complicacions de l'embaràs, així com en l'efecte antileucèmic del trasplant de progenitors hematopoètics [131-134].
- ILT/LIR (Immunoglobulin-like transcripts o leucocyte immunoglobulin-like receptors) Es tracta d'un receptor inhibidor específic per molècules

HLA de classe I. S'expressa en subpoblacions de cèl·lules NK i T, així com en limfòcits B i cèl·lules mielomonocítiques [135], el més estudiat és el ILT2/LIR1.

Els principals receptors activadors en les cèl·lules NK són:

- NCR (Natural cytotoxicity receptors) com els NKp46, NKp30, NKp44. Són les principals responsables de la lisis de les cèl·lules tumorals provocada per les cèl·lules NK. Existeix una relació directe entre l'expressió dels NCR i la capacitat de les cèl·lules NK per lisar a cèl·lules tumorals que no expressen molècules de HLA classe I [136].
- NKG2D és una altre molècula tipus lectina, amb molt limitada homologia amb la resta de molècules NKG2 i no s'associa a la molècula CD94 sinó que s'expressa com homodímer en cèl·lules NK, cèl·lules NKT, cèl·lules T i macròfags [137]. El receptor NKG2D interacciona amb varies molècules relacionades amb el HLA classe I induïdes per estrès, així com per infeccions víriques o transformació tumoral [138-142].
- Membres de les famílies KIR i NKG2C, tal i com s'ha explicat anteriorment.

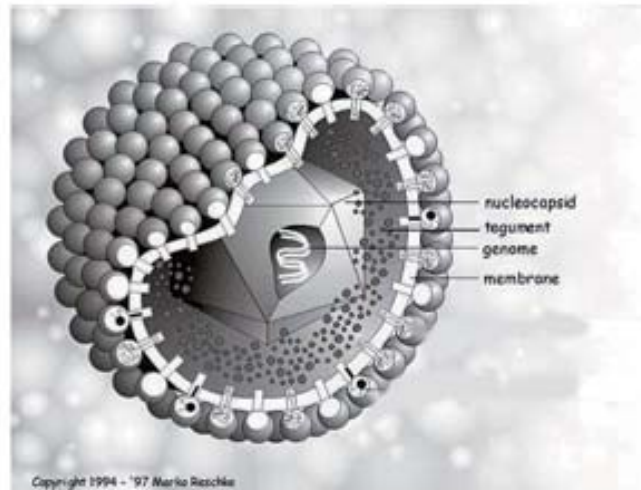
En definitiva es pot afirmar que les cèl·lules NK són un pilar fonamental en la defensa contra les cèl·lules tumorals i les infectades per virus que tenen tendència a perdre l'expressió de molècules MHC I com a mecanisme d'escapament del control dels limfòcits T, el que les fa potencialment susceptibles a ser eliminades per les cèl·lules NK. De fet, en lesions premalignes i malignes provocades per infeccions víriques que s'han cronificat, s'han constatat importants disminucions de l'activitat de les cèl·lules NK [143].

1.6.3. LA INFECCIÓ DEL CMV I LES CÈL·LULES NK INVOLUCRADES EN LA SEVA IMMUNITAT

El citomegalovirus humà (CMV) forma part de la família *herpesvirus* i conté un genoma de DNA de doble cadena lineal. El virió madur conté de 30 a 40 proteïnes i està format per una càpsida proteica icosaèdrica a l'interior del qual es troba el DNA de doble cadena lineal, una matriu proteica anomenada

tegument, i una cobertura lipídica que conté varies glicoproteïnes codificades pel propi virus (Figura 12).

Figura 12: Estructura del viriò del Citomegalovirus humà



La prevalença de la infecció per CMV és molt elevada (55-100%) en funció dels diferents factors socio-econòmics i geogràfics, i sovint s'adquireix a la infància transmesa per secrecions orals [144]. En general la clínica és lleu i passa desapercebuda, encara que pot causar alteracions congènites greus durant l'embaràs. En pacients immunocompetents el quadre habitual és la mononucleosis, febre moderada, hepatitis amb icterícia, miocarditis o anèmia hemolítica associada a trombocitopènia.

El control del CMV depèn de l'acció combinada entre la resposta immunitària innata (cèl·lules NK) i adaptativa (limfòcits T CD4+, CD8+ i B) [145-147]. Com a contrapartida, el virus ha desenvolupat diferents estratègies d'evasió de la resposta immunitària [148,149]. En la primoinfecció per CMV les cèl·lules CD4+ específiques per CMV es fan presents en sang perifèrica als 10 dies de la detecció de DNA víric. Posteriorment, es detecten anticossos específics, i finalment cèl·lules T CD8+ específiques [150]. La participació dels limfòcits T CD4+ durant la resposta primària assegura l'establiment de la població memòria [151]. Les cèl·lules NK semblen jugar un paper important en el control de la infecció, ja que s'ha descrit que els casos de deficiència de cèl·lules NK tenen més susceptibilitat a reinfeccions pel CMV [152].

La resposta immunitària davant aquest virus, és capaç de controlar el patògen però no d'eradicar-lo, mantenint-se latent en els individus

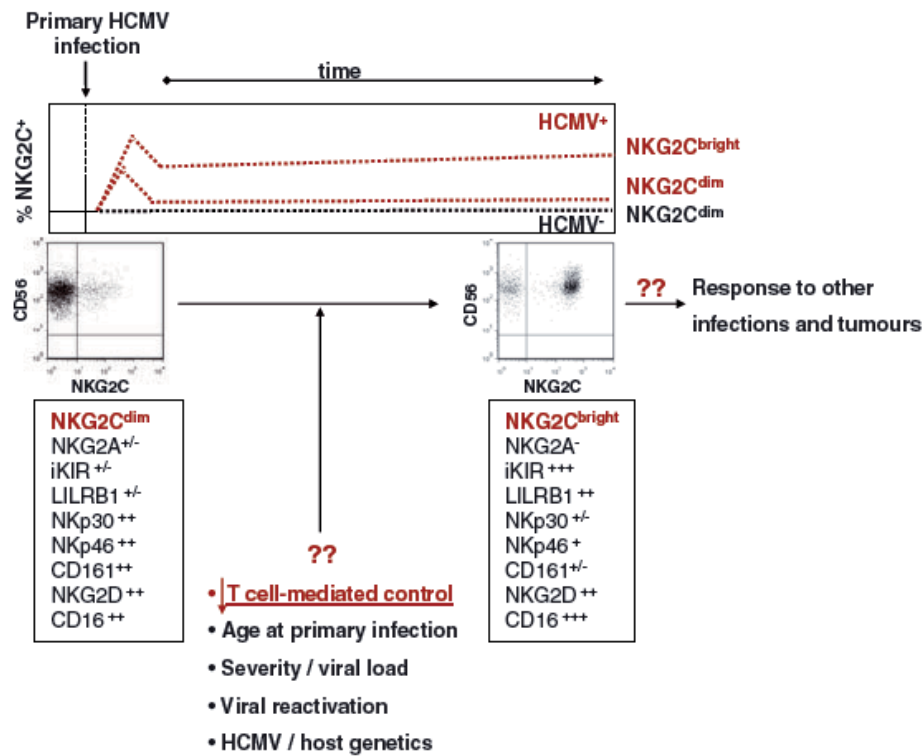
immunocompetents que es convertiran en portadors. En individus sans es pot observar reactivacions ocasionals del CMV amb increments de DNA víric i limfòcits T específics a la sang al llarg de la vida, encara que les reactivacions passin clínicament desapercebudes o cursin com un síndrome febril inespecífic. Aquesta situació de control s'altera en el cas de pacients amb immunodeficiències o sotmesos a tractaments immunosupressors, com els trasplantats, on la reactivació pot causar patologia greu com la pneumonitis intersticial, així com també pot participar en el rebuig crònic de trasplants d'òrgans sòlids.

Per altre part, s'ha proposat que la infecció per CMV pot contribuir també en el desenvolupament d'altres tumors [153] i patologies com l'aterosclerosi [154] i l'esclerosi múltiple [155], i és versemblant que el seu paper depengui de com es desenvolupa la resposta immunitària de l'hoste [156]. En aquest sentit, les cèl·lules NK responen contra les cèl·lules infectades per CMV, que presenten una expressió reduïda de molècules MHC classe I a la seva superfície. Aquest fet s'associa en grau variable a canvis de la distribució dels receptors de les cèl·lules NK (NKR), promovent un increment de les poblacions de cèl·lules NK i limfòcits T que expressen en superfície el receptor activador CD94/NKG2C i inhibició de les cèl·lules NKG2A, així com una expansió de receptors inhibidors KIR i ILT2 (LIR1, CD85j). Per altre banda en subjectes CMV+ també s'observa nivells baixos dels receptors activadors NKp46 i NKp30 [157-160] sense diferències en l'expressió del receptor NKG2D. Tot i això els mecanismes moleculars i de reconfiguració del compartiment de les cèl·lules NK que podrien explicar la sobreexpressió del receptor activador NKG2C per la infecció pel CMV resten desconeguts.

L'impacte del CMV en l'homeòstasi immunitària i la seva contribució a molts canvis relacionats amb l'edat observats en el sistema immunitari, especialment entre les cèl·lules T, han estat objecte d'importants estudis en els darrers anys. Estudis recents de l'equip de d'immunologia de l'Hospital del Mar han documentat l'existència de dos subconjunts de cèl·lules NKG2C+ [161]. El fenotip *NKG2Cbright*, que es troba exclusivament en un subgrup de persones CMV positives (≈50%), les quals es correlacionen amb l'expansió de les cèl·lules NK NKG2C activades. L'altra meitat de pacients CMV+ i tots els

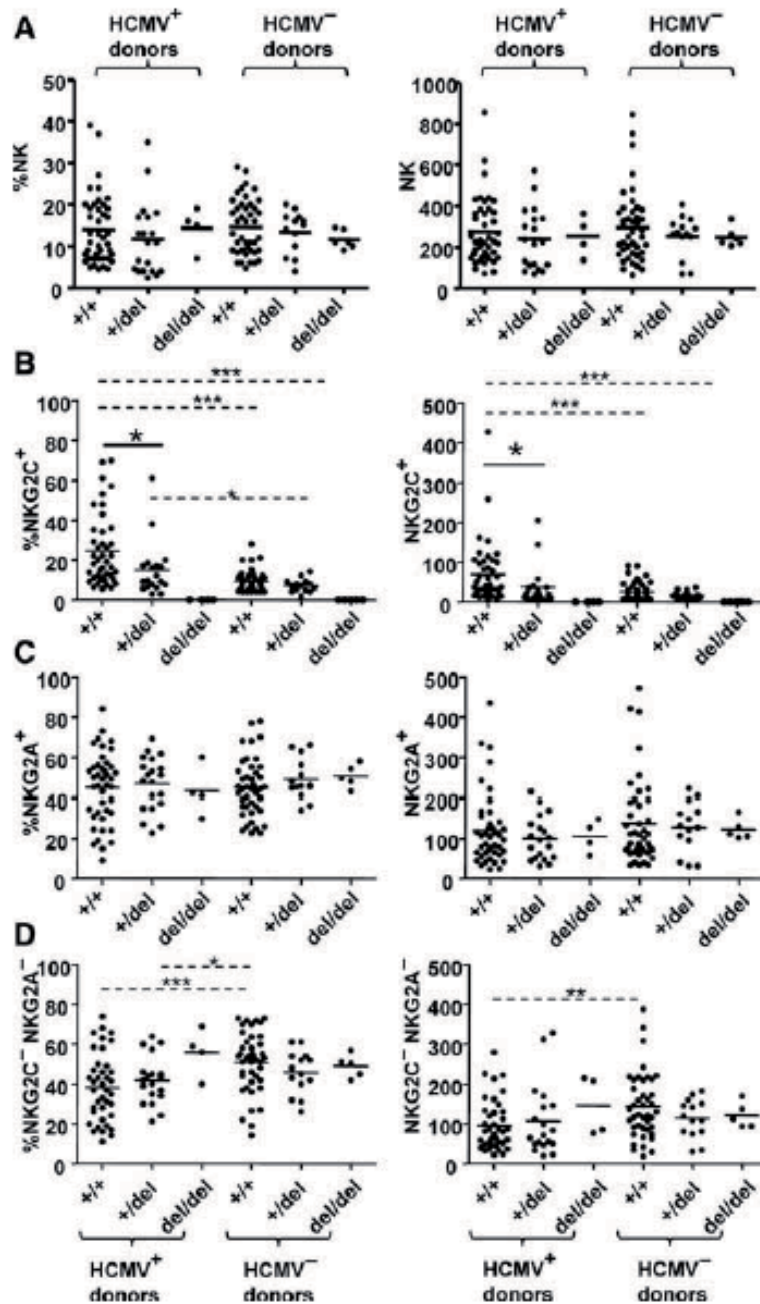
individus CMV negatius, presenten proporcions menors d'expressió de NKG2C, i aquest és el que es considera el fenotip *NKG2Cdim* (Figura 13) [162].

Figura 13: Representació de la reconfiguració del compartiment de les cèl·lules NK en resposta a la infecció del CMV en funció del fenotip del NKG2C [162].



Per altre banda s'ha descrit una zigositat del gen NKG2C existint tres tipus de genotips: els homozigots (NKG2C+/+), els heterozigots (NKG2C+/del) i els doble delecció (NKG2Cdel/del), representant el 66, 26 i 8% de la població respectivament [163,164]. Estudis recents han mostrat que en nens i adults joves homozigots (NKG2C+/+), tendeixen tenir un major nombre absolut i proporció de cèl·lules *NKG2Cbright* en comparació amb els subjectes NKG2C heterozigots (NKG2C+/del) [165]. Aquestes dades recolzen una correlació entre la zigositat NKG2C i la redistribució de les cèl·lules NK en pacients sans CMV positius tal i com es mostra a la Figura 14 [166]. Els factors subjacents a la gran variabilitat d'aquest efecte observat en individus sans CMV positius i exacerbat el pacients immunocompromesos són incerts.

Figura 14: Distribució de les cèl·lules NK en funció del genotipat del NKG2C i de la infecció pel CMV [166].



Es treballa sobre la hipòtesis de que aquestes alteracions podrien afectar la capacitat de resposta NK a altres patògens microbians i tumors, incloent la patologia cervical preinvasiva. Tot i les importants investigacions encara queden molts dubtes a resoldre relacionats amb el CMV i la seva relació amb el sistema immunitari segueix sent una tasca important pels investigadors en el futur [167].

1.6.4. RESPOSTA IMMUNITÀRIA DAVANT LA INFECCIÓ DEL VPH

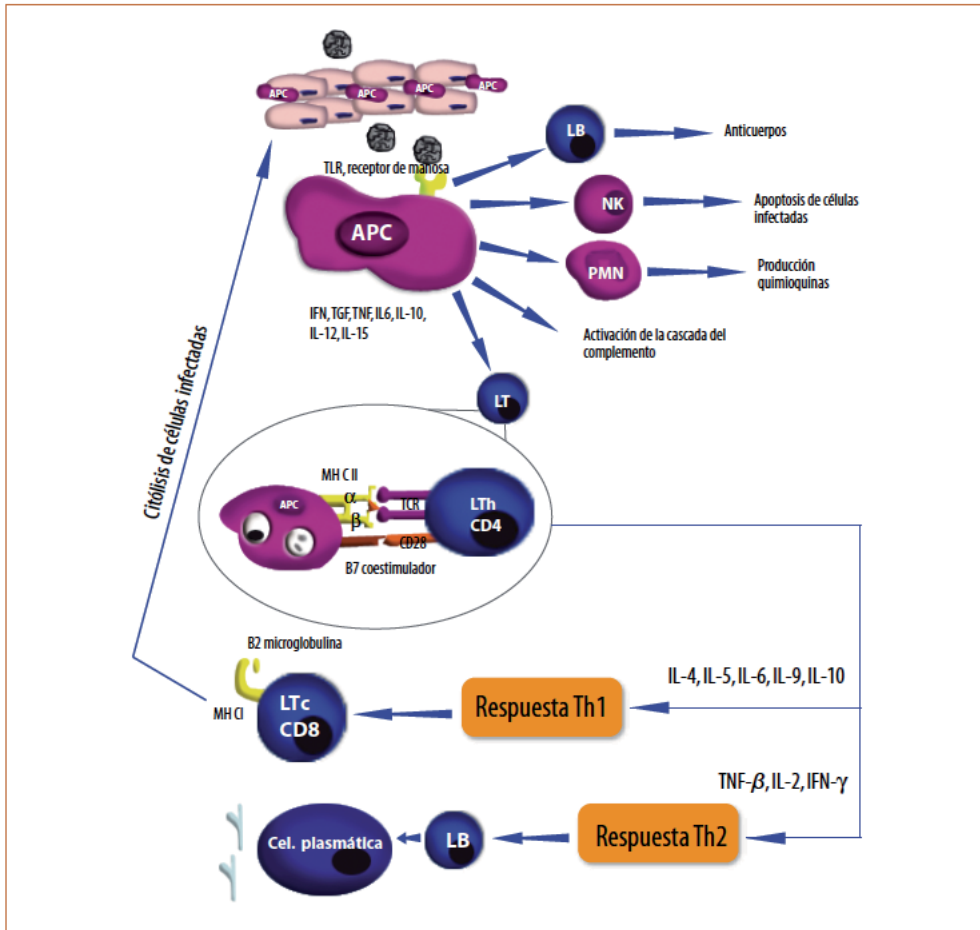
La primera línia de defensa cel·lular davant la primoinfecció de les cèl·lules de l'epiteli cervical pel VPH és el sistema immunitari innat format sobretot per macròfags, cèl·lules de Langerhans, cèl·lules dendrítiques, neutròfils i cèl·lules NK.

En termes generals, després de la primera infecció de les cèl·lules de l'epiteli cervical per VPH es desencadenen una sèrie de respostes inespecífiques acompanyades de processos inflamatoris, quimioatracció de neutròfils, activació de macròfags, intervenció de cèl·lules NK, d'anticossos naturals, i fins i tot del sistema del complement, que formen una primera barrera defensiva d'immunitat inespecífica. En l'epiteli cervical existeixen cèl·lules específiques que posseeixen la capacitat d'actuar com presentadores d'antígens i, encara que alguns queratinòcits desenvolupen aquesta capacitat, són les cèl·lules reticulars de Langerhans i certes cèl·lules plasmàtiques les veritables especialistes en el procés de presentació antigènica.

La iniciació de l'activació de la immunitat específica requereix la presentació en superfície de cadenes polipeptídiques de l'antigen juntament amb HLA de classe II, CD40 i B7, així com la migració als ganglis limfàtics locals. Aquestes cèl·lules activades seran reconegudes per limfòcits T CD4 +, que seran activats únicament si hi ha reconeixement de totes i cadascuna de les molècules de superfície implicades. Aquesta unió dóna com a resultat la inducció de la proliferació dels limfòcits T CD4 + que evolucionaran cap a limfòcits T cooperador (Th) tipus 1 o tipus 2, en funció de una sèrie de factors tissulars locals i la presència de diferents interleucines. La via Th1 que induirà l'activació i proliferació dels limfòcits T CD8 + citotòxics específics (CTL + 8) i la producció d'IL-2 i INF- γ fonamentalment. Contràriament, la via Th2 que induirà l'activació i expansió de limfòcits B, els quals evolucionaran, diferenciant-se, cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'Ac davant les proteïnes virals i s'induirà l'expressió de interleuquines del tipus IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10. Un cop activats, els limfòcits T i B hauran de reconèixer les cèl·lules infectades. Aquest reconeixement tindrà lloc en el context de l'HLA de classe I, en cas contrari no es produirà el procés d'expansió clonal necessari per a l'elaboració d'una resposta immunològica eficaç. Els CTL + 8 tindran la capacitat d'actuar enfront de la infecció viral establerta mentre que les cèl·lules B plasmàtiques produiran

anticossos que actuaran davant dels antígens virals d'origen extern que siguin exposats durant aquesta i les successives infeccions per VPH (Figura 15) [168,169].

Figura 15: Resposta immunitària davant la infecció pel VPH segons *Rincon i col.* [169]



La persistència de la infecció pel VPH requereix l'evasió de la detecció i l'eliminació de les cèl·lules víriques pel sistema immunitari. Durant el desenvolupament del càncer de cèrvix s'indueixen varis mecanismes per evadir el sistema immunitari innat i adaptatiu. Aquests processos d'evasió poden produir-se per diferents vies. En certs casos, els virus presenten antígens de superfície molt variables que condueixen a la síntesis d'un excés d'Ac no neutralitzats que poden arribar a interferir amb els que sí tenen aquesta capacitat de neutralització. Un altre mecanisme d'evasió descrit és la depleció de l'expressió de molècules del MHC, la disminució de l'expressió de molècules específiques de reconeixement immune, o bé agafen com a diana a cèl·lules

immunocompetents com les CD4+ i les cèl·lules de Langerhans, comprometent així l'eliminació de la infecció per l'alteració dels mediadors de la resposta immune [170]. Com a conseqüència d'això, l'estimulació dels limfòcits T, les cèl·lules NK i els macròfags és deficient. La regulació a la baixa induïda o adquirida deteriora la immunitat innata i adaptativa, respectivament, el que afavoreix la persistència del VPH i el desenvolupament del càncer de cèrvix.

Per induir una resposta immunitària efectiva contra el tumor es requereix l'estimulació simultània de múltiples components del sistema immunitari: per via sistèmica l'estimulació de limfòcits T específics contra el VPH; i a nivell local, mitjançant la inducció de la secreció de citocines pel tumor, per augmentar l'estimulació de limfòcits T, cèl·lules NK i macròfags. La producció *in situ* de citocines per les cèl·lules tumorals permet obtenir efectes proinflamatoris, inflamatoris i quimiotàctics a nivell local, que promou la angiogènesis, el creixement i la supervivència del tumor [171]. La infiltració leucocitària com a conseqüència de la producció d'aquestes citocines, pot modular la disseminació del càncer, ja sigui promovent-lo (dany oxidatiu de l'ADN) o bé inhibint-lo (Natural Killer, Limfòcits T citotòxics) [172]. En un estudi que determinava la quantitat, distribució i intensitat de LT CD4+, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules NK en teixits cervicals normals, amb lesions de CIN i amb càncer de cèrvix es va observar que el nombre de cèl·lules immunitàries s'anava incrementant gradualment amb la progressió del CIN, però disminuïen a nivell local en pacients amb càncer de cèrvix, essent màxima l'expressió de NK en la lesió del CIN3 [173]. En pacients amb càncer de cèrvix s'ha reportat una disminució de l'expressió tan de limfòcits T com de cèl·lules NK. La funció d'aquestes cèl·lules està alterada en tots els estadis, ja que un cop infectades pel VPH, les cèl·lules es tornen resistents a la lisis [174]. Aquest fet podria indicar que la funció immunitària cervical local canvia a mesura que progressa la malaltia, identificant un dèficit de cèl·lules immunitàries en estadis avançats.

1.6.4.1. Acció de les cèl·lules NK contra el VPH

Les cèl·lules NK són les encarregades de la resposta immunitària innata proporcionant una primera línia de defensa a les mucoses. En aquesta resposta innata participen múltiples senyals parcialment específiques de

reconeixement de molècules estranyes, sense la necessitat d'anticossos específics ni cèl·lules presentadores. Així mateix, les cèl·lules NK posseeixen la capacitat d'induir la apoptosi de cèl·lules tumorals o infectades per virus gràcies a receptors als activadors i inhibidors dels receptors killer (KIR). Les cèl·lules normals que expressen abundants molècules de HLA de classe I són reconegudes per KIR i inhibeixen l'activació de les NK; en canvi en cèl·lules infectades per virus i cèl·lules tumorals que evadeixen l'activació de la resposta immunològica de les cèl·lules T per haver perdut el complex HLA de classe I, produeixen l'activació de les cèl·lules NK i indueixen la citòlisis [175,176]. Aquest fet fa biològicament plausible plantejar el possible efecte beneficiós de les cèl·lules NK en l'evolució de la patologia cervical preinvasiva. Alguns estudis han relacionat l'associació entre una deficiència en la funció de les cèl·lules NK i una major susceptibilitat a infeccions virals i un augment de la incidència de càncer d'ovari, endometrial i endometriosis [177-179]. De la mateixa manera, s'han constatat disminucions importants en l'activitat de les cèl·lules NK, com funcions de la immunitat inespecífica en lesions pretumorals i tumorals [180]. Entre els que destacaria el del grup de *Daneri-Navarro i col.* [181,182], que descriu que la regulació a la baixa de les cèl·lules NK, determinat per una menor expressió dels receptors NKp30, NKp46 i NKG2D, es produïa amb més freqüència en pacients diagnosticades de càncer de cèrvix en relació a dones amb patologia preinvasiva CIN2/3 i CIN1, respectivament. Tot i tractar-se d'estudis transversals, les seves troballes suggeririen que aquesta baixa activitat de les cèl·lules NK seria un mecanisme d'evasió del VPH que podria jugar un paper causal en la progressió de la malaltia.

Tot i que la infecció pel VPH en l'epiteli cervical és una de les més freqüents malalties de transmissió sexual, només una petita proporció de dones són incapaces d'eliminar el virus i per tant desenvolupen lesions cervicals precursors de càncer de cèrvix conegudes com a CINs. La probabilitat de que la infecció del VPH persisteixi i es converteixi en càncer de cèrvix és el resultat de la combinació de varis factors tals com el genotipat viral i les característiques immunològiques de l'hoste.

La identificació dels factors de susceptibilitat tindria l'avantatge d'identificar aquells pacients amb una major probabilitat de desenvolupar

lesions preinvasives o càncer de cèrvix després d'una infecció pel VPH per tal de proporcionar un enfocament òptim per aclarir aquest escenari tant complex.

S'ha descrit que el triatge de les lesions de CIN2 constitueix un interessant camp d'estudi degut a les importants implicacions clíniques i pronòstiques. Les pacients amb CIN2 són sotmeses a un nombre d'exploracions invasives que en la majoria dels casos semblen ser innecessaris. La possibilitat de detectar aquelles pacients que realment tenen un risc real de desenvolupar un CIN3 o càncer invasor, permetria adequar de manera molt més individualitzada les decisions de maneig diagnòstic i terapèutic en aquests casos.

2. HIPÒTESI

La Neoplàsia Intraepitelial Cervical (CIN) és una lesió precursora del càncer de cèrvix. La seva història natural s'inicia a partir de la infecció pel virus del papil·loma humà (VPH) [19]. Existeixen múltiples cofactors que poden modular la capacitat de regressió/progressió espontània del CIN, encara que no es coneixen factors clínicament útils per poder predir la seva evolució. El CIN2 és una entitat definida entre el CIN1 i el CIN3 amb unes taxes de regressió espontània del 40-60% i de progressió del 10-20% descrites a la literatura [49-51]. El maneig habitual de les lesions de CIN2 és la conització, però les actuals guies proposen una actitud conservadora en pacients seleccionats per tal d'evitar el sobre-tractament i la morbiditat derivada dels mateixos [41,66]

Entre els diferents marcadors que poden predir l'evolució de les lesions de CIN2, proposem estudiar les cèl·lules NK. Aquestes cèl·lules tenen la capacitat d'eliminar cèl·lules tumorals o infectades per virus que han perdut l'expressió de les molècules del Complex Major d'Histocompatibilitat de classe I (MHC I) i no poden ser reconegudes per la resposta immunològica de les cèl·lules T.

La hipòtesis d'aquesta tesi planteja que els nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK de les pacients amb lesions de CIN2 podrien estar relacionats amb la seva evolució.

3. OBJECTIUS

3.1. OBJECTIU PRINCIPAL:

- DEMOSTRAR la relació entre els nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en sang perifèrica i l'evolució de les lesions de CIN2.

3.2. OBJECTIUS SECUNDARIS:

- DEFINIR les taxes de curació, regressió, persistència i progressió de les lesions de CIN2 al nostre medi.

- IDENTIFICAR possibles factors de risc epidemiològics de progressió de les lesions de CIN2.

- VINCULAR la distribució dels genotips del VPH causants de les lesions de CIN2 amb la seva posterior evolució.

- RELACIONAR l'evolució de les lesions de CIN2 amb la citologia prèvia al diagnòstic.

- ANALITZAR els cofactors que poden modificar la distribució dels receptors de les cèl·lules NK en la població estudiada.

- CONFIRMAR la influència de la infecció del CMV en la distribució dels receptors de les cèl·lules NK en les pacients amb lesions de CIN2.

- AVALUAR l'adequació dels criteris mèdics d'exclusió per valorar el maneig conservador de les pacients amb lesions de CIN2.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. DISSENY DE L'ESTUDI

Es va dissenyar un estudi prospectiu observacional que va incloure les pacients diagnosticades mitjançant biòpsia colpo-dirigida de lesions CIN2 a l'àrea de referència de l'Hospital del Mar de Barcelona, que complien els criteris d'inclusió i exclusió resumits a la Taula 7.

CRITERIS D'INCLUSIÓ:

- Dones igual o majors de 18 anys d'edat
- Diagnòstic histològic de lesions exocervicals de CIN2
- Colposcòpia satisfactòria amb una lesió totalment visible que no afecti endocèrvix.
- Pacients amb una bona comprensió de la seva patologia i de les diferents opcions de tractament i acceptin realitzar un maneig conservador amb seguiment estricte durant 2 anys,
- Signant el consentiment informat del maneig conservador

CRITERIS D'EXCLUSIÓ

- La pacient prefereix realitzar la conització
- Antecedent de tractaments cervicals previs
- Colposcòpia no satisfactòria
- Citologia prèvia amb atípia de cèl·lules glandulars (ACG)
- Biòpsia endocervical de CIN2,
- Pacients immunodeprimides o que estiguin realitzant algun tractament immunosupressor
- No possibilitat de seguir controls durant 2 anys

Taula 7: Criteris d'inclusió i exclusió del maneig conservador del CIN2

Criteris d'inclusió	Criteris d'exclusió
Edat \geq 18 anys	Tractament cervical previ
Biòpsia exocervical de CIN2	Biòpsia endocervical de CIN2 Citologia prèvia amb atípia glandular
Colposcòpia satisfactòria	Immunosupressió
Signar consentiment informat de l'estudi	Preferència de realitzar la conització
Seguiment durant 2 anys	No possibilitat de seguiment durant 2 anys

El **càlcul del tamany mostral** estimant una regressió del CIN2 del 40% va ser de 79 pacients. Considerant possibles pèrdues durant l'estudi es va decidir incloure finalment unes 100 pacients, de les quals es van recollir totes les dades epidemiològiques i anatomo-patològiques, i es van quantificar els receptors de les cèl·lules NK en sang perifèrica. Durant l'estudi es va portar a terme un anàlisi intermig de seguretat el primer any de seguiment, per valorar suspendre l'estudi si es detectava una taxa de progressió major del 30% (10% més de la taxa de progressió descrita a la literatura).

4.2. RECLUTAMENT I SEGUIMENT DE LES PACIENTS

Entre desembre del 2011 a octubre del 2013 es va dur a terme el reclutament de pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 que complien els criteris d'inclusió. Aquest reclutament va ser dut a terme pels ginecòlegs del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital del Mar, Barcelona.

Totes les pacients van ser informades del resultat, significat, pronòstic i tractament habitual de la lesió del CIN2 mitjançant la conització o la opció de realitzar un maneig conservador durant 2 anys en el marc de l'estudi actual. A la visita s'informava dels avantatges i inconvenients de cada una de les opcions, s'entregava un full informatiu dels objectius i metodologia del projecte i, en cas d'acceptació, la pacient signava el Consentiment Informat (Annex 2).

A la primera visita es realitzava:

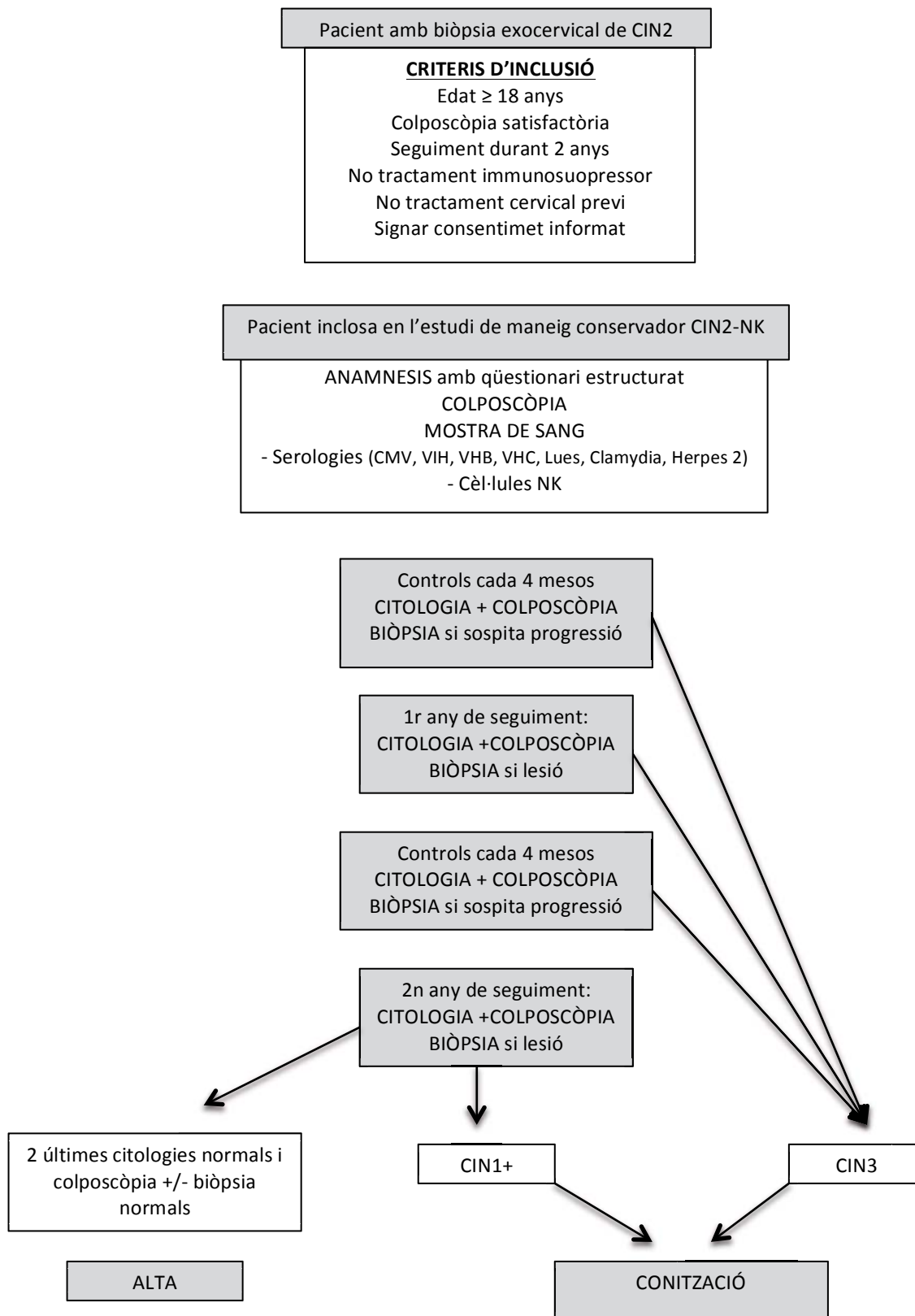
- Anamnesis dirigida utilitzant un qüestionari estructurat (Annex 3)
- Exploració física i ginecològica especialitzada
- Obtenció una mostra sanguínia basal per estudiar el nivell de cèl·lules NK i les serologies (VIH, CMV, VHB, VHC, Lues, Herpes tipus 2, Chlamydia trachomatis)

Posteriorment es citava a la pacient pels següents controls quadrimestrals fins a completar els 2 anys de seguiment. A cada visita es realitzava exploració colposcòpia i citologia. Només es realitzava biòpsia al complir el primer any de seguiment i en qualsevol moment si es sospitava progressió.

La conització es duia a terme a totes pacients en el moment del diagnòstic histològic de CIN3, i a aquelles dones amb lesions presents al finalitzar els 2 anys de seguiment (Algoritme 1).

En qualsevol moment, la pacient podia deixar l'estudi si ho desitjava.

Algoritme 1: Reclutament i seguiment de les pacients a l'estudi



4.3. VARIABLES

Les variables de l'estudi es van avaluar i van ser especificades en la fulla de recollida de dades, individualitzada per cada pacient, i poden ser classificades en diversos àmbits:

- SOCIO-DEMOGRÀFIQUES: Es van recollir utilitzant el qüestionari estructurat a la primera visita, tenint en compte l'edat, l'ètnia, el mètode anticonceptiu, el consum de tabac, la paritat o si havien quedat gestants durant l'estudi.

- BIOLÒGIQUES:
 - SEROLOGIES A totes les pacients incloses a l'estudi es va recollir una mostra de sang per estudiar les serologies (Virus Herpes Simple 2, VHB, VHC, VIH, CMV, *Treponema pallium*, *Chlamydia trachomatis*), identificant infeccions antigues o actuals a través de la IgG i IgM. Es va considerar una infecció positiva o negativa en funció dels valors establerts pel laboratori de referència. En el cas de la Clamídia, a més d'analitzar la IgG, també es van estudiar els nivells de IgA que representava una infecció aguda, crònica o recurrent.

 - GENOTIPAT DEL VPH segons el mètode COBAS

 - CITOLOGIA prèvia a la biòpsia de CIN2 es va classificar segons la terminologia Bethesda [7] posteriorment es va realitzar un subanàlisis agrupant les citologies en *noHSIL* (incloent les citologies Normals, ASC-US, LSIL i ASC-H) i *HSIL* (incloent les citologies de HSIL)

 - CÈL·LULES NK. Els receptors estudiats va estar: NKG2A, NKG2C, NKG2D, ILT2 i KIR, que formen part del protocol d'estudi bàsic de les cèl·lules NK. Mitjançant el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK, es va estudiar el balanç d'activitat de les cèl·lules NK. Donat que la infecció per *CMV* comporta a una reconfiguració del compartiment de les cèl·lules NK, posteriorment es va realitzar un subanàlisis en funció de la seropositivitat de la infecció del *CMV*.

També es va estudiar el *genotip de NKG2C* en funció del CMV, definint les pacients en:

- Homozigot (NKG2C+/+)
- Heterozigot (NKG2C+/del)
- Doble deleció (NKG2Cdel/del)

- TERAPÈUTIQUES:

- BIÒPSIES O PECES DE CONITZACIÓ: Es va considerar el diagnòstic final la lesió que informava de més alt grau.

Les dades es van recopilar en una base de dades, especialment dissenyada per aquest estudi, de manera que posteriorment va ser analitzada.

4.4. DEFINICIONS

L'**evolució de la lesió del CIN2** es va classificar en els següents termes (Taula 8):

- *Regressió total* si presenten 2 controls consecutius normals al final de l'estudi, és a dir, 2 citologies sense patologia i no evidència de lesió a la colposcòpia ni a la biòpsia si es va realitzar. Aquestes pacients eren remeses per controls anuals en el Centre de Referència.
- *Regressió parcial* si continuava amb lesió al finalitzar l'estudi i la biòpsia diagnòstica-terapèutica informava de CIN1.
- *Persistència* si continuava amb lesió al finalitzar l'estudi i la biòpsia diagnòstica-terapèutica informava de CIN2.
- *Progressió* si al finalitzar l'estudi o en qualsevol moment del seguiment presentava una biòpsia diagnòstica de CIN3 o Carcinoma invasor.

Al finalitzar els 2 anys de seguiment, aquelles pacients que no s'havien curat totalment i que continuaven amb lesió citològica, histològica i/o colposcòpia van ser sotmeses a conització. La lesió de més alt grau, ja sigui la biòpsia prèvia o la peça de conització va ser considerada com a diagnòstic final.

Taula 8: Definició de l'evolució de les lesions de CIN2 i actitud a seguir a l'estudi

DEFINICIÓ		ACTITUD
REGRESSIÓ TOTAL	- 2 citologies consecutives Normals	Seguir estudi Alta al finalitzar l'estudi i seguir controls al centre de referència.
REGRESSIÓ PARCIAL	- Biòpsia de CIN1	Seguir l'estudi Biòpsia el 1r any
PERSITÈNCIA	- Biòpsia de CIN2	Conització al final de l'estudi
PROGRESSIÓ	- Biòpsia de CIN3	Conització en el moment del diagnòstic

Les pacients que van ser incloses a l'estudi i no van seguir el protocol establert perquè van preferir sortir de l'estudi o no podien continuar el seguiment, es van considerar com a pèrdues durant l'estudi, per tractar-se d'un estudi observacional.

Els resultats del **genotipat del VPH** d'alt risc pel mètode Cobas es van definir en:

-VPH16: pacients amb detecció del VPH 16, independentment de la presència d'altres tipus de virus d'alt risc

-VPH18: pacients amb detecció del VPH 18, independentment de la presència d'altres tipus de virus d'alt risc

-VPHno16no18: pacients amb detecció del VPH d'alt risc, excloent les pacients amb coinfeccions pel VPH16 i/o el VPH18.

-VPH negatiu: pacients a les que no es detectava cap VPH d'alt risc.

4.5. ANÀLISIS DE LES MOSTRES BIOLÒGIQUES

4.5.1. ANALISIS DE LES MOSTRES ANATOMO-PATOLÒGIQUES

Totes les mostres citològiques van ser preses amb el pinzell Cervex-Brush (de Dispositius Mèdics Rovers, Oss, Països Baixos) per la citologia en base líquida utilitzant un vial de ThinPrep amb 30 ml de PreservCyt (Hologic, Marlborough, MA, U.S.A.). En el mateix vial de la citologia inicial es va realitzar

l'anàlisi patològic i es va identificar el VPH mitjançant el test "Cobas 4800 HPV test" (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA), tècnica PCR que permet la detecció de 14 genotips del VPH d'alt risc, identificant per separat el VPH tipus 16 i 18. El resultat de la citologia és va reportar segons la terminologia Bethesda [7]. La informació obtinguda amb el mètode COBAS i la citologia prèvia no es van utilitzar per la presa de decisions clíniques.

Les mostres histològiques obtingudes a partir de les biòpsies dirigides per colposcòpia, es va col·locar en vials amb solució de formalina el 10% i es van processar amb parafina per l'anàlisi i emmagatzematge, seguint els protocols estàndards de l'Hospital del Mar. Es van classificar les lesions histològiques tenint en compte l'afectació nuclear i l'extensió epitelial (CIN1/CIN2/CIN3).

4.5.2. ANÀLISIS DELS RECEPTORS DE LES CÈL·LULES NK

De cada pacient inclosa en l'estudi s'obtenien uns 50ml de sang perifèrica heparinitzada correctament etiquetada pel processament posterior.

Mitjançant la dilució de sang amb un polisacàrid hidrofílic altament ramificat (Ficol) i la centrifugació s'aconseguia un gradient de densitats que permetia criopreservar les cèl·lules mononuclears en sang perifèrica entre les quals es troben les cèl·lules de les NK. En un segon temps, es realitzava l'anàlisi dels receptors de les cèl·lules NK en sang total mitjançant tècniques d'immunofluorescència i citometria de flux, amb la finalitat d'identificar i quantificar l'expressió de les cèl·lules NK segons protocols estandarditzats que es detallen a continuació.

4.5.2.1. Criopreservació les cèl·lules mononuclears en sang perifèrica

La població de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMCs) està formada per monòcits i limfòcits com les cèl·lules T, cèl·lules B i cèl·lules NK, que són un component crític del sistema immunològic. Les PBMCs són àmpliament utilitzades en la investigació i la clínica com a monitoratge del sistema immunitari. La separació de PBMCs de la resta de components de la sang es du a terme habitualment a través de la centrifugació en gradient de

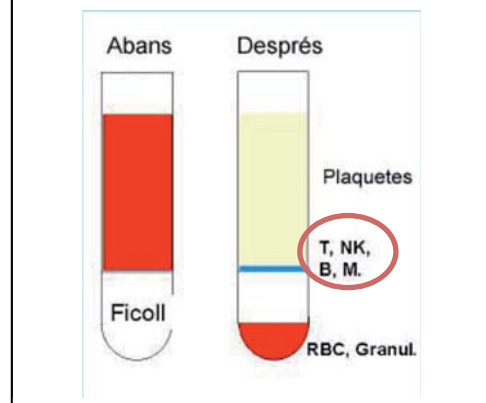
densitat [183]. Els passos per realitzar aquest procediment estan descrits a l'Annex 4 i es resumeixen a continuació.

En primer lloc es va transferir la sang de cada tub de recollida (4 tubs heparinitzats) en un tub de 50 ml i es va diluir la sang amb PBS (dilució 1:1). La sang diluïda es va afegir sobre un mitjà de Ficoll, obtenint una clara separació dels 2 medis abans de la centrifugació (Figura 16).

Seguidament es va decantar el volum plasmàtic i es va recollir l'anell de PBMCs que es va transferir a un nou tub, afegint PBS i centrifugant la mostra fins obtenir un sobrenedant transparent.

Finalment es va tenyir la mostra amb blau tripà sobre una càmera de Neubauer per poder realitzar el comptatge cel·lular de limfòcits en un microscopi. Un cop es va realitzar el comptatge es van repartir les cèl·lules totals en 4 criotubs diferents amb medis d'emmagatzematge i aquests es van criopreservar dins un recipient amb isopropanol a un congelador a -80°C durant un mínim de 12 hores pel seu posterior estudi.

Figura 16. Separació de PBMCs mitjançant la centrifugació en gradient de densitat utilitzant el Ficoll



4.5.2.2. Citometria de flux

L'estudi de les diferents subpoblacions limfocitàries es va realitzar mitjançant la citometria de flux que consisteix en un anàlisi ràpid de cèl·lules en suspensió dins un sistema de flux laminar, sobre el que incideix un feix de llum que proporciona informació sobre les seves característiques físico-químiques.

Els passos realitzats per la preparació de les mostres i el seu marcatge està descrit a l'Annex 5 i es resumeixen a continuació. Inicialment les cèl·lules van ser pre-tractades amb concentracions de saturació d'immunoglobulina humana agregada per bloquejar els receptors Fc lliures. A continuació es va realitzar una tinció indirecta amb els anticossos primaris monoclonals: Anti-myc (control negatiu), anti-NKG2A, NKG2C, NKG2D, ILT2 i KIR. Tot seguit es va

afegir anticòs secundari directe marcat amb ficoeritrina (PE). Després de 3 rentats per eliminar l'anticòs secundari lliure en suspensió, es va fer la tinció directe amb anti-CD3-PerCP (proteïna clorofil peridina) i anti-CD56-APC (aloficocianina).

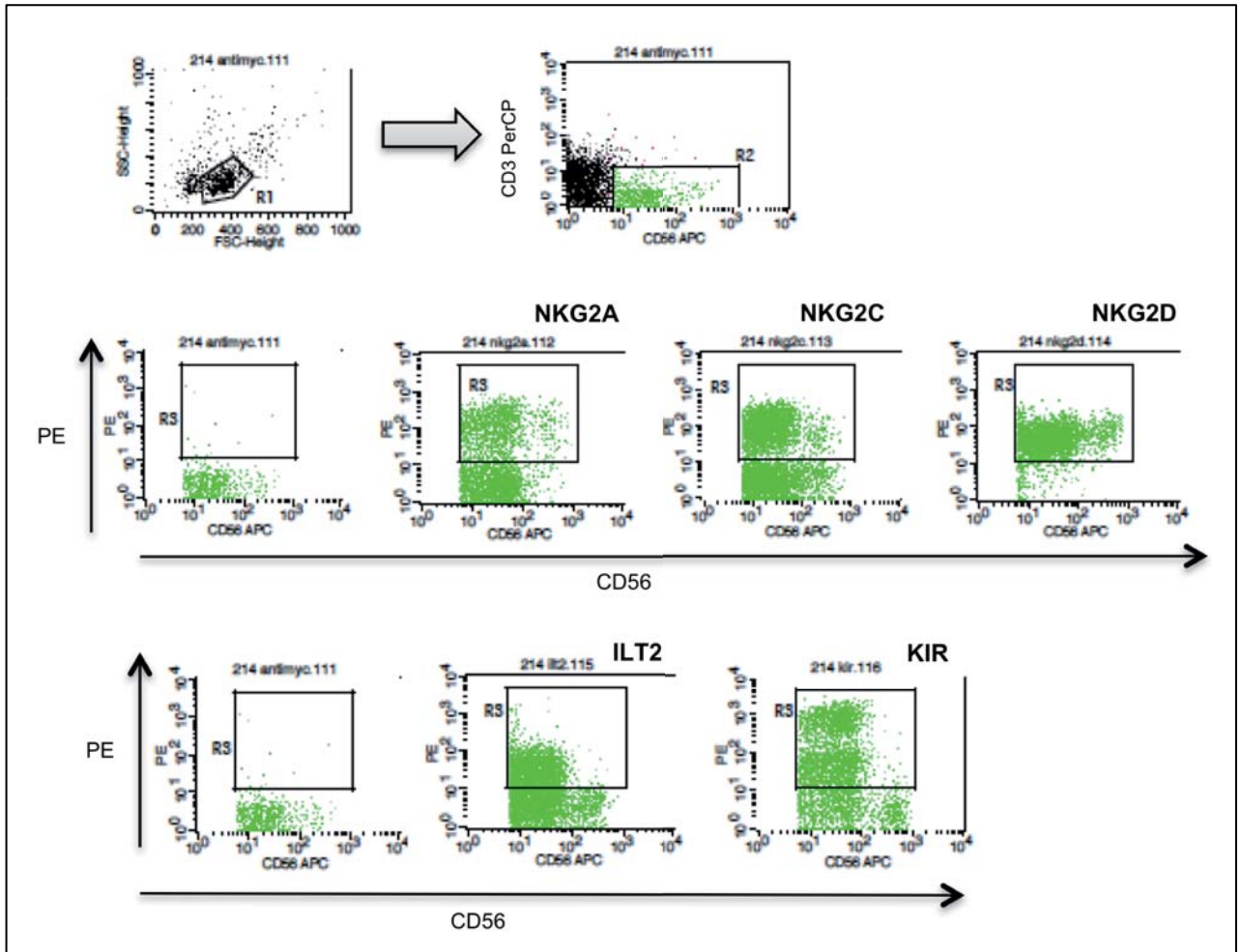
Els anticòs anti-CD3 reconeixen les molècules de la superfície cel·lular que forma part del complex del receptor de cèl·lules T, absent en cèl·lules NK. L'anticòs anti-CD56 reconeix una molècula present a les cèl·lules NK.

Finalment la fluorescència de les mostres va ser analitzada per citometria de flux (FACs Calibur; Becton Dickinson) mitjançant el programari CellQuest Pro (BD Biosciences), per tal de quantificar el percentatge de cèl·lules NK que expressen els diferents receptors que defineix cada població de cèl·lules NK en sang perifèrica de cada pacient.

En l'anàlisi d'expressió de receptors en la citometria de flux, es va realitzar una estratègia de selecció (gating strategy), filtrant primer les cèl·lules linfoitàries segons el seu tamany, després les CD3 negatives – CD56 positives corresponent a les cèl·lules NK, i posteriorment quantificant la proporció de cèl·lules NK que expressa els diferents receptors. Es va registrar el percentatge d'expressió de receptors NKs a partir del control negatiu, tal i com es mostra a la Figura 17.

A les taules dels resultats es mostra el percentatge de cèl·lules NK sobre la població de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica i la proporció de cèl·lules NK que expressa cada una de les poblacions en funció dels seus receptors.

Figura 17: Estratègia de selecció cel·lular i anàlisi de l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK



4.5.2.3. Genotipat del NKG2C

El genotipat de NKG2C es va avaluar mitjançant una tècnica de PCR aïllant l'ADN a partir de la sang, segons descriu *Moraru i col.* [184]. Resumint, els exons de HLA-E 2 i 3 van ser amplificats, i es va analitzar el codó 107 per seqüenciació de l'ADN utilitzant BigDye Terminator v.3.1 Cycle sequencing kit i la seqüenciació automàtica 3100 ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.6. ANÀLISIS ESTADÍSTIC

En primer lloc es va realitzar un anàlisi descriptiu de les característiques clínicopatològiques de les pacients calculant les mitjanes i les desviacions

estàndard per les variables quantitatives, i freqüències i percentatges per les qualitatives.

Es va realitzar el test de Xi-quadrat de Pearson o el test exacte de Fisher, segons era apropiat, per l'anàlisi de la relació entre variables categòriques. El test de T-student o U-Mann Withney es va utilitzar per calcular variables quantitatives segons la variable. Es va aplicar el test de Krusal-Wallis per comparar variables quantitatives amb més de 2 variables categòriques per descriure l'evolució de les lesions en les 4 categories.

Es va estudiar el temps fins la progressió o curació mitjançant un anàlisi de supervivència de Kaplan-Meier, aplicant el test Long-Rank per comparar les supervivències segons la presència dels diferents genotips.

Finalment es va realitzar un model multivariant calculat mitjançant un mètode jeràrquic fins assolir el millor model predictiu final.

Es va assumir la significança estadística amb un valor de p inferior a 0,05.

Tots els anàlisis es van realitzar amb el programa estadístic SPSS Versió 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) per MacOSX.

4.7. CRONOGRAMA

- FASE 1 (Octubre 2011)
 - Presentació del projecte a l'equip investigador i disseny de circuits
 - Aprovació pel Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica
- FASE 2 (Desembre 2011)
 - Sessió informativa als ginecòlegs dels centres implicats
- FASE 3 (Desembre 2011 - Octubre 2013)
 - Reclutament de les pacients
 - Anàlisis preliminar el primer any de seguiment de les pacients.
- FASE 4 (Octubre 2015)
 - Finalització del seguiment de pacients incloses a l'estudi.
- FASE 5 (Octubre 2015 – Juny 2016)
 - Anàlisis dels resultats finals
 - Redacció de la tesis

4.8. IMPLICACIONS ÈTIQUES.

Totes les pacients van ser informades sobre els objectius i procediments de l'estudi per personal especialitzat i van signar el consentiment informat (Annex 2) abans de ser incloses en l'estudi.

L'estudi ha estat registrat en el Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Institut Municipal d'Assistència Sanitària de Barcelona (CEIC-IMAS) amb el número 2011/4293/I (Annex 1) i registrat al ClinicalTrials.gov amb identificador NCT02522585.

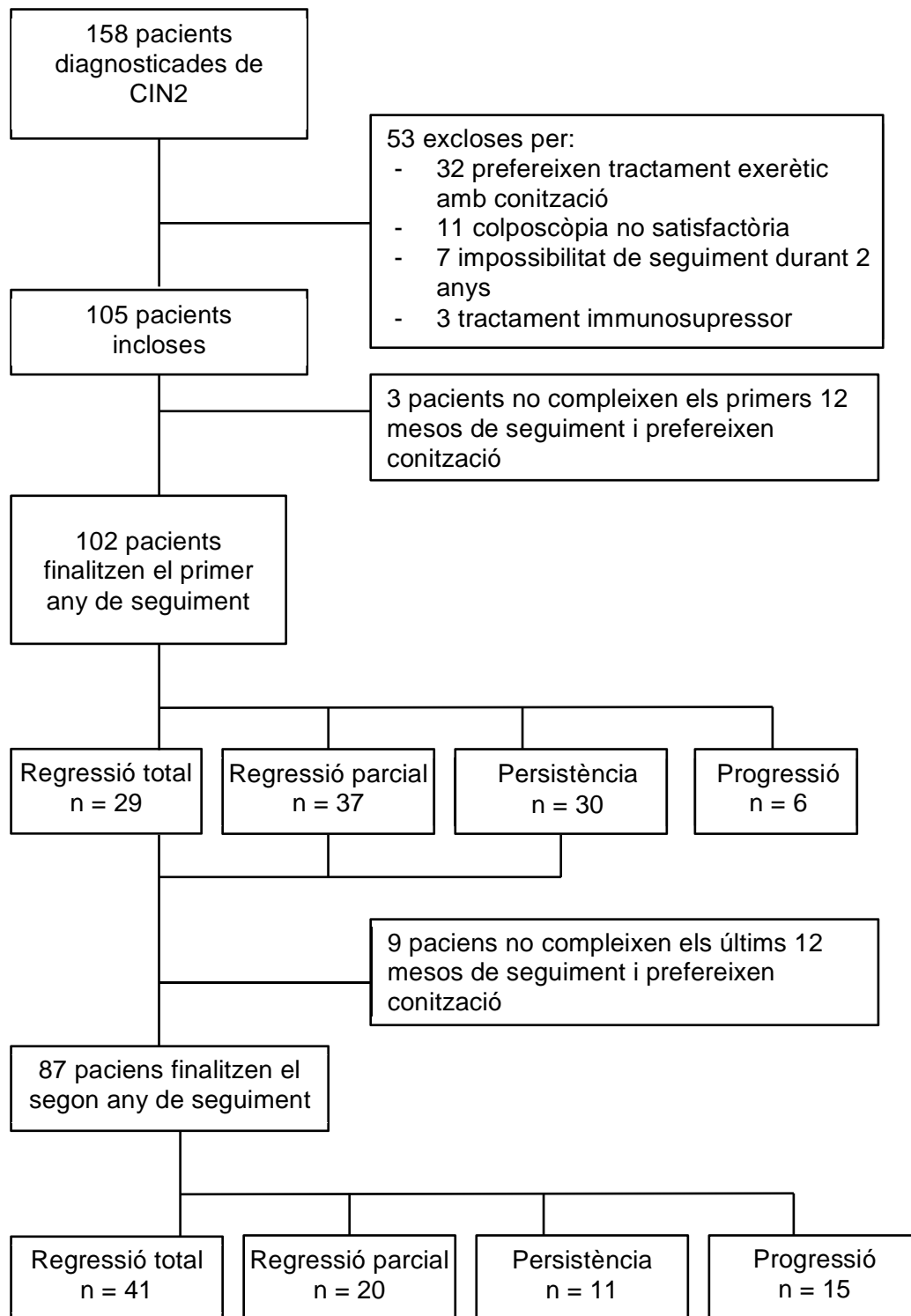
5. RESULTATS

5.1. POBLACIÓ D'ESTUDI

De les 158 pacients derivades a la Unitat de Patologia Cervical entre desembre del 2011 fins octubre del 2013 per un diagnòstic histològic de CIN2, 105 pacients van acceptar participar en l'estudi. Durant el primer any de seguiment 3 pacients van decidir sortir de l'estudi perquè no podien seguir els controls establerts i es van sotmetre a una conització. Per tant, 102 pacients van complir el primer any de seguiment, de les quals 6 pacients van progressar a CIN3 i van ser tractades mitjançant una conització. De les 96 pacients que seguien l'estudi durant el segon any, 9 pacients no el van finalitzar per motius personals o perquè preferien realitzar una conització. Finalment, 87 pacients van acabar els 2 anys de seguiment. En total es considera que 102 pacients van complir el primer any i 93 pacients van finalitzar el protocol establert fins el segon any, essent les 87 sumades a les 6 que van progressar el primer any.

A continuació es presenta el diagrama de flux de les pacients considerades per l'estudi (Algoritme 2):

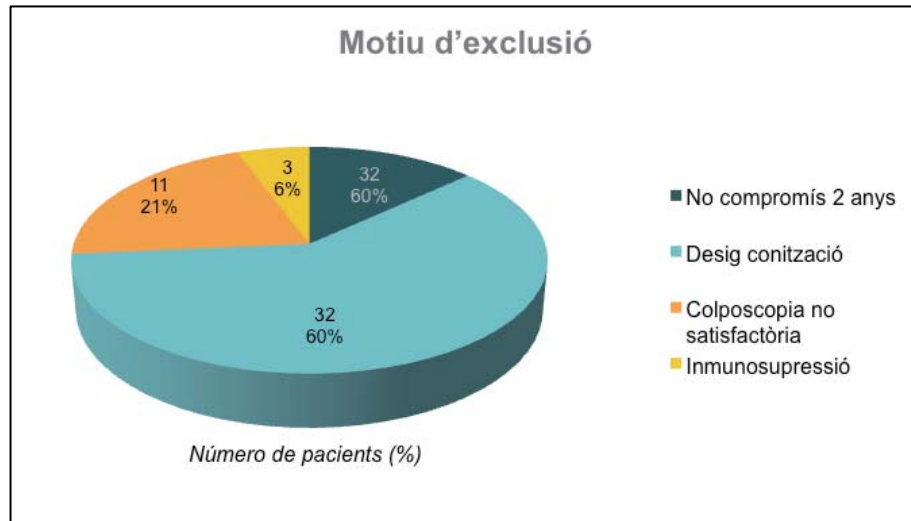
Algoritme 2: Diagrama de flux de la població d'estudi



Tal i com es pot observar, es van reclutar per l'estudi el 66,5% de les dones amb diagnòstic histològic de CIN2. Al Gràfic 1 es representa el motiu d'exclusió de les pacients de l'estudi. Destacar que només un 20,3% (32/158) van preferir la conització com a primera opció en comptes del maneig conservador i un 9%

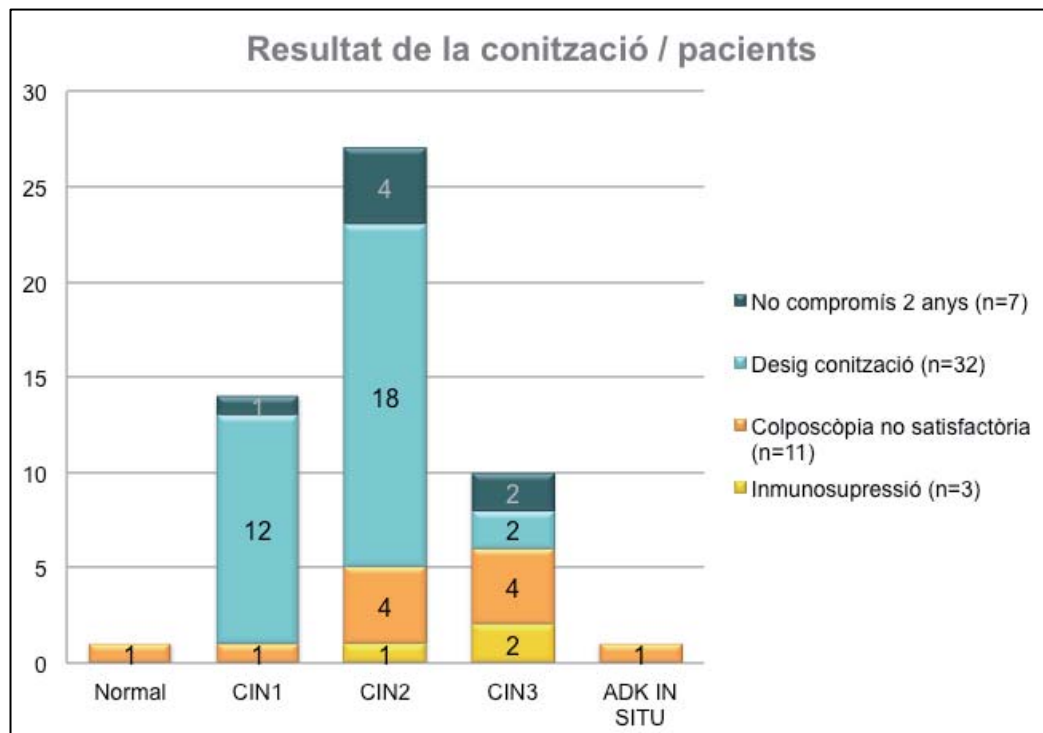
(14/158) no complien criteris mèdics, 11 de les quals no tenien colposcòpia satisfactòria i 3 estaven realitzant tractament immunosupressor amb corticoides per Lupus, Sinupatia crònics i Malaltia de Chron.

Gràfic 1: Motiu d'exclusió de les pacients amb diagnòstic de CIN2



Es va analitzar el resultat histològic de les peces de conització de les dones que no havien estat incloses a l'estudi (Gràfic 2).

Gràfic 2: Diagnòstic de la conització segons el motiu d'exclusió



Posteriorment, es va avaluar els resultats de la peça de conització en funció de si el motiu d'exclusió de l'estudi havia estat per motius personals o bé, per no complir els criteris mèdics d'inclusió tals com la colposcòpia no satisfactòria o la presa de tractaments immunosupressors (Taula 9). El 50% (7/14) de les pacients que complien els criteris mèdics de no inclusió van presentar lesions de CIN3 o Adenocarcinoma in situ a la peça de conització, comparat amb el 10,3% (4/39) de CIN3 que es van diagnosticar entre les dones excloses per motius personals ($p < 0,05$), trobant així lesions displàsiques més agressives si el criteri d'exclusió és mèdic.

Taula 9: Diagnòstic de la conització segons el motiu d'exclusió personal o mèdic

Criteri d'exclusió	No patologia	CIN1	CIN2	CIN3 o ADK in stiu	Total
Personal	0 (0,0%)	13 (33,3%)	22 (56,4%)	4 (10,3%)	39
Mèdic	1 (7,1%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	14
Total	1	14	27	11	
					$P = 0,005$

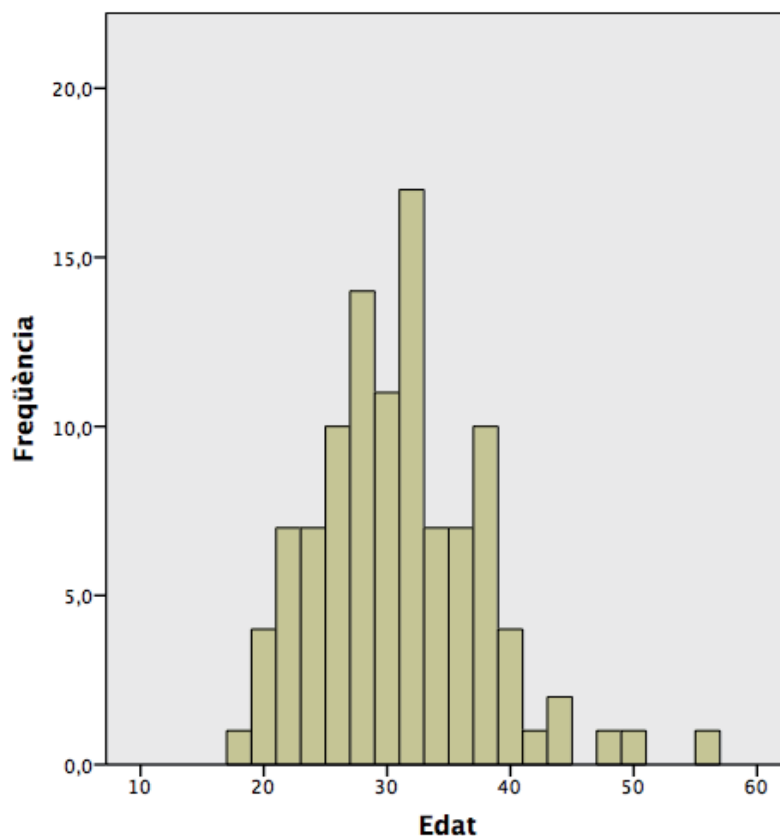
5.2. ANÀLISIS DE LES VARIABLES EPIDEMIOLÒGIQUES

Les característiques epidemiològiques de les 105 pacients incloses a l'estudi es recullen a la Taula 10. L'edat mitjana de les pacients va ser de $30,5 \pm 6,7$ anys, la majoria de les quals tenia entre 25 i 35 anys (Gràfic 3). El 77,1% de les dones eren caucàsiques, mentre que el 14,3% eren d'origen sud-americà. Destacar que un 74,3% eren nul·líparees, i que el mètode anticonceptiu utilitzat era en un 45,7% dels casos el preservatiu, mentre que el 40% utilitzaven un mètode anticonceptiu hormonal. Només 2 de les pacients incloses en l'estudi referien que s'havien administrat la vacuna del VPH. El 54,3% de les dones eren fumadores en el moment del diagnòstic.

Taula 10: Característiques epidemiològiques de la població d'estudi

		n	%
Edat (anys)			
	Mitja ± desv.estand (rang)	30,5 ± 6,7 (18-56)	
	≤ 25	26	24,8
	26-35	56	53,3
	36-45	20	19
	> 45	3	2,9
Ètnia			
	Caucàsica	71	77,1
	Centre-Sud americana	15	14,3
	Africana (3-4)	8	7,6
	Asiàtica (5)	1	1,0
Fumadora			
	Si	57	54,3
	No	48	45,7
Nombre de cigarrets/dia			
	Mitja ± desv.estand (rang)	7,1 ± 8,4 (0-30)	
	< 10	19	18,1
	≥ 10	38	36,2
Paritat			
	Nul·lípara; n (%)	78	74,3
	Té fills	27	25,7
	1	17	16,2
	2	6	5,7
	≥3	4	3,8
Mètode anticonceptiu			
	Preservatiu	48	45,7
	Tractament hormonal	42	40
	DIU o res	15	14,3
Gestant durant l'estudi			
	Si	12	11,4
	No	93	88,6
Edat d'inici de les relacions sexuals (anys)			
	Mitja ± desv.estand (rang)	17,4 ± 2,5 (13-29)	
	<18	60	57,1
	≥ 18	45	42,9
Nombre total de parelles sexuals			
	Mitja ± desv.estand (rang)	8,8 ± 6,3 (1-40)	
	<5	31	29,5
	5 - 10	49	46,7
	> 10	25	23,8
Vacunació prèvia del VPH			
	Si	2	1,9
	No	103	98,1

Gràfic 3: Distribució per edat de les pacients incloses



5.3. ANÀLISIS DELS FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS

Es va analitzar les dades relatives a la citologia prèvia al diagnòstic histològic de CIN2 i al genotipat del VPH causat de l'alteració citològica de la població d'estudi.

5.3.1. Citologia prèvia

En el un 47,6% dels casos, la citologia que va motivar al diagnòstic histològic de CIN2 va ser de HSIL, seguit de la citologia de LSIL en un 22,9% (Taula 11).

Taula 11: Citologia prèvia al diagnòstic histològic de CIN2 de la població d'estudi

		n	%
Citologia cervical prèvia			
	No patologia	0	0
	ASC-US	13	12,4
	LSIL	24	22,9
	ASC-H	18	17,1
	HSIL	50	47,6

5.3.2. Genotipat del VPH

Al analitzar el VPH a la citologia, no es va detectar VPH d'alt risc en un 13,3% de les pacients en la citologia prèvia. La majoria de lesions de CIN2 estaven causades pel VPH16 (41,9%) o un VPH-ARno16no18 (41%). Només un 6,7% dels casos de CIN2 estava causat pel VPH18, tal i com es pot veure a la Taula 12.

Taula 12: Genotipat del VPH de la població d'estudi

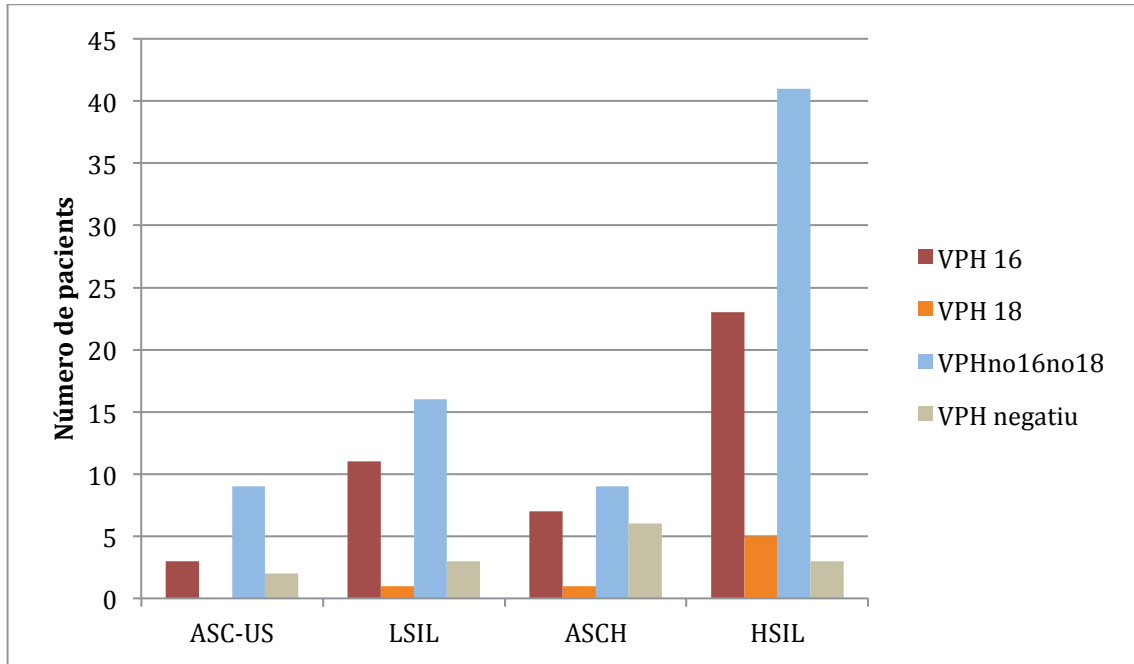
		n	%
VPH AR			
	Negatiu	14	13,3
	Positiu	91	86,7
VPH 16			
	Negatiu	61	58,1
	Positiu	44	41,9
VPH 18			
	Negatiu	98	93,3
	Positiu	7	6,7
VPH Alt risc no 16 no 18			
	Negatiu	30	28,6
	Positiu	75	71,4
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)			
	Negatiu	62	59,0
	Positiu	43	41,0

És important remarcar que la categoria VPH16 agrupa els casos en què es va detectar VPH16, independentment de si es detecten altres tipus de VPH, el mateix passa amb el VPH18. En canvi amb els VPH-ARno16no18 es va diferenciar els casos de coinfecció amb VPH16 o 18 de la resta, per poder estudiar l'efecte de la infecció pels VPH d'alt risc no eren 16 ni 18 de forma aïllada.

- **Distribució dels genotips del VPH segons la citologia**

La distribució dels diferents genotips del VPH en funció del resultat de la citologia es troba representat al Gràfic 4. Destacar que el VPH16 i VPH18 es troben sobretot en citologies HSIL.

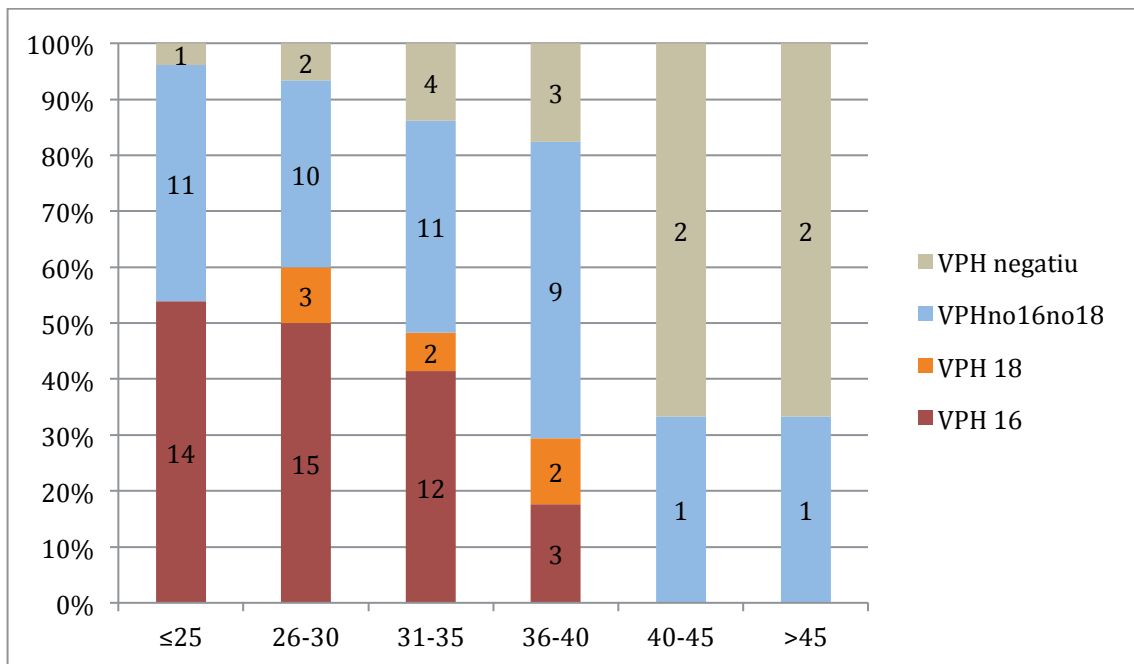
Gràfic 4: Distribució dels genotips del VPH segons la citologia



- **Distribució dels genotips del VPH segons l'edat**

El Gràfic 5 representa la distribució dels diferents genotips del VPH segons els diferents grups d'edat.

Gràfic 5: Distribució dels genotips del VPH segons l'edat (anys).



*VPHno16no18 exclou les coinfeccions amb VPH16 i VPH18

Ressaltar que a partir dels 40 anys va ser més freqüent trobar un resultat de VPH-AR negatiu, mentre que per sota els 35 anys el VPH16 va ser més freqüent. El VPH18 es va trobar sobretot en edats entre 26-40 anys.

5.4. ANÀLISIS DE L'ESTAT IMMUNOLÒGIC ENVERS LES MTS

Totes les pacients van ser sotmeses a un anàlisi en sang el dia d'inclusió per tal d'estudiar l'estat immunològic en front les hepatitis, VIH i MTS. Els resultats es recullen a la Taula 13.

Taula 13: Estat immunològic de les serologies de les pacients incloses en l'estudi

		n	%
Anticossos VIH			
	Positiu	0	0
Antigen de superfície Hepatitis B			
	Positiu	0	0
Anticossos Ig G Hepatitis C			
	Positiu	0	0
Anticossos herpes simple 2			
	IgG	14	13,3
	IgM	1	1,0
Anticossos Chlamydia trachomatis			
	IgG	9	8,7
	IgA	19	18,1
Anticossos Treponema pallidum (Lues)			
	Positiu	0	0
Anticossos Citomegalovirus			
	IgG	72	68,6
	IgM	0	0

Cap de les pacients estudiades va resultar positiva per VIH, VHC, VHB, ni Lues. Destaca que 14 (13,3%) tenien IgG positiu per herpes 2. En quan a la infecció per Clamídia, ressaltar que 9 dones (8,7%) tenien IgG positiu per Clamídia, i per tant, havien passat la infecció en algun moment a la seva vida, destacar que 19 de les pacients (18,1%) tenien IgA positiu, el que indica una tenien una infecció aguda, crònica o recurrent de la Clamídia en el moment de la seva inclusió a l'estudi. Respecte el CMV, no es va detectar cap pacient amb infecció activa, tot i que un 68,6% era seropositiva.

5.5. ANÀLISIS DE LES CÈL·LULES NK

5.5.1. Població de les cèl·lules NK i la infecció pel CMV

Es va estudiar els nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en sang perifèrica a totes les pacients diagnosticades de CIN2, en el moment d'inclusió a l'estudi.

Tal i com s'ha descrit a la introducció, la infecció pel CMV s'associa a canvis en la distribució dels receptors de les cèl·lules NK. Per això es va estudiar el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en sang perifèrica de les pacients amb CIN2, de manera global i en subgrups en funció del CMV, com es mostra a la Taula 14 i es representa en el Gràfic 6.

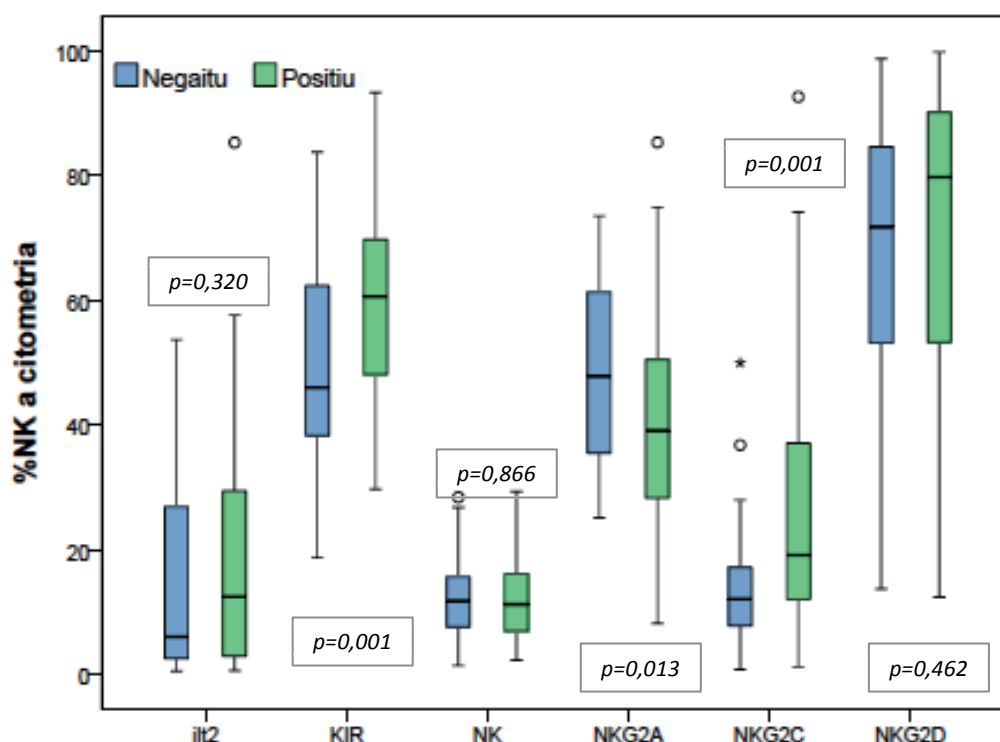
Taula 14: Poblacions de cèl·lules NK segons el CMV

	Total (n=105)	CMV + (n=72)	CMV- (n=33)	P
% Cèl·lules NK				
% expressió mitja (desv.estàndard)	12,4 (6,7)	12,3 (6,7)	12,5 (6,8)	0,866
% NKG2A				
% expressió mitja (desv.estàndard)	42,9 (15,3)	40,4 (15,3)	48,4 (14,1)	0,013
% NKG2C				
% expressió mitja (desv.estàndard)	22,2 (17,7)	26,1 (19,1)	13,8 (10,2)	0,001
% NKG2D				
% expressió mitja (desv.estàndard)	69,9 (24,2)	70,8 (24,2)	67,9 (24,5)	0,462
% ILT2				
% expressió mitja (desv.estàndard)	17,3 (18,2)	19,1 (19,6)	13,7 (14,4)	0,320
% KIR				
% expressió mitja (desv.estàndard)	56,2 (15,9)	59,6 (15,6)	48,9 (14,4)	0,001

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

En la nostra població objecte d'estudi, la prevalença del CMV va ser del 68,6%. En estudiar la població de les cèl·lules NK es va observar que aquestes tenien diferent percentatge d'expressió dels receptors en funció del CMV. En pacients CMV+ es va observar més expressió dels receptors activadors NKG2C i KIR i menys expressió del receptor inhibidor NKG2A que en pacients CMV -, amb diferències estadísticament significatives.

Gràfic 6: Representació del percentatge d'expressió de les cèl·lules NK en funció del CMV en pacients amb CIN2



5.5.2. Població de les cèl·lules NK segons el genotipat del NKG2C

El percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK i concretament del receptor NKG2C depèn del seu genotip. El genotip del NKG2C a la població estudiada es mostra a la Taula 15 on destaca que el 65,4% de les dones eren homozigotes per a NKG2C. A partir d'aquests resultats, es va calcular el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en funció del genotip del NKG2C (Taula 16 i Gràfic 7). Tal i com es pot observar, les pacients homozigotes (NKG2C+/+) van presentar major expressió del receptor NKG2C i KIR, i menor NKG2A que les pacients amb doble delecció del NKG2C (NKG2Cdel/del) ($p < 0.005$).

Taula 15: Genotipat del NKG2C de les pacients amb CIN2 incloses a l'estudi

		n	%
NKG2C			
Homozigot	NKG2C+/+	53	65,4
Heterozigot	NKG2C+/del	19	23,5
Doble delecció	NKG2Cdel/del	9	11,1
Total		81	

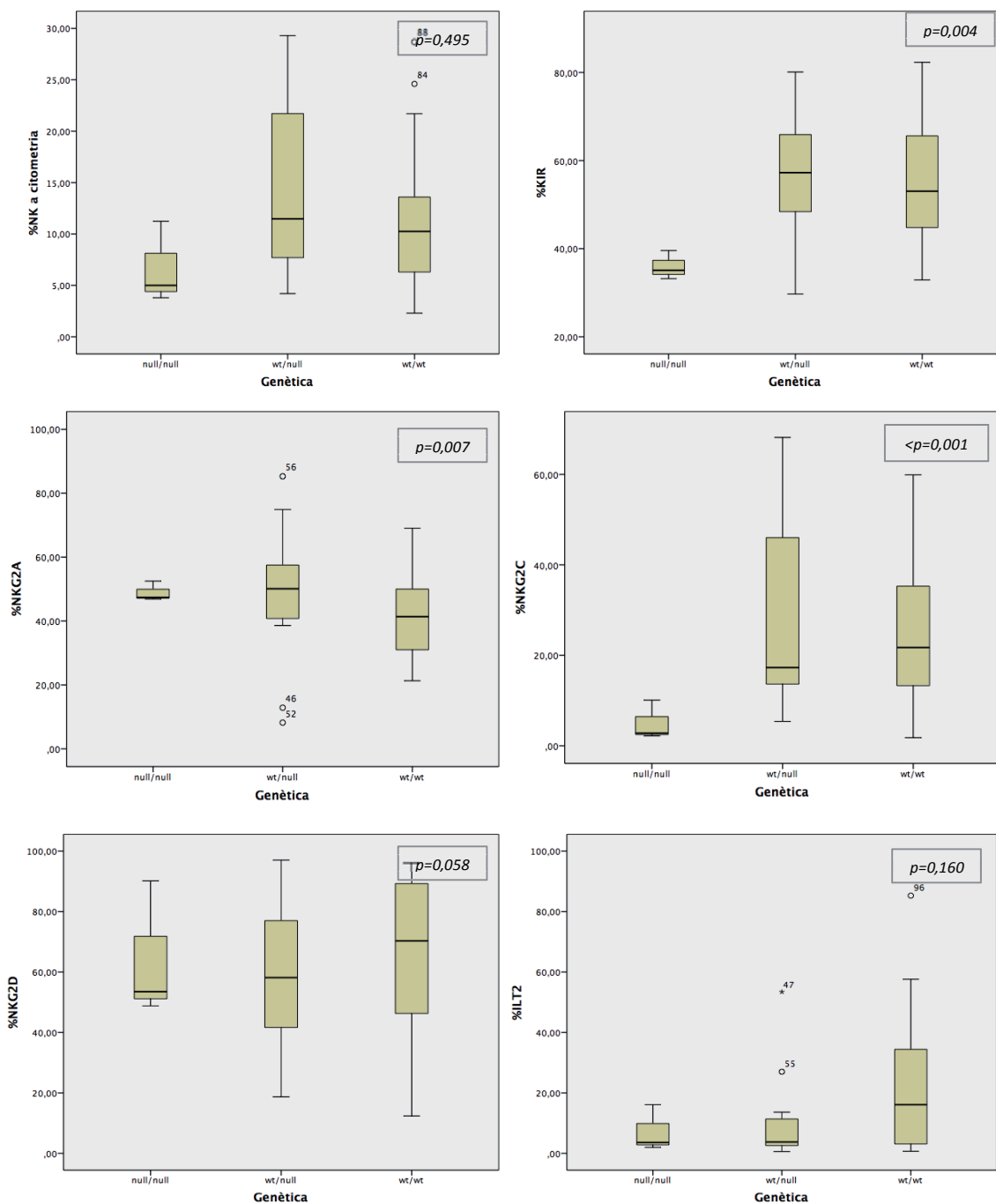
Taula 16: Poblacions de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C

	NKG2C+/+ (53)	NKG2C+/del (19)	NKG2Cdel/del (9)	P
% Cèl·lules NK	12,2 (6,9)	12,7 (7,7)	12,4 (8,5)	0,980
% NKG2A	38,3 (13,7)	45,4 (18,5)	54,3 (12,8)	0,007
% NKG2C	27,6 (18,8)	22,3 (17,8)	3,7 (2,7)	<0,001
% NKG2D	72,1 (23,2)	65,4 (23,2)	52,0 (24,5)	0,058
% ILT2	20,6 (20,7)	10,1 (14,8)	5,6 (5,0)	0,160
% KIR	60,0 (14,3)	60,3 (16,2)	42,3 (11,3)	0,004

*Prova no paramètrica (Kruskal Wallis)

[% expressió mitja (desv.estàndard)]

Gràfic 7: Diagrama de caixes de les poblacions de les cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C



Tot seguit, es va realitzar el mateix anàlisi del percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C en funció de la infecció del CMV. Els resultats d'aquests anàlisis es recullen a les Taula 17 i Taula 18

Taula 17: Poblacions de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C en pacients CMV positives

	CMV positiu			P
	NKG2C+/+ (46)	NKG2C+/del (16)	NKG2Cdel/del (3)	
% Cèl·lules NK	12,1 (6,6)	13,8 (7,7)	6,7 (4,0)	0,204
% NKG2A	37,8 (13,7)	46,2 (19,7)	48,9 (3,1)	0,064
% NKG2C	29,5 (19,3)	24,5 (18,6)	5,0 (4,4)	0,018
% NKG2D	71,7 (24,5)	64,4 (25,3)	64,2 (22,7)	0,612
% ILT2	21,8 (20,9)	10,5 (15,4)	7,2 (7,7)	0,250
% KIR	60,5 (14,9)	61,0 (16,6)	35,9 (3,3)	0,034

*Prova no paramètrica (Kruskal Wallis)

[% expressió mitja (desv.estàndard)]

Taula 18: Poblacions cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C en pacients CMV negatives

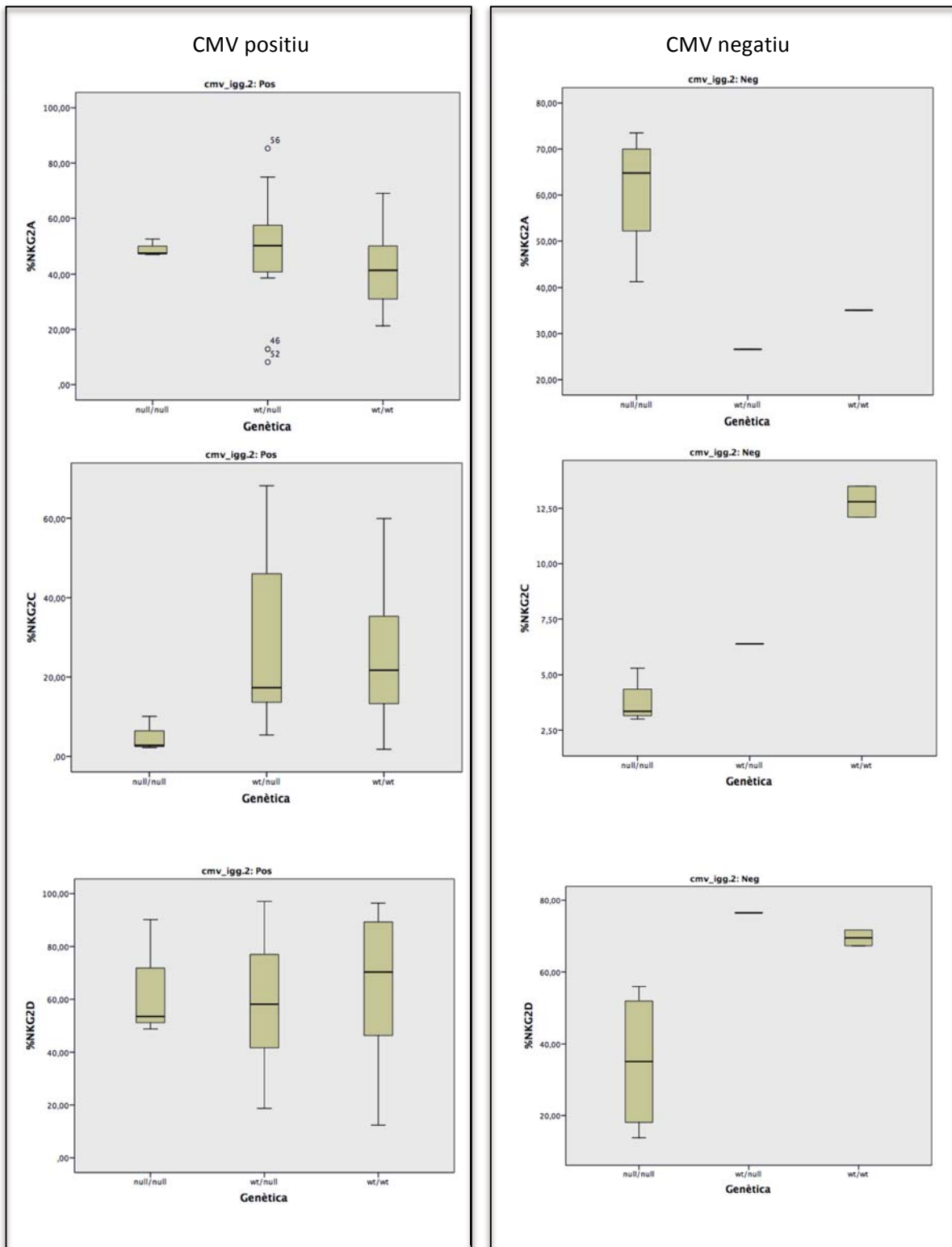
	CMV negatiu			P
	NKG2C+/+ (7)	NKG2C+/del (3)	NKG2Cdel/del (6)	
% Cèl·lules NK	12,7 (9,4)	6,4 (3,2)	15,3 (8,9)	0,308
% NKG2A	41,5 (14,1)	41,1 (12,6)	57,0 (15,2)	0,220
% NKG2C	14,6 (5,2)	10,7 (4,2)	3,1 (1,4)	0,004
% NKG2D	74,7 (11,2)	70,3 (5,4)	45,9 (24,9)	0,072
% ILT2	3,4 (1,1)	5,3**	4,3 (2,4)	0,392
% KIR	55,9 (8,9)	56,7 (16,0)	45,4 (12,7)	0,263

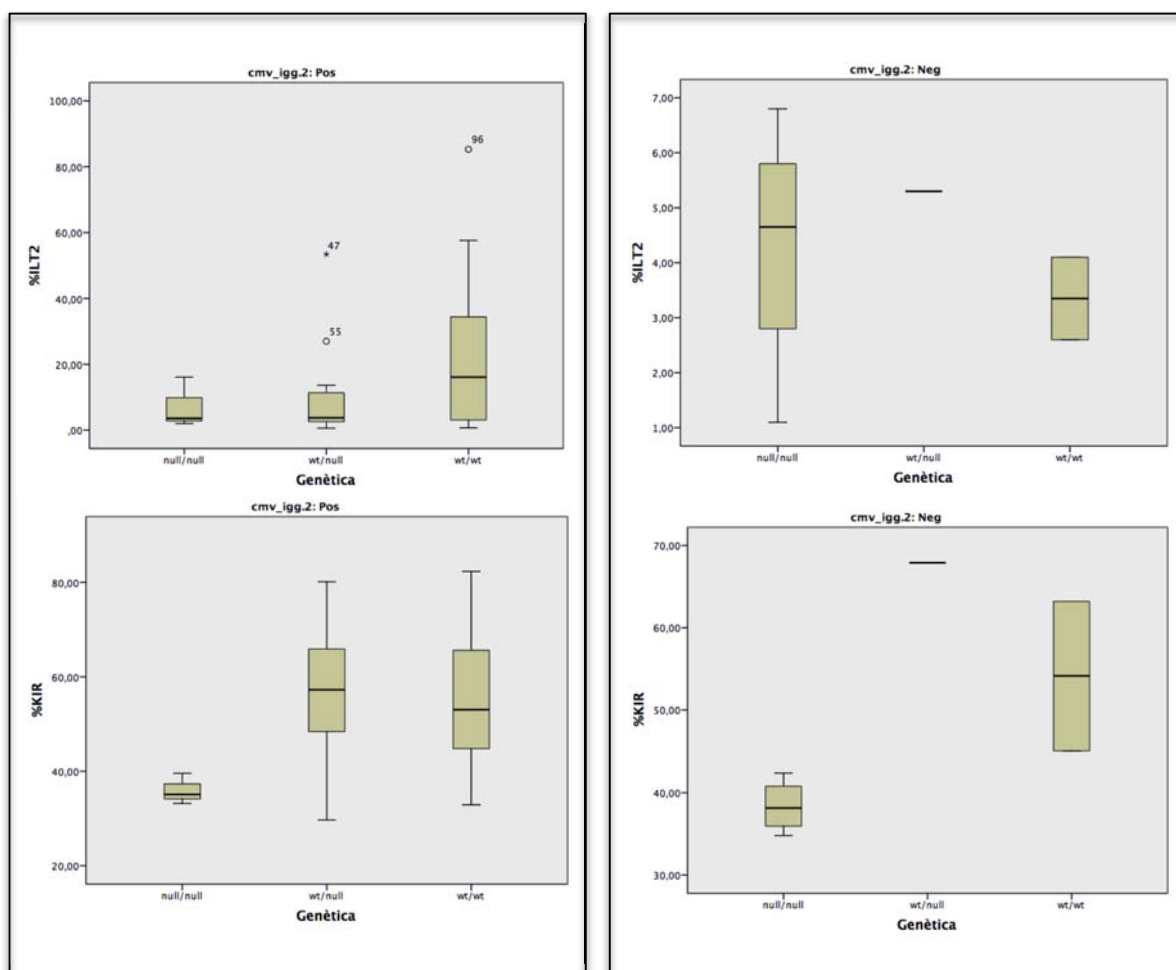
*Prova no paramètrica (Kruskal Wallis)

[% expressió mitja (desv.estàndard)]

S'observa que en les pacients CMV+ es mantenen les diferències anteriorment descrites a la població general. De tal manera que les pacients homozigotes (NKG2C+/+) van presentar major d'expressió del receptor NKG2C i KIR, i menor NKG2A que en les pacients amb doble delecció del NKG2C (NKG2Cdel/del). En canvi en les pacients CMV negatives, tot i haver-hi menys pacients, també es va observar diferències en l'expressió de major expressió de NKG2C en les pacients homozigotes. A continuació, al Gràfic 8 es representa aquests resultats descrits en un diagrama de caixes.

Gràfic 8: Diagrama de caixes de la població de cèl·lules NK segons el genotip del NKG2C i la infecció del CMV





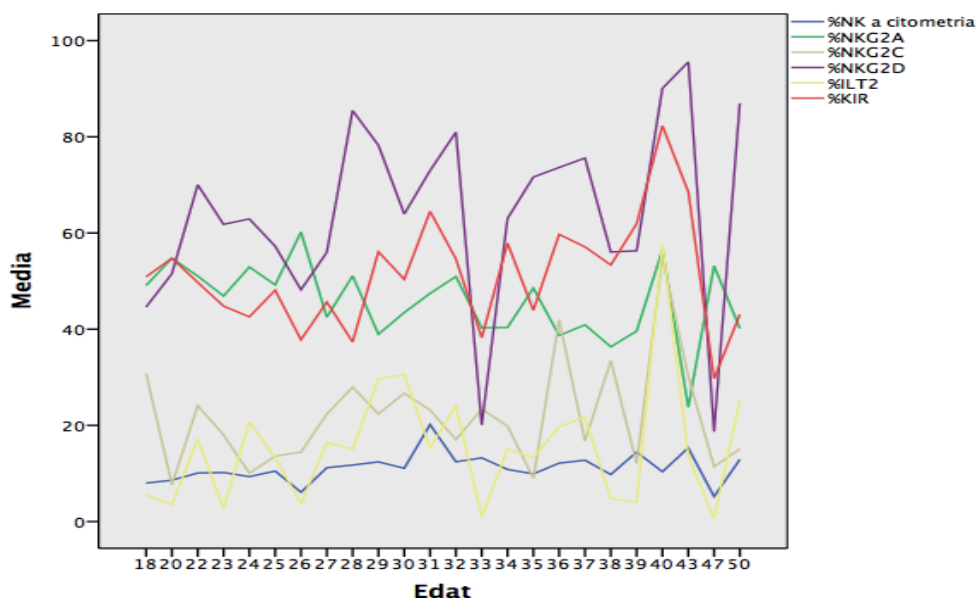
5.5.3. Població de les cèl·lules NK i possibles factors de confusió

A continuació es van estudiar els nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en funció de característiques de les pacients amb CIN2, per tal de poder estudiar si aquests factors podrien modificar de l'expressió de les cèl·lules NK.

5.5.3.1. Edat

Al analitzar la població de les cèl·lules NK en les pacients incloses a l'estudi en funció de l'edat, no es van evidenciar diferències significatives ni correlació entre el percentatge d'expressió de les cèl·lules NK i l'edat (Gràfic 9).

Gràfic 9: Poblacions de cèl·lules NK segons l'edat



5.5.3.2. Tabac

Es va quantificar l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en la població d'estudi en funció de si fumaven o no. Tal i com es pot observar a les dades recollides a la Taula 19, les pacients fumadores tenien una menor expressió global de cèl·lules NK i una menor expressió del receptor ILT2 que les no fumadores ($p < 0,05$).

Taula 19: Poblacions de cèl·lules NK segons l'hàbit tabàquic

	Fumadores (n=57)	No fumadores (n=48)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	10,3 (6,4)	14,9 (6,3)	<0,001
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	44,3 (15,1)	41,3 (15,6)	0,346
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	19,7 (14,1)	25,3 (20,9)	0,389
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	69,2 (25,0)	70,7 (23,6)	0,910
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	13,9 (15,9)	22,5 (20,4)	0,030
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	54,2 (16,9)	58,7 (14,5)	0,106

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

5.5.3.3. Paritat

L'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en la població d'estudi no va mostrar diferències estadísticament significatives en relació a si les dones tenien o no fills, tal i com es mostra a la Taula 20.

Taula 20: Poblacions de cèl·lules NK segons la paritat

	Té fills (n=27)	Nul·lípara (n=78)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	23,5 (6,6)	12,3 (6,8)	0,898
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	41,9 (18,2)	43,2 (14,3)	0,400
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	27,3 (19,1)	20,5 (16,9)	0,065
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	70,3 (25,8)	69,8 (23,8)	0,778
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	17,9 (17,1)	17,2 (18,7)	0,555
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	59,1 (17,6)	55,3 (15,3)	0,219

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

5.5.3.4. Vacunació del VPH

Tot i que només 2 pacients diagnosticades de lesió cervical de CIN2 van referir haver-se administrat la vacuna del VPH prèviament, es va estudiar l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en aquestes pacients en comparació amb les no vacunades (Taula 21).

Cal tenir en compte que les 2 pacients vacunades incloses, va presentaven infecció pel VPH en el moment de diagnòstic de CIN2, una d'elles era portadora del VPH16 i a l'altra el VPH-ARno16no18. Ambdues eren CMV positiu i homozigotes pel gen NKG2C.

Tal i com es pot observar en els resultats obtinguts, el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK va ser diferent en les pacients vacunades que les no vacunades. Les pacients que havien rebut la vacuna del

VPH presentaven menor percentatge d'expressió del receptor NKG2A, i major de NKG2C, NKG2D, ILTS i KIR, tot i que només el KIR va presentar un resultat estadísticament significatiu.

Taula 21: Poblacions de cèl·lules NK segons la vacunació del VPH

	Vacunació VPH (n=2)	No vacunació VPH (n=103)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	11,9 (2,3)	12,4 (6,8)	0,879
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	29,6 (28,4)	43,1 (15,1)	0,471
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	54,5 (53,9)	21,6 (16,5)	0,277
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	92,9 (5,0)	69,5 (24,2)	0,169
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	49,4	16,9 (17,9)	0,187
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	81,2 (17,1)	55,8 (15,6)	0,048

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

5.5.3.5. Virus herpes simple 2

La Taula 22, mostra l'expressió dels receptors les cèl·lules NK en funció de si les pacients presentaven immunitat enfront la infecció del virus herpes simple 2 (IgG). Ressaltar que el percentatge d'expressió del receptor NKG2A va ser major entre les dones que havien presentat una infecció per VHS2 que entre les que no (p=0,048).

Taula 22: Poblacions de cèl·lules NK segons el virus herpes simple 2

	VHS2 positiu (n=14)	VHS2 negatiu (n=91)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	14,6 (8,5)	12,0 (6,4)	0,233
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	50,6 (15,3)	41,7 (15,1)	0,048
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	26,6 (18,6)	21,5 (17,6)	0,187
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	73,9 (23,3)	69,3 (24,4)	0,477
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	24,1 (21,2)	16,4 (17,7)	0,282
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	58,9 (17,2)	55,8 (15,8)	0,522

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

5.5.3.6. *Chlamydia trachomatis*

L'expressió de les NK i dels diferents receptors es va correlacionar amb la *Chlamydia trachomatis* en funció de si les dones havien tingut una infecció antiga resolta (IgG) (Taula 23), o bé podien presentar una infecció aguda, crònica o recurrent (IgA) (Taula 24). Tant en una situació com en un altra no es van demostrar diferències significatives entre l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK, encara que si s'observa una tendència a que les 9 pacients amb IgG+ per Clamídia presentaven menor expressió del receptor activador NKG2C (p=0,068).

Taula 23: Poblacions de cèl·lules NK segons la immunitat per Chlamydia trachomatis (IgG)

	IgG Clamídia + (n=9)	IgG Clamídia - (n=96)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	13,6 (9,2)	12,3 (6,4)	0,777
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	41,6 (14,5)	43,0 (15,5)	0,787
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	12,0 (7,2)	23,3 (18,2)	0,068
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	73,7 (19,9)	69,5 (24,7)	0,711
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	26,0 (23,6)	16,6 (17,7)	0,292
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	59,9 (13,8)	55,9 (16,2)	0,315

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

Taula 24: Poblacions de cèl·lules NK segons la immunitat per Chlamydia trachomatis (IgA)

	IgA Clamídia + (n=19)	IgA Clamídia - (n=86)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	10,9 (6,3)	12,7 (6,8)	0,281
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	45,3 (14,5)	42,4 (15,6)	0,434
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	17,4 (13,2)	23,3 (18,2)	0,371
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	76,7 (18,0)	68,4 (25,2)	0,244
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	22,9 (17,2)	16,1 (18,3)	0,060
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	54,3 (15,3)	56,7 (16,1)	0,522

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

5.5.3.7. VPH

Es va analitzar l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en relació a la presència dels diferents genotips del VPH a la citologia prèvia al diagnòstic de CIN2.

- **VPH AR**

En primer lloc es va considerar l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en funció de si a la citologia s'havia detectat la presència o no del VPH d'alt risc (VPH-AR). No es van identificar diferències estadísticament significatives en l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK i la presència de VPH d'alt risc a la citologia prèvia. Tot i això, a la Taula 25 s'observa una tendència a que les pacients amb VPH-AR tenien menor expressió del receptors NKG2A que aquelles en les que no es va detectar el VPH-AR.

Taula 25: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH d'alt risc

	VPH-AR positiu (n=91)	VPH-AR negatiu (n=14)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	12,3 (6,7)	13,0 (7,2)	0,792
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	41,7 (15,0)	50,3 (15,8)	0,075
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	21,8 (17,7)	24,9 (18,3)	0,456
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	69,7 (24,3)	71,5 (24,4)	0,814
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	17,7 (18,5)	13,8 (15,4)	0,636
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	56,3 (16,6)	55,9 (11,4)	0,959

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

Sabent que les pacients CMV positives modifiquen l'expressió de les cèl·lules NK, es va realitzar un subanàlisis del VPH-AR en les pacients CMV positives per veure si el fet de tenir la infecció del VPH-AR modificava l'expressió de les cèl·lules NK en aquest subgrup de pacients de l'estudi. De les

dades recollides a la Taula 26 s'extreu que no hi ha diferències en l'expressió de les cèl·lules NK en pacients CMV positives en funció de la presència o no del VPH-AR.

Taula 26: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH d'alt risc en pacients CMV positives

	CMV positiu		P
	VPH AR positiu (n=61)	VPH AR negatiu (n=5)	
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	12,1 (6,7)	14,7 (9,4)	0,621
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	39,9 (15,6)	44,2 (15,5)	0,707
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	25,4 (19,0)	38,4 (18,5)	0,130
% NKG2D			
% expressió mitja (desv.estàndard)	69,7 (24,7)	81,9 (23,9)	0,206
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	17,4 (18,8)	34,0 (12,5)	0,193
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	59,7 (15,9)	61,5 (12,4)	0,742

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

- **VPH 16**

A continuació es va analitzar específicament la infecció del VPH16 per estudiar si en les pacients en les que es detectava aquest genotip modificaven l'expressió de les cèl·lules NK. Tal i com es pot observar a la Taula 27, s'observa una tendència no significativa a presentar menor expressió de receptors NKG2C en les pacients amb VPH16 que les que no es detecta el VPH16. En canvi, estudiant només les pacients CMV positives (Taula 28), no es troben diferències.

Taula 27: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH16

	VPH 16 positiu (n=44)	VPH 16 negatiu (n=61)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	12,9 (7,2)	12,0 (6,3)	0,699
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	45,0 (16,2)	41,4 (14,6)	0,256
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	18,8 (15,2)	24,7 (19,1)	0,082
% NKG2D			
	4		
% expressió mitja (desv.estàndard)	69,4 (22,9)	70,3 (25,3)	0,617
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	18,9 (21,3)	16,1 (15,5)	0,962
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	54,4 (16,2)	57,6 (15,7)	0,333

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

Taula 28: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH16 en pacients CMV positives

	CMV positiu		P
	VPH 16 positiu (n=27)	VPH 16 negatiu (n=39)	
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	12,1 (7,1)	12,5 (6,7)	0,715
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	43,4 (17,6)	38,1 (13,7)	0,190
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	23,0 (17,0)	28,7 (20,4)	0,233
% NKG2D			
	4		
% expressió mitja (desv.estàndard)	68,8 (22,6)	71,7 (26,2)	0,344
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	17,4 (22,7)	18,7 (15,7)	0,319
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	56,7 (16,1)	62,0 (15,1)	0,173

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

- **VPH 18**

Només en 7 pacients es va detectar el genotip VPH18 a la citologia prèvia. Comparant l'expressió de les cèl·lules NK en funció de la infecció pel VPH18 no es van mostrar diferències estadísticament significatives en l'expressió de les cèl·lules NK i la infecció pel VPH18 (Taula 29). Tot i això, es detecta una menor expressió de NKG2A i major expressió de ILT2 en les pacients amb VPH18 comparant amb les pacients que no es va detectar aquest genotip.

Taula 29: Poblacions de cèl·lules NK segons la detecció del VPH18

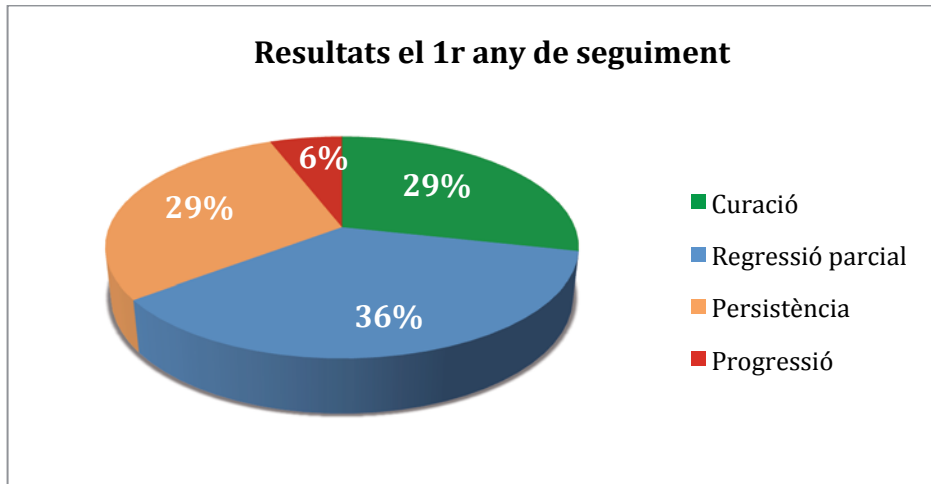
	VPH 18 positiu (n=7)	VPH 18 negatiu (n=98)	P
% Cèl·lules NK			
% expressió mitja (desv.estàndard)	10,6 (6,6)	12,5 (6,7)	0,472
% NKG2A			
% expressió mitja (desv.estàndard)	34,4 (8,7)	43,5 (15,6)	0,088
% NKG2C			
% expressió mitja (desv.estàndard)	19,0 (13,5)	22,4 (18,0)	0,705
% NKG2D			
	4		
% expressió mitja (desv.estàndard)	68,3 (25,7)	70,0 (24,2)	0,837
% ILT2			
% expressió mitja (desv.estàndard)	30,4 (33,2)	16,2 (16,2)	0,488
% KIR			
% expressió mitja (desv.estàndard)	60,6 (9,8)	55,9 (16,3)	0,358

*Prova no paramètrica (U-Mann Whitney)

5.6. EVOLUCIÓ DE LES LESIONS DE CIN2

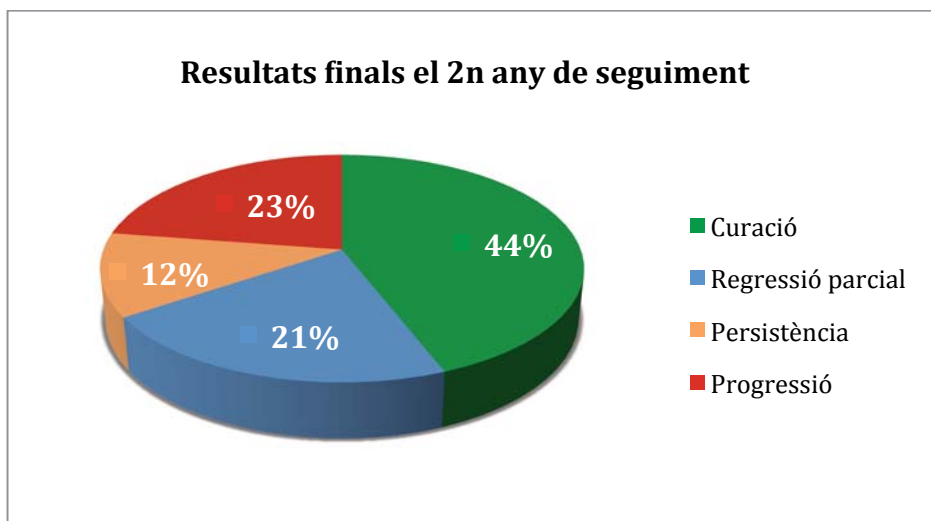
De les 105 dones incloses a l'estudi, 102 van finalitzar el primer any de seguiment. L'evolució de les lesions de CIN2 es representa al Gràfic 10. Destacar que 29 pacients havien curat la seva lesió de CIN2 el primer any i que 37 presentaven un CIN1. Només es va evidenciar progressió a CIN3 en 6 pacients que van ser conitzades en el moment del diagnòstic.

Gràfic 10: Evolució de les lesions de CIN2 el primer any de seguiment



Finalment 87 pacients van acabar els 2 anys de seguiment de l'estudi. D'aquestes, 41 es van considerar curades i van ser remeses al seu centre de referència per seguir controls anuals. Les 46 dones restant que encara presentaven alguna lesió, van ser conitzades. El diagnòstic histo-patològic final de la peça de conització va ser de de CIN1 en 20 pacients, CIN2 en 11 pacients i CIN3 en 15 pacients. En global, posterior als dos anys de seguiment, les lesions de CIN2 de les pacients de l'estudi van presentar una taxa de curació del 44%, una taxa de regressió parcial del 21,5%, una taxa de persistència del 11,8% i una taxa de progressió del 22,6% (Gràfic 11). Cal destacar que cap cas va progressar a carcinoma invasor.

Gràfic 11: Evolució de les lesions de CIN2 el segon any de seguiment



Del total de 21 lesions de CIN3 descrites de durant l'estudi, 6 es van diagnosticar al finalitzar l'estudi a través de la peça de conització. Aquests casos es podrien considerar **CIN3 ocults** ja que no havia estat diagnosticat prèviament a través de les biòpsies i del seguiment. La Taula 30 recull les dades citològiques, de VPH i colposcòpiques d'aquests casos. Destaca que totes les pacients tenien troballes patològiques a l'exploració colposcòpica, a més a més d'una citologia prèvia patològica i presència de VPH AR. Els 2 casos de biòpsia prèvia de CIN1 presentaven immunoreactivitat per p16 a tot el gruix epitelial. Remarcar que no es va trobar cap cas de Carcinoma invasor ocult.

Taula 30: Anàlisi dels casos de CIN3 ocults

Codi	Diagnòstic el 1r any	Última citologia	Últim VPH	Colposcòpia	Última biòpsia	Biòpsia de conització
222	CIN2	HSIL	ARno16no18	Satisfactòria amb lesió a les 6h	CIN1	CIN3
231	CIN2	HSIL	ARno16no18	Lesió endocervical	CIN2	CIN3
260	CIN2	HSIL	VPH16	Satisfactòria amb lesió que ocupa els 4 quadrants	CIN2	CIN3
263	CIN2	LSIL	VPH16	Satisfactòria amb lesió que ocupa els 4 quadrants	CIN2	CIN3
269	CIN2	ASC-H	VPH16	Satisfactòria amb mosaic lleu que ocupa el 50%	CIN1	CIN3
287	CIN2	LSIL	VPH16	Satisfactòria lesió molt lleu a les 12h	CIN2	CIN3

5.7. VARIABLES EPIDEMIOLÒGIQUES I EVOLUCIÓ DEL CIN2

Amb l'objectiu de poder identificar factors pronòstic, es va correlacionar les diferents variables epidemiològiques amb l'evolució de les lesions de CIN 2.

5.7.1. Edat

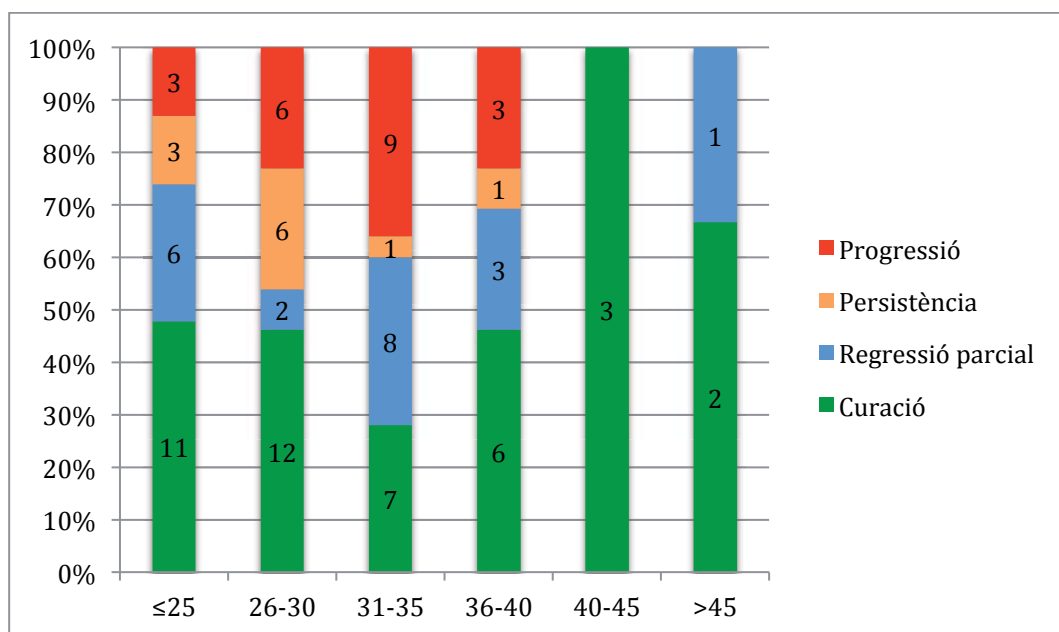
En primer lloc es va relacionar l'edat com a factor pronòstic de l'evolució de les lesions de CIN2 als 2 anys sense trobar diferències estadísticament significatives (Taula 31). Destaca que, malgrat el poc número de pacients majors de 40 anys, no hi va haver cap cas de progressió a CIN3 entre aquestes

dones, en canvi les dones entre 30-35 anys van ser les que van presentar majors taxes de progressió (Gràfic 12).

Taula 31: Resultat del seguiment del CIN2 segons l'edat

Edat (anys)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Mitja (desv.estand)	30,8 (8,2)	30,9 (6,4)	28,6 (4,1)	30,5 (5,2)	P= 0,787
≤ 25	11 (47,8%)	6 (26,1%)	3 (13,0%)	3 (13,0%)	23
26-35	19 (37,3%)	10 (19,6%)	7 (13,7%)	15 (29,4%)	51
36-45	9 (56,3%)	3 (18,8%)	1 (6,3%)	3 (18,8%)	16
> 45	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3
Total	41	20	11	21	
					P = 0,762

Gràfic 12: Representació de l'evolució del CIN2 en funció de l'edat en grups de 5 anys



Seguidament es va analitzar els resultats finals de l'evolució de les lesions de CIN 2 en funció de l'edat segons punts de tall als 25, 30 i 40 anys (Taula 32). No es van trobar diferències estadísticament significatives en l'evolució de les lesions en funció de si les dones eren majors o menors de 25 anys i 30 anys. Les dones majors de 40 anys amb lesions de CIN2, tot i ser una petita representació en la mostra, van regressar totes total o parcialment, encara que aquesta diferència no va ser estadísticament significativa.

Taula 32: Resultat del seguiment del CIN2 segons l'edat, amb punt de tall els 25, 30 i 40 anys

Edat (anys)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
≤ 25	11 (47,8%)	6 (26,1%)	3 (13,0%)	3 (13,0%)	0,645
> 25	30 (42,9%)	14 (20,0%)	8 (11,4%)	18 (25,7%)	
< 30	21 (50,0%)	8 (19,0%)	6 (14,3%)	7 (16,7%)	0,494
≥ 30	20 (39,2%)	12 (23,5%)	5 (9,8%)	14 (27,5%)	
< 40	36 (41,4%)	19 (21,8%)	11 (12,6%)	21 (24,1%)	0,211
≥ 40	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Total	41	20	11	21	

Per tal de precisar encara més el paper de l'edat en l'evolució de les lesions CIN 2, es van realitzar 3 anàlisis addicionals en funció de l'estat de la lesió al cap de dos anys, segons curació vs no curació (CIN1+), regressió (<CIN2) vs persistència i progressió (CIN2+), i finalment no progressió (≤CIN2) vs progressió a CIN3. Els resultats que es recullen a les Taules 33, 34 i 35. Aquests anàlisis tampoc no van aconseguir demostrar diferències estadísticament significatives.

Taula 33: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons l'edat amb punt de tall als 25, 30 i 40 anys

Edat (anys)	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
≤ 25	11 (47,8%)	12 (52,2%)	0,677
> 25	30 (42,9%)	40 (57,1%)	
< 30	21 (50,0%)	21 (50,0%)	0,297
≥ 30	20 (39,2%)	31 (60,8%)	
< 40	36 (41,4%)	51 (58,6%)	0,084
≥ 40	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Total	41	52	

Taula 34: Comparació regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons l'edat amb punt de tall als 25, 30 i 40 anys

Edat (anys)	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
≤ 25	17 (73,9%)	6 (26,1%)	0,333
> 25	44 (62,9%)	26 (37,1%)	
< 30	29 (69,0%)	13 (31,0%)	0,524
≥ 30	32 (62,7%)	19 (37,3%)	
< 40	55 (63,2%)	32 (36,8%)	0,090
≥ 40	6 (100%)	0 (0,0%)	
Total	61	32	

Taula 35: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons l'edat amb punt de tall als 25, 30 i 40 anys

Edat (anys)	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
≤ 25	20 (87,0%)	3 (13,0%)	0,207
> 25	52 (74,3%)	18 (25,7%)	
< 30	35 (83,3%)	7 (16,7%)	0,216
≥ 30	37 (72,5%)	14 (27,5%)	
< 40	66 (75,9%)	21 (24,1%)	0,331
≥ 40	6 (100%)	0 (0,0%)	
Total	72	21	

5.7.2. Ètnia

No es va demostrar diferències estadísticament significatives en l'evolució de les lesions CIN2 segons l'origen ètnic de les pacients incloses a l'estudi (Taula 36).

Taula 36: Resultats de l'evolució del CIN2 segons l'ètnia

Ètnia	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Caucàsica	28 (68,3%)	16 (80,0%)	11 (100,0%)	14 (66,7%)	69
Centre-Sud americana	7 (17,1%)	3 (15,0%)	0 (0,0%)	5 (23,8%)	15
Africana	5 (12,2%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	2 (9,5%)	8
Asiàtica	1 (2,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2
Total	41	20	11	21	
					P = 0,692

5.7.3. Tabac

El 52,7% (49/93) de les pacients diagnosticades de CIN2 incloses a l'estudi eren fumadores. Els resultats no van mostrar que el fet de ser o no fumadora condicionés l'evolució posterior de la lesió del CIN2 als 2 anys de seguiment, tal i com es pot extreure de les dades recollides a les taules següents (Taula 37, 38, 39 i 40):

Taula 37: Resultats del seguiment del CIN2 segons l'hàbit tabàquic

Fumador	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Si	19 (38,8%)	10 (20,4%)	6 (12,2%)	14 (28,6%)	49
No	22 (50,0%)	10 (22,7%)	5 (11,4%)	7 (15,9%)	44
					P = 0,497
Nombre de cigarrets/dia					
Mitja (desv estàndard)	5,15 (7,5)	6,15 (7,9)	8,27 (9,7)	9,0 (8,0)	P = 0,299
< 10	8 (42,1%)	3 (33,3%)	1 (16,7%)	5 (33,3%)	17
≥ 10	11 (57,9%)	6 (66,7%)	5 (83,3%)	10 (66,7%)	32
					P = 0,722

Taula 38: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons l'hàbit tabàquic

Fumador	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
Si	19 (38,8%)	30 (61,2%)	0,276
No	22 (50,0%)	22 (50,0%)	
Nombre de cigarrets/dia			
< 10	8 (47,0%)	9 (53,0%)	0,433
≥ 10	11 (34,4%)	21 (65,6%)	

Taula 39: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons l'hàbit tabàquic

Fumador	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
Si	29 (59,2%)	20 (40,8%)	0,170
No	32 (72,7%)	12 (27,3%)	
Nombre de cigarrets/dia			
Mitja (desv. Estàndard)	5,48 (7,6)	8,72 (8,5)	0,063
< 10	11 (64,7%)	6 (35,3%)	0,401
≥ 10	17 (53,1%)	15 (46,9%)	

Taula 40: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons l'hàbit tabàquic

Fumador	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Si	35 (71,4%)	14 (28,6%)	0,145
No	37 (84,1%)	7 (15,9%)	
Nombre de cigarrets/dia			
< 10	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0,850
≥ 10	22 (68,8%)	10 (31,2%)	

5.7.4. Paritat i Gestació

En la població estudiada de pacients diagnosticades de CIN2, 73,1% (68/93) eren nul·lípare. D'aquestes, el 48,5% (33/68) van regressar completament i un 19,1% (13/68) van regressar parcialment presentant un CIN1 al finalitzar el seguiment. En quan al risc de progressió, destaca que les pacients nul·lípare van progressar en un 17,6% (12/68) dels casos comparat amb el 36% (9/25) de les pacients que tenen fills ($p=0,061$).

A més a més, 11 pacients es van quedar embarassades durant els 2 anys de seguiment. Aquestes dones van presentar unes taxes de regressió completa i parcial (\leq CIN1) d'un 81,8% (9/11) comparat amb el 63,4% de regressió observat entre les dones que no es van quedar embarassades, tot i això, les diferències no són significatives (Taula 41, 42, 43 i 44).

Taula 41: Resultat del seguiment del CIN2 segons la paritat

Paritat	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
No	33 (48,5%)	13 (19,1%)	10 (14,7%)	12 (17,6%)	68
Si	8 (19,5%)	7 (35,0%)	1 (9,1%)	9 (42,9%)	25
					$P = 0,098$
Nombre de fills					
1	5 (33,3%)	5 (33,3%)	0 (0,0%)	5 (33,3%)	15
2	3 (50,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	6
≥ 3	0 (0,0%)	1 (25,0%)	1 (25,0%)	1 (25,0%)	4
					$P = 0,368$
Gestant durant l'estudi					
No	34 (41,5%)	18 (22,0%)	10 (12,2%)	20 (24,4%)	82
Si	7 (63,6%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	11
					$P = 0,526$
Total	41	20	11	21	

Taula 42: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la paritat

Paritat	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	<i>P</i>
No	33 (48,5%)	35 (51,5%)	$0,155$
Si	8 (32,0%)	17 (68,0%)	
Nombre de fills			
1	5 (33,3%)	10 (66,7%)	$0,344$
2	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
≥ 3	0 (0%)	4 (100%)	
Gestant durant l'estudi			
No	34 (41,5%)	48 (58,5%)	$0,164$
Si	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
Total	41	52	

Taula 43: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la paritat

Paritat	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
No	46 (67,6%)	22 (32,4%)	0,491
Si	15 (60,0%)	10 (40,0%)	
Nombre de fills			
1	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,489
2	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
≥ 3	1 (25,0%)	3 (75,0%)	
Gestant durant l'estudi			
No	52 (63,4%)	30 (36,6%)	0,228
Si	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
Total	61	32	

Taula 44: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la paritat

Paritat	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
No	56 (82,4%)	12 (17,6%)	0,061
Si	16 (64,0%)	9 (36,0%)	
Nombre de fills			
1	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,202
2	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
≥ 3	2 (50,0%)	2 (50,0%)	
Gestant durant l'estudi			
No	62 (75,6%)	20 (24,4%)	0,254
Si	10 (90,9%)	1 (9,1%)	
Total	72	21	

5.7.5. Mètode anticonceptiu

Es va estudiar la relació entre l'ús de diferents mètodes anticonceptius amb el resultat final de l'evolució del CIN2 (Taula 45). En el cas del preservatiu es va realitzar un segon anàlisi, segons es demostrés o no curació, regressió i progressió al cap dels dos anys de seguiment i tampoc es van evidenciar diferències estadísticament significatives entre les pacients que referien utilitzar-lo i les que no (Taula 46, 47 i 48).

Taula 45: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el mètode anticonceptiu

Mètode anticonceptiu	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Preservatiu	19 (46,3%)	9 (22,0%)	6 (14,6%)	7 (17,1%)	41
Anticoncepció hormonal	16 (43,2%)	7 (18,9%)	3 (8,1%)	11 (29,7%)	37
DIU o res	6 (40,0%)	4 (26,7%)	2 (13,3%)	3 (20,0%)	15
Total	41	20	11	21	
					P = 0,859

Taula 46: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons l'ús del preservatiu

Preservatiu	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
No	22 (42,3%)	30 (57,7%)	0,697
Si	19 (46,3%)	22 (53,7%)	
Total	41	52	

Taula 47: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons l'ús de preservatiu

Preservatiu	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
No	33 (63,5%)	19 (36,5%)	0,626
Si	28 (68,3%)	13 (31,7%)	
Total	61	32	

Taula 48: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons l'ús de preservatiu

Preservatiu	No progressió (\leq CIN2)	Progressió (CIN3)	P
No	38 (73,1%)	14 (26,9%)	0,259
Si	34 (82,9%)	7 (17,1%)	
Total	72	21	

5.7.6. Conducta sexual

La conducta sexual de les pacients pot afectar l'evolució de les lesions preinvasives. En l'anàlisi es va estudiar el possible paper del nombre de parelles sexuals, de l'edat d'inici de les relacions sexuals i de les malalties de transmissió sexual en l'evolució posterior de les lesions de CIN2 en les pacients estudiades.

5.7.6.1. Activitat sexual

En el cas de les pacients de la mostra, ni el nombre de parelles sexuals totals al llarg de la seva vida (Taula 49), ni l'edat d'inici de les relacions sexuals (Taula 50) es van demostrar com a cofactors en l'evolució de les lesions CIN 2 ($p > 0.05$).

Taula 49: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el nombre de parelles sexuals totals

Nombre parelles sexuals	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Mitja (desv. estand)	9,1 (7,8)	7,8 (4,5)	11,4 (6,1)	8,4 (5,2)	P = 0,513
< 10	23 (45,1%)	12 (23,5%)	4 (7,8%)	12 (23,5%)	51
≥ 10	18 (42,9%)	8 (19,0%)	7 (16,7%)	9 (21,4%)	42
Total	41	20	11	21	
					P = 0,614

Taula 50: Resultats de l'evolució del CIN2 segons l'edat a d'inici de les relacions sexuals

Edat d'inici de les relacions sexuals (anys)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Mitja (desv. estand)	17,6 (3,2)	17,6 (2,5)	16,8 (1,4)	17,0 (1,8)	P = 0,706
< 18	25 (61,0%)	10 (50,0%)	8 (72,7%)	13 (61,9%)	56
≥ 18	16 (39,0%)	10 (50,0%)	3 (27,3%)	8 (38,1%)	37
Total	41	20	11	21	
					P = 0,654

5.7.6.2. Malalties de transmissió sexual

Cada una de les pacients diagnosticades de CIN2, va ser sotmesa a un anàlisi serològic per tal de fer un despistatge de les malalties de transmissió sexual. Tan sols 11 pacients de les que van finalitzar l'estudi tenien IgG per VHS2 i altres 8 pacients presentaven IgG per Clamídia.

La infecció per VHS2 no va mostra associació amb l'evolució del CIN2. En canvi, l'antecedent d'infecció per Clamídia (IgG) si que influenciava en l'evolució del CIN2 (Taula 51). Categoritzant l'evolució del CIN2 en funció de la infecció per Clamídia s'observa que de les 8 pacients amb IgG+ per Clamídia, 7 (87,5%) continuaven amb lesió de CIN2+ als 2 anys de seguiment, i només

una (12,5%) va regressar, mentre que 70,6% que no presenten IgG per Clamídia van regressar ($p=0,001$) (Taules 52, 53 i 54).

Taula 51: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la *Chlamydia trachomatis*

Serologies	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
Anticossos virus herpes simple 2					
IgG -	38 (46,3%)	16 (19,5%)	11 (13,4%)	17 (20,7%)	82
IgG +	3 (27,3%)	4 (36,4%)	0 (0,0%)	4 (36,4%)	11
					P = 0,203
IgM -	40 (43,5%)	20 (21,7%)	11 (12,0%)	21 (22,8%)	92
IgM +	1 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1
					P = 0,733
Anticossos Chlamydia trachomatis					
IgG -	40 (47,1%)	20 (23,5%)	8 (9,4%)	17 (20,0%)	85
IgG +	1 (12,5%)	0 (0,0%)	3 (37,5%)	4 (50,0%)	8
					P = 0,009
IgA -	37 (48,7%)	16 (21,1%)	7 (9,2%)	16 (21,1%)	76
IgA +	4 (23,5%)	4 (23,5%)	4 (23,5%)	5 (29,4%)	17
					P = 0,181
Total	41	20	11	21	

Taula 52: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la *Chlamydia trachomatis*

Serologies	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
Anticossos Chlamydia trachomatis			
IgG -	40 (47,1%)	45 (52,9%)	0,060
IgG +	1 (12,5%)	7 (87,5%)	
IgA -	37 (48,7%)	39 (51,3%)	0,059
IgA +	4 (23,5%)	13 (76,5%)	
Total	41	52	

Taula 53: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la *Chlamydia trachomatis*

Serologies	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
Anticossos Chlamydia trachomatis			
IgG -	60 (70,6%)	25 (29,4%)	0,001
IgG +	1 (12,5%)	7 (87,5%)	
IgA -	53 (69,7%)	23 (30,3%)	0,075
IgA +	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
Total	61	32	

Taula 54: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la immunitat pel virus herpes simple tipus 2 i la *Chlamydia trachomatis*

Serologies	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Anticossos herpes simple 2			
IgG -	65 (79,3%)	17 (20,7%)	0,244
IgG +	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
IgM -	71 (77,2%)	21 (22,8%)	0,587
IgM +	1 (100%)	0 (0,0%)	
Anticossos Chlamydia trachomatis			
IgG -	68 (80,0%)	17 (20,0%)	0,052
IgG +	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
IgA -	60 (78,9%)	16 (21,1%)	0,456
IgA +	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
Total	72	21	

5.7.7. Vacunació del VPH i evolució de les lesions de CIN2

Tot i que no s'observen diferències estadísticament significatives, les 2 pacients que s'havien administrat la vacuna del VPH van regressar de la lesió de CIN2 posterior als 2 anys de seguiment, tal i com es mostra a la Taula 55.

Taula 55: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la vacunació al VPH

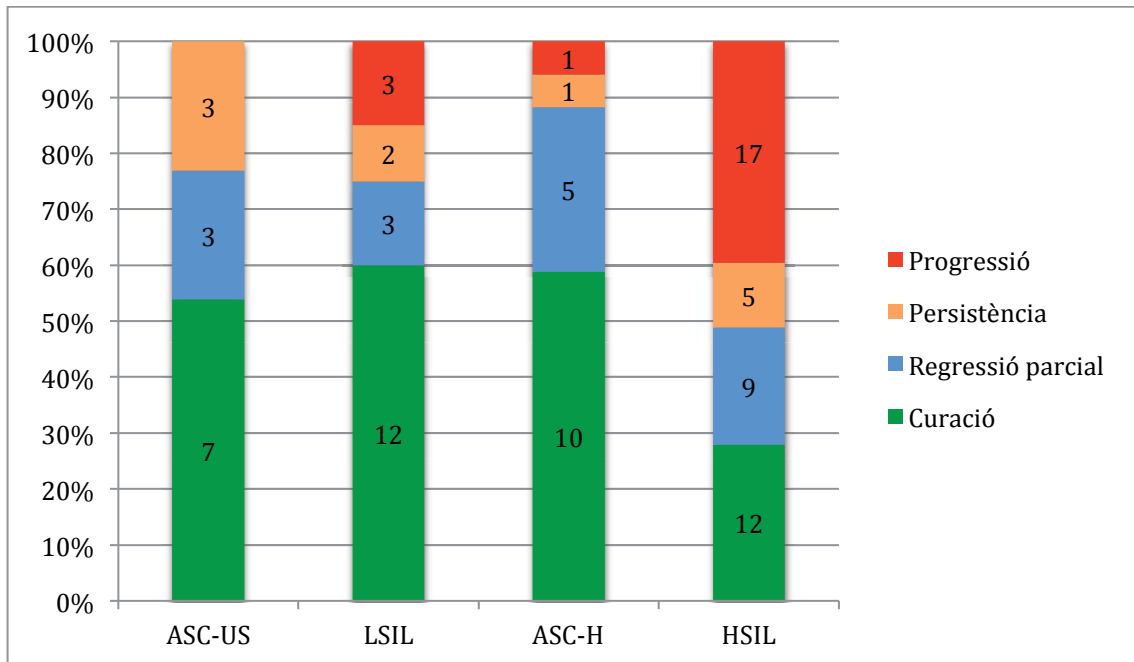
Vacunació pel VPH prèvia	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
No	40 (44,0%)	19 (20,9%)	11 (12,1%)	21 (23,1%)	91
Si	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2
	41	20	11	21	P = 0,684

5.8. FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS I EVOLUCIÓ DEL CIN2

5.8.1. Citologia prèvia

Amb la finalitat de poder establir si el resultat de la citologia prèvia al diagnòstic del CIN2 podria orientar sobre el resultat final posterior a 2 anys del CIN2, es va relacionar l'evolució de la lesió del CIN2 amb el de la citologia inicial (Gràfic 13).

Gràfic 13: Distribució de la l'evolució del CIN2 segons la citologia prèvia



A la Taula 56 es recullen els resultats de l'anàlisi entre diagnòstic de la citologia inicial i el resultat final de les lesions CIN2 mostrant associació estadística entre les 2 variables. ($p=0,028$). Com es pot observar a les Taules 57, 58 i 59, les lesions de CIN2 amb una citologia prèvia de HSIL van presentar més tendència a persistir i progressar que la resta ($p=0,013$ i $p=0,003$, respectivament).

Taula 56: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la citologia prèvia

Citologia prèvia	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
No patologia	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0
ASC-US	7 (17,1%)	3 (15,0%)	3 (27,3%)	0 (0,0%)	13
LSIL	12 (29,3%)	3 (15,0%)	2 (18,2%)	3 (14,3%)	20
ASC-H	10 (24,4%)	5 (25,0%)	1 (9,1%)	1 (4,8%)	17
HSIL	12 (29,3%)	9 (45,0%)	5 (45,5%)	17 (81,0%)	43
Total	41	20	11	21	
					$P = 0,028$

Taula 57: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la citologia prèvia

Citologia prèvia	Regressió complerta (Curació)	No curació (CIN1+)	P
ASC-US	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,035
LSIL	12 (60,0%)	8 (40,0%)	
ASC-H	10 (58,8%)	7 (41,2%)	
HSIL	12 (27,9%)	31 (72,1%)	
Total	41	52	

Taula 58: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la citologia prèvia

Citologia prèvia	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
ASC-US	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,013
LSIL	15 (75,0%)	5 (25,0%)	
ASC-H	15 (88,2%)	2 (11,8%)	
HSIL	21 (48,8%)	22 (51,2%)	
Total	61	32	

Taula 59: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la citologia prèvia

Citologia prèvia	No progressió (\leq CIN2)	Progressió (CIN3)	P
ASC-US	13 (100%)	0 (0,0%)	0,003
LSIL	17 (85,0%)	3 (15,0%)	
ASC-H	16 (94,1%)	1 (5,9%)	
HSIL	26 (60,5%)	17 (39,5%)	
Total	72	21	

Aquesta observació es va veure confirmada en fer un subanàlisi en funció de si la citologia inicial era HSIL o noHSIL (ASC-US, LSIL i ASC-H) mostrant una $p=0,002$ (Taula 60). Tal i com es pot veure a les dades recollides, el 72,1% de les lesions de CIN2 amb citologia prèvia de HSIL no es van curar, i el 39,5% van progressar a CIN3. De la mateixa manera el 58% de les lesions CIN2 amb citologia prèvia noHSIL, havien curat al cap de dos anys i només havien progressat un 8%, ($<0,005$) (Taula 61, 62 i 63).

Taula 60: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la citologia prèvia agrupada en HSIL o noHSIL

Citologia prèvia	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
noHSIL*	29 (70,7%)	11 (55,0%)	6 (54,5%)	4 (19,0%)	50
HSIL	12 (29,3%)	9 (45,0%)	5 (45,5%)	17 (81,0%)	43
Total	41	20	11	21	
					P = 0,002

*noHSIL inclou ASCUS, LSIL, ASC-H

Taula 61: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la citologia prèvia HSIL o no HSIL

Citologia prèvia	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
noHSIL	29 (58,0%)	21 (42,0%)	0,004
HSIL	12 (27,9%)	31 (72,1%)	
Total	41	52	

*noHSIL inclou ASCUS, LSIL, ASC-H

Taula 62: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la citologia prèvia HSIL o no HSIL

Citologia prèvia	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
noHSIL	40 (80,0%)	10 (20,0%)	0,002
HSIL	21 (48,8%)	22 (51,2%)	
Total	61	32	

*noHSIL inclou ASCUS, LSIL, ASC-H

Taula 63: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la citologia prèvia HSIL o no HSIL

Citologia prèvia	No progressió (\leq CIN2)	Progressió (CIN3)	P
noHSIL	46 (92,0%)	4 (8,0%)	<0,001
HSIL	26 (60,5%)	17 (39,5%)	
Total	72	21	

*noHSIL inclou ASCUS, LSIL, ASC-H

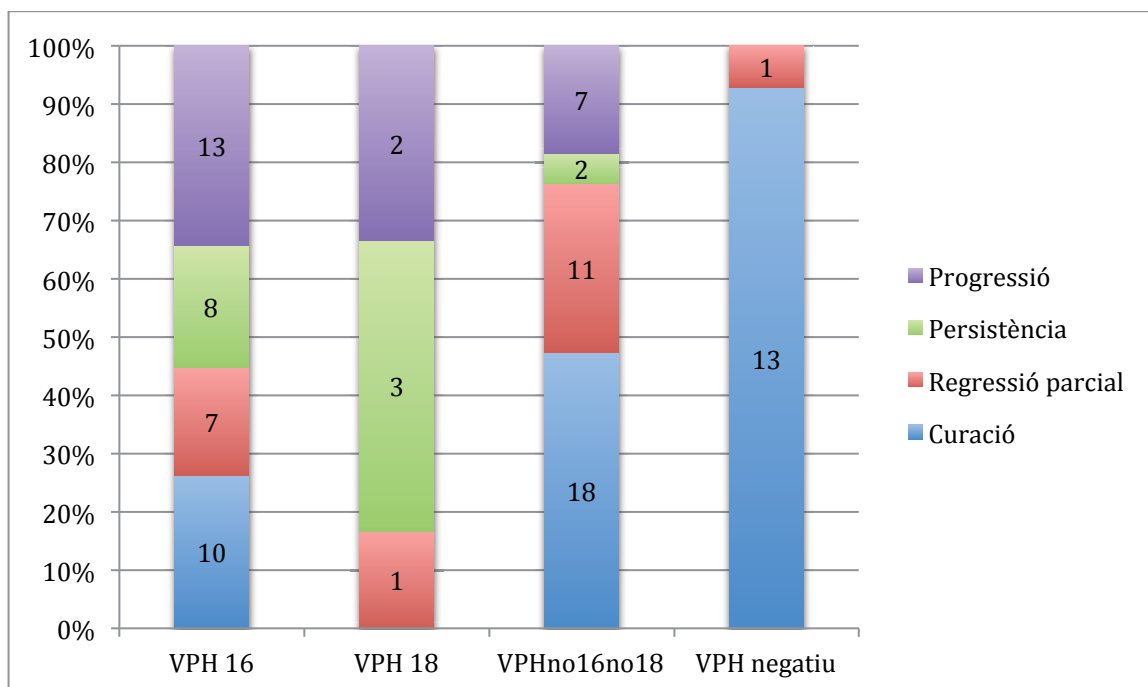
5.8.2. Genotip del VPH a la citologia

A més a més de determinar si la citologia motiu del diagnòstic del CIN2 ens podia preveure l'evolució posterior de la lesió, es va estudiar el paper que podien tenir els diferents genotips del VPH presents en la citologia en relació al diagnòstic final de les lesions de CIN2 (Gràfic 14). Com es pot observar les lesions CIN2 en les que prèviament s'havia detectat VPH-ARno16no18 o bé es van considerar VPH-ARnegatiu tenien més tendència a curar-se i regressar en els 2 anys de seguiment que les que presenten VPH16 i VPH18 amb resultats estadísticament significatius (Taula 64).

Taula 64: Distribució de l'evolució del CIN2 segons els genotip del VPH

	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
VPH AR					
Negatiu	13 (92,9%)	1 (7,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	14
Positiu	28 (35,4%)	19 (24,1%)	11 (13,9%)	21 (26,6%)	79
					P = 0,001
VPH 16					
Negatiu	31 (56,4%)	13 (23,6%)	3 (5,5%)	8 (14,5%)	55
Positiu	10 (26,3%)	7 (18,4%)	8 (21,1%)	13 (34,2%)	38
					P = 0,004
VPH 18					
Negatiu	41 (47,1%)	19 (21,8%)	8 (9,2%)	19 (21,8%)	87
Positiu	0 (0,0%)	1 (16,7%)	3 (50,0%)	2 (33,3%)	6
					P = 0,011
VPH Alt risc no 16 no 18					
Negatiu	18 (66,7%)	4 (14,8%)	1 (3,7%)	4 (14,8%)	27
Positiu	23 (34,8%)	16 (24,2%)	10 (15,2%)	17 (25,8%)	66
					P = 0,040
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)					
Negatiu	23 (41,8%)	9 (16,4%)	9 (16,4%)	14 (25,5%)	55
Positiu	18 (47,4%)	11 (28,9%)	2 (5,3%)	7 (18,4%)	38
					P = 0,200
Total	41	20	11	21	

Gràfic 14: Distribució de l'evolució del CIN2 segons els genotips del VPH



Finalment es va realitzar un anàlisi segons el genotip de VPH i el diagnòstic final de l'evolució del CIN2 agrupat per tal de veure més clarament l'associació entre el genotipat del VPH i l'evolució del CIN2, tal i com es mostra a les Taules 65, 66 i 67.

Taula 65: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons el VPH

	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
VPH AR			
Negatiu	13 (92,9%)	1 (7,1%)	<0,001
Positiu	28 (35,4%)	51 (64,6%)	
VPH 16			
Negatiu	31 (56,4%)	24 (43,6%)	0,004
Positiu	10 (26,3%)	28 (73,7%)	
VPH 18			
Negatiu	41 (47,1%)	46 (52,9%)	0,025
Positiu	0 (0,0%)	6 (100%)	
VPH Alt risc no 16 no 18			
Negatiu	18 (66,7%)	9 (33,3%)	0,005
Positiu	23 (34,8%)	43 (65,2%)	
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)			
Negatiu	23 (41,8%)	32 (58,2%)	0,596
Positiu	18 (47,4%)	20 (52,6%)	
Total	41	52	

Taula 66: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons el VPH

	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
VPH AR			
Negatiu	14 (100%)	0 (0,0%)	0,003
Positiu	47 (59,5%)	32 (40,5%)	
VPH 16			
Negatiu	44 (80,0%)	11 (20,0%)	<0,001
Positiu	17 (44,7%)	21 (55,3%)	
VPH 18			
Negatiu	60 (69,0%)	27 (31,0%)	0,009
Positiu	1 (16,7%)	5 (83,3%)	
VPH Alt risc no 16 no 18			
Negatiu	22 (81,5%)	5 (18,5%)	0,039
Positiu	39 (59,1%)	27 (40,9%)	
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)			
Negatiu	32 (58,2%)	23 (41,8%)	0,070
Positiu	29 (76,3%)	9 (23,7%)	
Total	61	32	

Taula 67: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons el VPH

	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
VPH AR			
Negatiu	14 (100%)	0 (0,0%)	0,028
Positiu	58 (73,4%)	21 (26,6%)	
VPH 16			
Negatiu	47 (85,5%)	8 (14,5%)	0,026
Positiu	25 (65,8%)	13 (34,2%)	
VPH 18			
Negatiu	68 (78,2%)	19 (21,8%)	0,515
Positiu	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
VPH Alt risc no 16 no 18			
Negatiu	23 (85,2%)	4 (14,8%)	0,252
Positiu	49 (74,2%)	17 (25,8%)	
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)			
Negatiu	41 (74,5%)	14 (25,5%)	0,425
Positiu	31 (81,6%)	7 (18,4%)	
Total	72	21	

5.8.3. Anàlisi de l'evolució del CIN2 en funció de la citologia i el genotip del VPH

Finalment es va agrupar la citologia realitzada prèvia al diagnòstic de CIN2 i el genotip del VPH que s'hi detectava amb la final evolució de la lesió de CIN 2.

En el cas de les 13 pacients amb citologia ASC-US, cap va progressar i només 3 van persistir. D'aquestes 3 en una es va detectar VPH16 i les altres dues VPHARno16no18 (Taula 68).

Taula 68: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia ASC-US

ASC-US	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
VPH AR					
Negatiu	2 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2
Positiu	5 (45,5%)	3 (27,3%)	3 (27,3%)	0 (0,0%)	11
					P = 0,363
VPH 16					
VPH 16 -	6 (60,0%)	2 (20,0%)	2 (20,0%)	0 (0,0%)	10
VPH 16 +	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	3
					P = 0,719
VPH 18					
VPH 18 -	7 (53,8%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)	0 (0,0%)	13
VPH 18+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0
					*
VPH Alt risc no 16 no 18					
Negatiu	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4
Positiu	4 (44,4%)	13 (22,2%)	3 (33,3%)	0 (0,0%)	9
					P = 0,736
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)					
Negatiu	3 (60,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	0 (0,0%)	5
Positiu	4 (50,0%)	2 (25,0%)	2 (25,0%)	0 (0,0%)	8
					P = 0,940
Total	7	3	3	0	

* No es pot calcular

En el cas de les 20 lesions de CIN2 amb citologia prèvia de LSIL, es va observar una relació estadísticament significativa amb l'evolució de la lesió de CIN2 i el genotipat del VPH. La detecció del VPH16 en citologies de LSIL es va associar a més risc de persistència i progressió de les lesions de CIN2 que en els casos de VPH16 negatiu ($p=0,020$) (Taula 69).

Taula 69: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia LSIL

LSIL	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
VPH AR					
Negatiu	3 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3
Positiu	9 (52,9%)	3 (17,6%)	2 (11,8%)	3 (17,6%)	17
					P = 0,502
VPH 16					
VPH16 -	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11
VPH16 +	3 (33,3%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	9
					P = 0,020
VPH 18					
VPH 18 -	12 (60,0%)	3 (15,0%)	2 (10,0%)	3 (15,0%)	20
VPH 18+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0
					*
VPH Alt risc no 16 no 18					
Negatiu	5 (71,4%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	7
Positiu	7 (53,8%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)	13
					P = 0,793
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)					
Negatiu	6 (50,0%)	1 (8,3%)	2 (16,7%)	3 (25,0%)	12
Positiu	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8
					P = 0,301
Total	12	3	2	3	

*No es pot calcular

La citologia de ASC-H va ser la causant del diagnòstic histològic de CIN2 en 17 casos. El genotip del VPH present a la citologia ASC-H no mostrà diferències estadísticament significatives respecte a l'evolució posterior del CIN2 (Taula 70).

Taula 70: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia ASC-H

ASC-H	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
VPH AR					
Negatiu	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6
Positiu	5 (45,5%)	4 (36,4%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	11
					P = 0,830
VPH 16					
VPH16 -	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11
VPH16 +	2 (33,3%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	6
					P = 0,219
VPH 18					
VPH 18 -	10 (62,5%)	4 (25,0%)	1 (6,3%)	1 (6,3%)	16
VPH 18+	0 (0,0%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1
					P = 0,412
VPH Alt risc no 16 no 18					
Negatiu	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8
Positiu	4 (44,4%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	9
					P = 0,689
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)					
Negatiu	7 (53,8%)	4 (30,8%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	13
Positiu	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4
					P = 0,830
Total	10	5	1	1	

La majoria dels casos amb biòpsia de CIN2 de la nostra població d'estudi presentaven una citologia prèvia de HSIL (46,2%). Es va relacionar el genotip de VPH present a aquests lesions citològiques i l'evolució posterior dels CIN2 (Taula 71). Destacar que es va observar una associació estadísticament significativa entre l'evolució del CIN2 i la citologia prèvia HSIL amb VPH18+. Les 5 lesions de CIN2 amb citologia HSIL i VPH18 havien persistit o progressat als dos anys de seguiment ($p=0,006$). En el cas del VPH16, el 45% de les lesions de CIN2 amb citologia prèvia de HSIL i VPH16+ van progressar i el 20% van persistir, i el 39,1%, dels casos de VPH16 negatiu va persistir o progressar, sense trobar diferències estadísticament significatives.

Taula 71: Resultats de l'evolució del CIN2 segons el genotip del VPH en casos de citologia HSIL

HSIL	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
VPH AR					
Negatiu	3 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3
Positiu	9 (22,5%)	9 (22,5%)	5 (12,5%)	17 (42,5%)	40
					P = 0,071
VPH 16					
VPH16 -	8 (34,8%)	6 (26,1%)	1 (4,3%)	8 (34,8%)	23
VPH16 +	4 (20,0%)	3 (15,0%)	4 (20,0%)	9 (45,0%)	20
					P = 0,285
VPH 18					
VPH 18 -	12 (31,6%)	9 (23,7%)	2 (5,3%)	15 (39,5%)	38
VPH 18+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (60,0%)	2 (40,0%)	5
					P = 0,006
VPH Alt risc no 16 no 18					
Negatiu	4 (50,0%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	3 (17,6%)	8
Positiu	8 (22,9%)	8 (22,9%)	5 (14,3%)	14 (40,0%)	35
					P = 0,494
VPH Alt risc no 16 no 18 (descartant coinfecció amb VPH16 i VPH 18)					
Negatiu	7 (28,0%)	3 (12,0%)	5 (20,0%)	10 (40,0%)	25
Positiu	5 (27,8%)	6 (33,3%)	0 (0,0%)	7 (38,9%)	18
					P = 0,124
Total	12	9	5	17	

5.9. CÈL·LULES NK I EVOLUCIÓ DEL CIN2

La hipòtesis de l'estudi estableix que una menor expressió de receptors de les cèl·lules NK podria presentar menor capacitat de regressió espontània de les lesions intraepiteliais cervical de CIN2.

5.9.1. Anàlisi de l'evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK

En les taules següents es recullen les dades de l'anàlisi de la relació entre el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK i l'evolució final de les lesions de CIN2 (Taula 72-75).

Taula 72: Poblacions de cèl·lules NK segons l'evolució de les lesions de CIN2

Receptor NK Mitja (des.estand)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Cèl NK totals	12,9 (7,3)	10,9 (4,7)	12,4 (4,4)	12,4 (8,3)	0,824
NKG2A	43,5 (15,7)	42,6 (15,4)	36,3 (12,1)	46,6 (17,0)	0,370
NKG2C	24,2 (18,4)	27,0 (23,1)	23,7 (17,4)	15,3 (9,2)	0,348
NKG2D	68,8 (26,8)	64,8 (29,1)	83,7 (11,9)	65,5 (19,9)	0,188
ILT2	15,8 (16,7)	12,1 (12,9)	37,2 (27,2)	13,0 (12,8)	0,082
KIR	54,9 (14,6)	59,1 (19,9)	64,1 (12,1)	52,2 (15,8)	0,146
Total	41	20	11	21	

Taula 73: Poblacions de cèl·lules NK segons curació vs no curació del CIN2

Receptor NK Mitja (des.estand)	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
NKG2A	43,5 (15,7)	42,8 (15,6)	0,703
NKG2C	24,2 (18,4)	21,6 (17,9)	0,521
NKG2D	68,8 (26,8)	69,0 (23,6)	0,838
ILT2	15,8 (16,7)	16,5 (17,8)	0,924
KIR	54,9 (14,6)	57,4 (17,2)	0,439
Total	41	52	

Taula 74: Poblacions de cèl·lules NK segons regressió vs persistència/progressió del CIN2

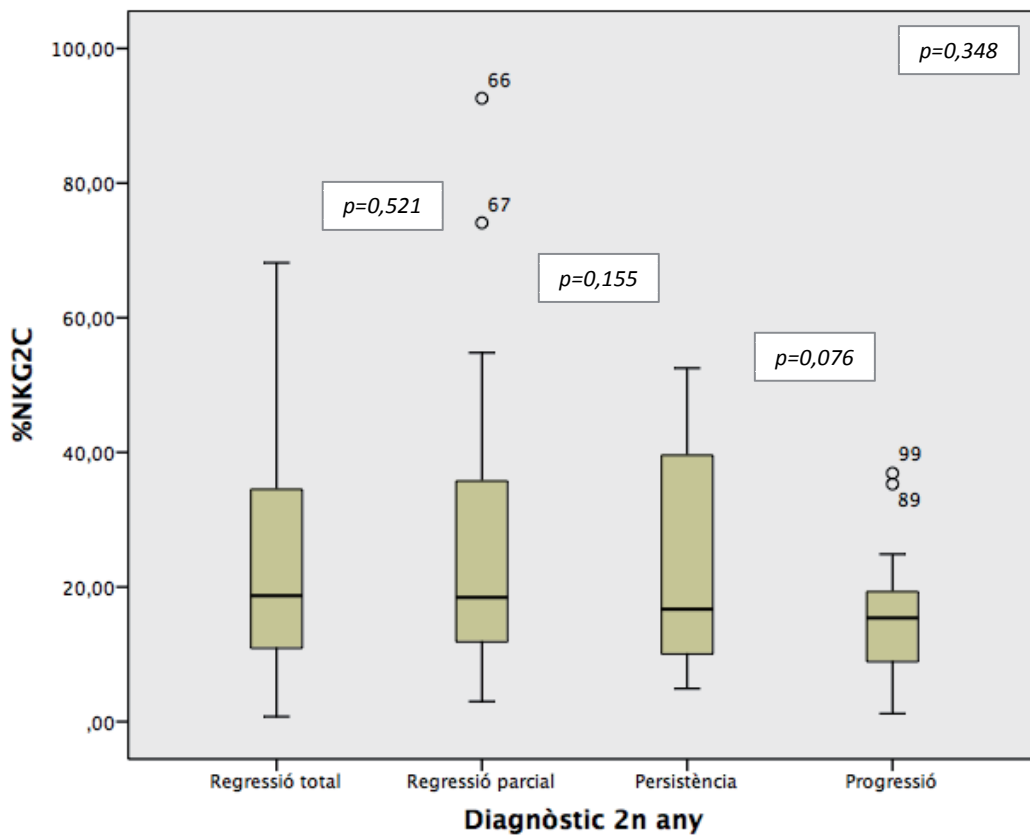
Receptor NK Mitja (des.estand)	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
NKG2A	43,2 (15,5)	42,9 (16,0)	0,772
NKG2C	25,1 (19,9)	18,2 (13,0)	0,155
NKG2D	67,5 (27,4)	71,7 (19,5)	0,818
ILT2	14,6 (15,5)	19,0 (19,9)	0,320
KIR	56,3 (16,5)	56,3 (15,6)	0,894
Total	61	32	

Taula 75: Poblacions de cèl·lules NK segons progressió vs no progressió del CIN2

Receptor NK Mitja (des.estand)	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
NKG2A	42,1 (15,1)	46,6 (16,9)	0,341
NKG2C	24,9 (19,4)	15,3 (9,2)	0,076
NKG2D	70,0 (26,2)	65,5 (19,9)	0,213
ILT2	17,4 (18,5)	13,0 (12,8)	0,601
KIR	57,5 (16,1)	52,2 (15,8)	0,186
Total	72	21	

De manera global s'observa una tendència no significativa a presentar menys percentatge d'expressió de receptor NKG2C en els casos de progressió del CIN2 que en els casos de regressió on observem més expressió NKG2C. Al Gràfic 15 de continuació es pot observar aquesta tendència.

Gràfic 15: Representació de la proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2



5.9.2. Anàlisi de l'evolució del CIN2 en funció de la infecció del CMV

Com s'ha comentat anteriorment, la infecció pel CMV s'associa a canvis en la distribució dels receptors de les cèl·lules NK. Per aquest motiu, es va estudiar la relació entre l'evolució del CIN2 en funció de si les pacients havien passat o no la infecció del CMV. En 71% de les pacients incloses que van finalitzar el seguiment presentava anticossos IgG per CMV en sang.

Es va analitzar si la pròpia immunitat envers a la infecció pel CMV podia ajudar a predir la evolució del CIN2. Tot i que es va observar una tendència a que les lesions de CIN2 de pacients amb immunitat per CMV no regressaven tant com les lesions de pacients amb IgG negatives per CMV, aquesta diferència no va ser significativa (Taula 76-79).

Taula 76: Resultats de l'evolució del CIN2 segons la infecció del CMV

Anticossos CMV	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
IgG -	16 (59,3%)	5 (18,5%)	1 (3,7%)	5 (18,5%)	27
IgG +	25 (37,9%)	15 (22,7%)	10 (15,2%)	16 (24,2%)	66
					P = 0,208
Total	41	20	11	21	

Taula 77: Comparació de curació vs no curació del CIN2 segons la infecció del CMV

Anticossos CMV	Regressió completa (Curació)	No curació (CIN1+)	P
IgG -	16 (59,3%)	11 (40,7%)	0,059
IgG +	25 (37,9%)	41 (62,1%)	
Total	41	52	

Taula 78: Comparació de regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la infecció del CMV

Anticossos CMV	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
IgG -	21 (77,8%)	6 (22,2%)	0,114
IgG +	40 (60,6%)	26 (39,4%)	
Total	61	32	

Taula 79: Comparació de progressió vs no progressió del CIN2 segons la infecció del CMV

Anticossos CMV	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
IgG -	22 (81,5%)	5 (18,5%)	0,549
IgG +	50 (75,8%)	16 (24,2%)	
Total	72	21	

5.9.3. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i el CMV

A continuació, es va correlacionar el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK i l'evolució del CIN2 en funció de la immunitat prèvia a CMV (Taula 80). En pacients no immunes al CMV (CMV-) l'expressió de les cèl·lules NK no es va modificar i per tant no s'observa relació entre la seva expressió i l'evolució del CIN2. En canvi, les pacients immunes a CMV (CMV+) presentaven diferències en l'expressió de les cèl·lules NK i aquestes diferències es correlacionen amb l'evolució del CIN2. De manera global (Taula 80) s'observa que les pacients CMV+ amb menor expressió de NKG2C, NKG2D i ILT2 tenen més tendència a progressar que les que mostren major expressió ($p=0,060$, $p=0,028$, $p=0,077$, respectivament).

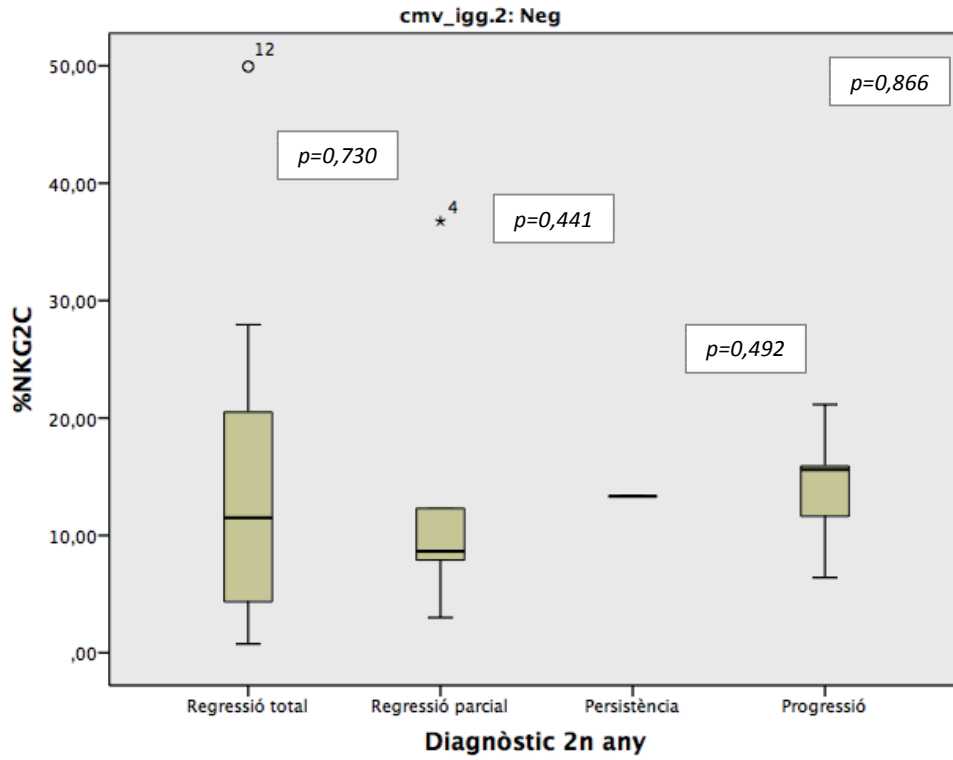
Taula 80: Poblacions de cèl·lules NK segons l'evolució del CIN2 i la infecció pel CMV

Receptor NK Mitja (des.estand)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Cèl NK totals					
CMV-	12,9 (7,4)	11,8 (3,1)	14,9*	10,1 (6,7)	0,580
CMV+	12,9 (7,3)	10,7 (5,3)	12,1 (4,5)	13,1 (8,7)	0,894
NKG2A					
CMV-	50,7 (13,7)	50,1 (12,7)	51,4*	49,0 (17,3)	0,998
CMV+	39,0 (15,3)	40,0 (15,8)	34,7 (11,6)	46,0 (17,4)	0,308
NKG2C					
CMV-	13,9 (12,5)	13,7 (13,3)	13,3*	14,1 (5,5)	0,866
CMV+	30,7 (18,7)	31,4 (24,3)	24,7 (17,9)	15,7 (10,3)	0,060
NKG2D					
CMV-	60,5 (25,5)	63,3 (33,3)	62,9*	81,8 (18,3)	0,404
CMV+	74,1 (26,9)	65,3 (28,9)	85,7 (10,2)	60,3 (17,9)	0,028
ILT2					
CMV-	7,1 (7,7)	11,1 (13,9)	32,8*	19,2 (14,9)	0,193
CMV+	21,2 (18,6)	12,6 (13,3)	38,0 (30,3)	10,6 (11,7)	0,077
KIR					
CMV-	47,7 (11,4)	46,1 (20,1)	53,7*	46,9 (17,9)	0,936
CMV+	59,5 (14,8)	63,4 (18,5)	65,2 (12,2)	53,8 (15,3)	0,234
Total	41	20	11	21	

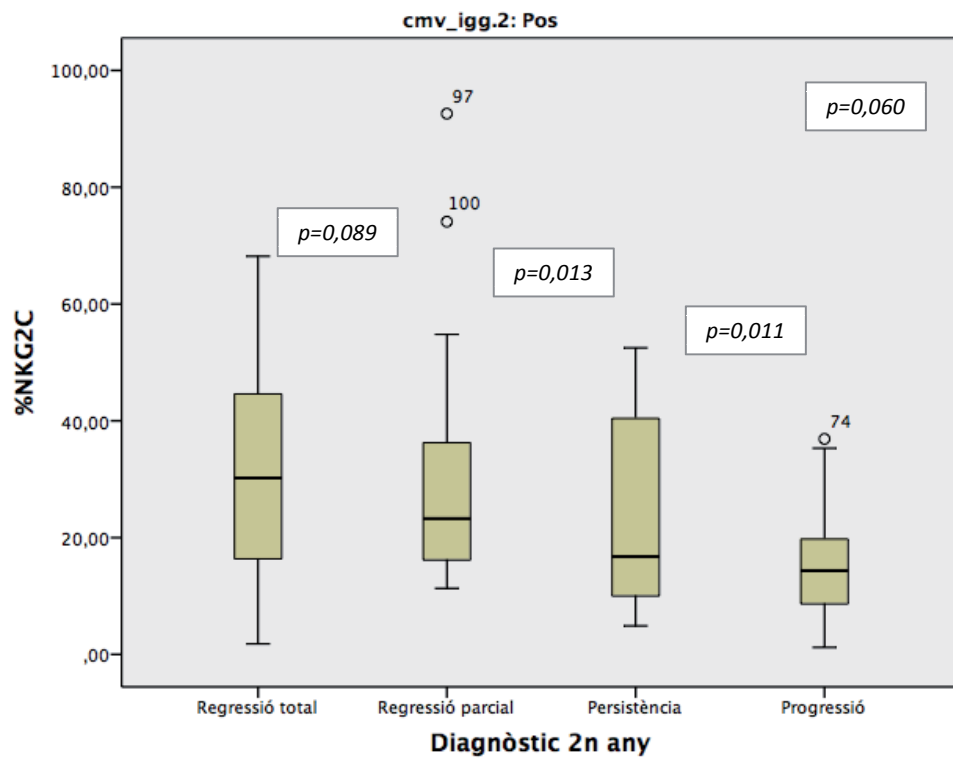
*No es pot calcular la desviació estàndard perquè només hi ha un cas

Els gràfics 16 i 17 es representa el percentatge d'expressió del receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 en pacients CMV+ i CMV-.

Gràfic 16: Representació de la proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 en pacients CMV negatives



Gràfic 17: Representació de la proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 en pacients CMV positives



Les taules següents recullen els nivells d'expressió dels diferents receptors de les cèl·lules NK, segons immunitat envers CMV i l'evolució final de les lesions CIN2 agrupada. S'observa una associació estadísticament significativa entre l'expressió de receptors de cèl·lules NK i l'evolució del CIN2 en les pacients CMV+ (Taulas 81-83). Concretament s'observa una tendència entre l'expressió mitjana del receptor NKG2C i l'evolució del CIN2 en pacients CMV+ ($p=0,060$) (Gràfic 17). El receptor NKG2C s'expressa en major proporció en les pacients CMV+ que regressen que en les que no regressen ($p=0,013$). A part, comparant les pacients CMV+ que van progressar a CIN3 i l'expressió NKG2C, s'observa que les pacients que no van progressar a CIN3 tenien una expressió mitjana del receptor NKG2C de 29,7 comparada amb el 15,7 de les que van progressar, essent aquesta diferència estadísticament significativa ($p=0,011$). De manera semblant es va comportar l'expressió mitjana del receptor NKG2D respecte a la progressió o no a CIN3 (60,3 vs 73,8; $p=0,014$). Finalment, tot i que l'expressió mitjana de NKG2A entre les pacients CMV+ que van regressar va ser menor en comparació amb les que van progressar, aquesta diferència no va ser significativa (39,0 vs 46,0; $p>0,05$)

Taula 81. Poblacions de cèl·lules NK comparant curació vs no curació de les lesions de CIN2 en funció de la infecció pel CMV

Receptor NK % Mitja (des. stand)	Regressió complerta (Curació)	No curació (CIN1+)	P
NKG2A			
CMV-	50,7 (13,7)	49,8 (13,2)	0,958
CMV+	38,9 (15,3)	41,1 (15,8)	0,746
NKG2C			
CMV-	13,9 (12,5)	13,9 (9,1)	0,730
CMV+	30,7 (8,7)	23,7 (19,2)	0,089
NKG2D			
CMV-	60,5 (25,3)	71,7 (25,9)	0,246
CMV+	74,2 (26,9)	68,3 (23,2)	0,180
ILT2			
CMV-	7,1 (7,7)	17,3 (14,5)	0,105
CMV+	21,2 (18,6)	16,2 (19,1)	0,265
KIR			
CMV-	47,7 (11,4)	47,2 (17,2)	0,882
CMV+	59,5 (14,8)	60,1 (16,4)	0,942
Total	41	52	

*Mann-Whitney

Taula 82: Poblacions de cèl·lules NK comparant regressió vs persistència/progressió del CIN2 segons la infecció pel CMV

Receptor NK % Mitja (des.estand)	Regressió (<CIN2)	Persistència/Progressió (CIN2+)	P
NKG2A			
CMV-	50,5 (13,2)	49,5 (15,0)	0,974
CMV+	39,4 (15,3)	41,7 (16,2)	0,699
NKG2C			
CMV-	13,8 (12,3)	14,0 (4,9)	0,441
CMV+	31,0 (20,7)	19,2 (14,1)	0,013
NKG2D			
CMV-	61,2 (26,5)	78,6 (18,1)	0,175
CMV+	70,8 (27,6)	70,1 (19,3)	0,447
ILT2			
CMV-	8,1 (9,3)	21,5 (14,5)	0,080
CMV+	18,1 (17,1)	18,2 (21,7)	0,955
KIR			
CMV-	47,3 (13,4)	48,0 (16,3)	0,887
CMV+	60,9 (16,1)	58,2 (15,1)	0,555
Total	61	32	

*Mann-Whitney

Taula 83: Poblacions de cèl·lules NK comparant progressió vs no progressió del CIN2 segons la infecció pel CMV

Receptor NK % Mitja (des.estand)	No progressió (≤CIN2)	Progressió (CIN3)	P
NKG2A			
CMV-	50,6 (12,9)	49,0 (17,3)	0,943
CMV+	38,4 (14,7)	46,0 (17,4)	0,111
NKG2C			
CMV-	13,8 (12,0)	14,1 (5,5)	0,492
CMV+	29,7 (20,2)	15,7 (10,3)	0,011
NKG2D			
CMV-	61,3 (25,8)	81,8 (18,3)	0,098
CMV+	73,8 (25,7)	60,3 (17,9)	0,014
ILT2			
CMV-	9,7 (10,1)	19,2 (14,9)	0,283
CMV+	21,1 (20,4)	10,6 (1,7)	0,157
KIR			
CMV-	47,6 (13,1)	46,9 (17,9)	0,662
CMV+	61,8 (15,4)	53,8 (15,3)	0,077
Total	72	21	

*Mann-Whitney

5.9.4. Evolució del CIN2 en funció de la genètica NKG2C

Amb la finalitat de poder establir el possible paper del genotipat del gen NKG2C amb la diferent expressió del receptor NKG2C de les cèl·lules NN en l'evolució de les lesions de CIN2, es van analitzar les dades de manera global (TAULA 84) i també en funció de l'estatus de immunitat envers el CMV (TAULA 85 i 86), sense trobar diferències estadísticament significatives.

Taula 84: Relació de l'evolució del CIN2 segons el genotip del NKG2C

NKG2C	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
NKG2C+/+	21 (43,8%)	13 (27,1%)	6 (12,5%)	8 (16,7%)	48
NKG2C+/del	6 (33,3%)	3 (16,7%)	2 (11,1%)	7 (38,9%)	18
NKG2Cdel/del	6 (66,7%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	9
					P = 0,390
Total	33	17	9	16	

*Homozigot (NKG2C+/+), Heterozigot (NKG2C+/del) i doble delecció (NKG2Cdel/del)

Taula 85: Relació de l'evolució del CIN2 segons el genotip del NKG2C en pacients CMV negatives

CMV negatiu					
NKG2C	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
NKG2C+/+	4 (80,0%)	1 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5
NKG2C+/del	1 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)	2
NKG2Cdel/del	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6
					P = 0,598
Total	10	2	0	1	

*Homozigot (NKG2C+/+), Heterozigot (NKG2C+/del) i doble delecció (NKG2Cdel/del)

Taula 86: Relació de l'evolució del CIN2 segons el genotip del NKG2C en pacients CMV positives

CMV positiu					
NKG2C	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	Total
NKG2C+/+	17 (39,5%)	12 (27,9%)	6 (14,0%)	8 (18,6%)	43
NKG2C+/del	5 (31,3%)	3 (18,8%)	2 (12,5%)	6 (37,5%)	16
NKG2Cdel/del	1 (33,3%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	3
					P = 0,620
Total	23	15	9	15	

*Homozigot (NKG2C+/+), Heterozigot (NKG2C+/del) i doble delecció (NKG2Cdel/del)

5.9.5. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i el VPH

Tot i que no es va aconseguir demostrar diferències en l'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en funció de la detecció del VPH-AR (Taulas 25-29), es va voler determinar si l'expressió de les cèl·lules NK era diferent en funció de la presència o no de VPH-AR en relació a l'evolució de les lesions de CIN2. Tot i observant-se una tendència a que les lesions que més van progressar tenien major percentatge d'expressió del receptor NKG2A i menys NKG2C que les que van regressar, no es va evidenciar diferències estadísticament significatives (Taula 87).

Taula 87: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció del VPH

Receptor NK % Mitja (des. estand)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Cèl NK totals					
VPH AR -	13,2 (7,4)	10,7*	*	*	0,901
VPH AR +	12,8 (7,3)	10,9 (4,9)	12,4 (4,4)	12,4 (8,3)	0,881
NKG2A					
VPH AR -	51,4 (15,9)	35,9*	*	*	0,535
VPH AR +	39,8 (14,4)	42,9 (15,8)	36,3 (12,1)	46,6 (16,9)	0,325
NKG2C					
VPH AR -	25,9 (18,7)	12,3*	*	*	0,385
VPH AR +	23,4 (18,5)	27,8 (23,5)	23,7 (17,4)	15,3 (9,2)	0,365
NKG2D					
VPH AR -	70,8 (25,3)	79,7*	*	*	0,901
VPH AR +	67,9 (27,9)	64,0 (29,7)	83,7 (11,9)	65,5 (19,9)	0,176
ILT2					
VPH AR -	13,8 (15,4)	*	*	*	*
VPH AR +	16,5 (17,4)	12,1 (12,9)	37,2 (27,2)	12,9 (12,8)	0,086
KIR					
VPH AR -	55,3 (11,5)	64,5*	*	*	0,264
VPH AR +	54,7 (16,0)	58,8 (20,4)	64,1 (12,1)	52,2 (15,8)	0,200
Total	41	20	11	21	

*No es pot calcular

Es van repetir els mateixos anàlisis en funció del VPH16 present a la citologia prèvia al diagnòstic del CIN 2 (Taula 88). No es va demostrar relació entre el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK i la presència del VPH16 en l'evolució de les lesions de CIN2. Destaca l'expressió del receptor ILT2 amb resultat significatiu, però mirant els seus valors i comparant curació vs progressió la diferència no és clínicament valorable.

Taula 88: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció del VPH16

Receptor NK % Mitja (des.estand)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Cèl NK totals					
VPH16 –	13,2 (6,8)	10,0 (4,2)	9,8 (6,1)	14,4 (7,7)	0,449
VPH 16 +	11,9 (8,9)	12,8 (5,4)	13,4 (3,6)	11,2 (8,6)	0,445
NKG2A					
VPH 16 -	44,0 (15,1)	36,6 (12,7)	33,2 (8,2)	40,7 (16,9)	0,388
VPH 16 +	42,0 (18,1)	53,6 (14,5)	37,4 (13,6)	50,5 (16,5)	0,190
NKG2C					
VPH 16 -	24,7 (17,1)	32,2 (26,3)	20,1 (17,2)	14,4 (10,3)	0,322
VPH 16 +	22,6 (22,8)	17,4 (11,9)	25,0 (18,4)	15,9 (8,9)	0,831
NKG2D					
VPH 16 -	71,1 (27,2)	62,7 (29,3)	89,6 (16,2)	67,9 (17,4)	0,217
VPH 16 +	61,9 (25,6)	68,7 (30,5)	81,5 (10,4)	63,9 (21,8)	0,281
ILT2					
VPH 16 -	17,3 (16,2)	6,7 (8,6)	11,7*	19,9 (12,7)	0,169
VPH 16 +	10,4 (19,1)	17,5 (14,8)	42,3 (27,0)	8,5 (11,3)	0,025
KIR					
VPH 16 -	55,4 (13,7)	61,3 (18,8)	71,1 (20,1)	58,5 (18,2)	0,233
VPH 16 +	53,3 (17,8)	54,9 (22,7)	61,5 (13,4)	48,2 (13,4)	0,311
Total	41	20	11	21	

5.9.7. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i la infecció pel VHS2

De la mateixa manera es va intentar demostrar si la immunitat envers al VHS2 condicionava una distribució diferent de receptors de NK i de l'evolució de les lesions de CIN 2 després de dos anys de seguiment clínic, sense trobar diferències estadísticament significatives (Taula 90).

Taula 90: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció pel virus herpes simple 2

Receptor NK % Mitja (des. estand)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Cèl NK totals					
IgG VHS2 -	12,7 (7,3)	11,1 (3,9)	12,4 (4,4)	10,1 (6,9)	0,361
IgG VHS2+	15,9 (6,7)	10,3 (8,1)	**	22,1 (7,0)	0,126
NKG2A					
IgG VHS2 -	43,3 (15,9)	41,1 (14,7)	36,3 (12,1)	44,7 (17,1)	0,516
IgG VHS2+	45,7 (14,8)	48,5 (19,3)	**	54,2 (16,3)	0,840
NKG2C					
IgG VHS2 -	23,0 (16,9)	28,8 (25,3)	23,7 (17,4)	13,8 (8,8)	0,191
IgG VHS2+	38,4 (33,5)	19,9 (9,9)	**	22,1 (8,9)	0,498
NKG2D					
IgG VHS2 -	66,9 (26,9)	66,9 (28,8)	83,7 (11,9)	63,9 (20,5)	0,175
IgG VHS2+	93,2 (8,9)	55,9 (32,9)	**	72,0 (17,8)	0,241
ILT2					
IgG VHS2 -	14,5 (15,3)	13,7 (13,9)	37,2 (27,2)	10,4 (12,0)	0,065
IgG VHS2+	53,4*	6,1 (6,7)	**	21,8 (13,5)	0,143
KIR					
IgG VHS2 -	54,1 (14,6)	57,6 (20,3)	64,1 (12,1)	52,8 (16,1)	0,156
IgG VHS2+	64,6 (12,9)	65,0 (19,7)	**	49,6 (16,6)	0,417
Total	41	20	11	21	

5.9.8. Evolució del CIN2 en funció de les cèl·lules NK i la infecció per *Chlamydia trachomatis*

Donades les dades de l'aparat 5.7.6.2 que orientaven a que tenir l'antecedent d'infecció antiga per Clamídia (IgG+) podia influenciar en l'evolució del CIN2 (Taula 51), es va voler determinar si l'expressió la presència o no de la immunitat envers la Clamídia condicionava una expressió diferent de les cèl·lules NK i els seus receptors que predis l'evolució de les lesions de CIN2. El resultat de l'anàlisi es recull a la Taula 91, i com es pot observar no es van trobar diferències estadísticament significatives.

Taula 91: Poblacions de cèl·lules NK en funció de l'evolució de les lesions de CIN2 i de la infecció per *Chlamydia Trachomatis*

Receptor NK % Mitja (des. estand)	Regressió completa (Curació)	Regressió parcial (CIN1)	Persistència (CIN2)	Progressió (CIN3)	P
Cèl NK totals					
IgG CHL -	12,5 (6,9)	11,0 (4,8)	13,2 (3,8)	12,4 (7,6)	0,760
IgG CHL+	28,4*	**	10,2 (5,9)	12,2 (11,8)	0,499
NKG2A					
IgG CHL -	43,7 (15,98)	42,6 (15,4)	37,6 (13,4)	46,6 (17,3)	0,668
IgG CHL+	35,0 *	**	32,7 (8,7)	46,5 (17,9)	0,499
NKG2C					
IgG CHL -	24,7 (18,2)	27,0 (23,1)	28,6 (17,8)	15,9 (9,5)	0,290
IgG CHL+	2,7*	**	10,5 (6,0)	13,2 (8,7)	0,489
NKG2D					
IgG CHL -	69,3 (27,0)	64,8 (29,1)	80,2 (11,1)	67,3 (21,5)	0,703
IgG CHL+	52,5*	**	93,0 (10,2)	57,7 (8,7)	0,074
ILT2					
IgG CHL -	15,8 (16,7)	12,1 (12,9)	34,6 (29,6)	13,1 (13,1)	0,205
IgG CHL+	**	**	50,0*	12,5 (13,8)	0,157
KIR					
IgG CHL -	54,5 (14,6)	59,1 (19,9)	62,3 (13,7)	51,0 (15,6)	0,245
IgG CHL+	69,2 *	**	68,9 (5,0)	57,2 (18,2)	0,683
Total	41	20	11	21	

5.10. MODEL MULTIVARIANT

5.10.1. Model multivariat de regressió logística binària de CIN2+

Amb la finalitat de poder averiguar si realment existia alguna associació entre les variables estudiades, es va realitzar un model multivariant. El model multivariant de regressió logística binària (RLB) es va calcular mitjançant el mètode jeràrquic en el qual es van anar eliminant una a una les variables que no resultaven significatives en l'anàlisi bivariat fins assolir el millor model predictiu final.

El model multivariant de regressió logística binària de CIN2+ (Taula 92) mostra que les pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 i IgG Clamídia positiu tenien 19 vegades més de possibilitats de presentar CIN2+ posterior als 2 anys de seguiment. En el cas de citologia prèvia de HSIL o presència del VPH16 a la citologia prèvia al diagnòstic, les pacients tenien 5 vegades més de possibilitats de presentar CIN2+ en els 2 anys posteriors al diagnòstic de manera independent. Mentre que si a més a més de presentar una citologia

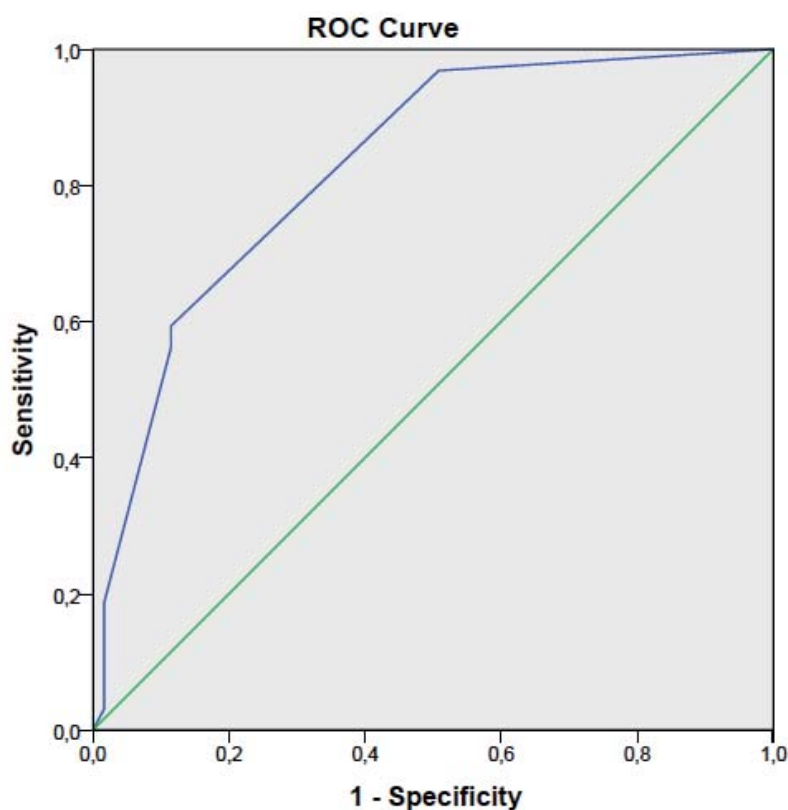
prèvia de HSIL, en aquesta es detectava el VPH16 de manera concomitant, les pacients tenien 25 vegades més de risc de presentar CIN2+ posterior als 2 anys de seguiment.

Taula 92: Model multivariant de RLB de CIN2+

VARIABLE	OR (95% IC)	P
IgG Clamídia positiu	19,1 (1,9-189,7)	0,012
Citologia prèvia HSIL	5,0 (1,7-14,6)	0,003
VPH16 positiu	4,8 (1,7-13,7)	0,003

La Corba ROC (Gràfic 18) ens mostra la capacitat de discriminació del model multivariant de regressió logística binària calculat, mostrant una àrea sota la corba (95% IC): 0,829, (0,744-0,913), el que indica que és model predictiu molt bo.

Gràfic 18: Corba ROC de la capacitat de discriminació del model multivariant de RLB de CIN2+



Capacitat de discriminació del model, ASC (95% IC):0,829 (0,744-0,913)
Calibració del model, Hosmer-Lemesow test: p=0,724

A continuació es mostra com exemple la distribució de les pacients incloses en l'estudi en funció d'aquestes variables per tal de poder posar en pràctica el model i la seva significància. Aquesta Taula 93 ens mostra que només pel fet de presentar immunitat envers la Clamídia (IgG+), gairebé totes les pacients presentaran CIN2+ com a diagnòstic final posterior als 2 anys de seguiment independentment dels altres cofactors. Ja que de les 8 pacients amb IgG Clamídia positiu, totes presenten CIN2+ excepte 1 pacient en la que es va detectar el VPH18 positiu. Tot i això, la majoria de pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 no van presentar immunitat IgG envers la Clamídia (IgG-) en el moment del diagnòstic. En aquests casos és on entren en joc els altres factors estudiats i analitzats. Tal i com es pot veure a la Taula 93, el 33% de pacients amb CIN2 que presentaven una citologia HSIL o VPH16 en el moment del diagnòstic, van evolucionar a CIN2+ als 2 anys de seguiment, mentre que si presentaven conjuntament citologia HSIL i VPH16, el 66% de les pacients evolucionava a CIN2+ al cap dels 2 anys. Contràriament, les pacients amb CIN2 que en el moment del diagnòstic no es va detectar IgG+ per a Clamídia, i no tenien citologia HSIL, ni s'hi detectava el VPH16, tenien gairebé un 100% (96,8%) de possibilitats de regressar espontàniament als 2 anys de seguiment.

Taula 93: Taula mostrant del model multivariant en les pacients incloses a l'estudi

VARIABLES			DIAGNÒSTIC FINAL		Total
Clamídia	Citologia	VPH 16	Regressió (<CIN2)	CIN2+	
IgG (-)	No HSIL	VPH 16 (-)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	31
		VPH 16 (+)	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15
	HSIL	VPH 16 (-)	14 (66,7%)	7 (33,3%)	21
		VPH 16 (+)	6 (33,3%)	12 (66,7%)	18
IgG (+)	No HSIL	VPH 16 (-)	0 (0,0%)	1 (100%)	1
		VPH 16 (+)	0 (0,0%)	3 (100%)	3
	HSIL	VPH 16 (-)	0 (0,0%)	2 (100%)	2
		VPH 16 (+)	1 (50%)	1 (50%)	2

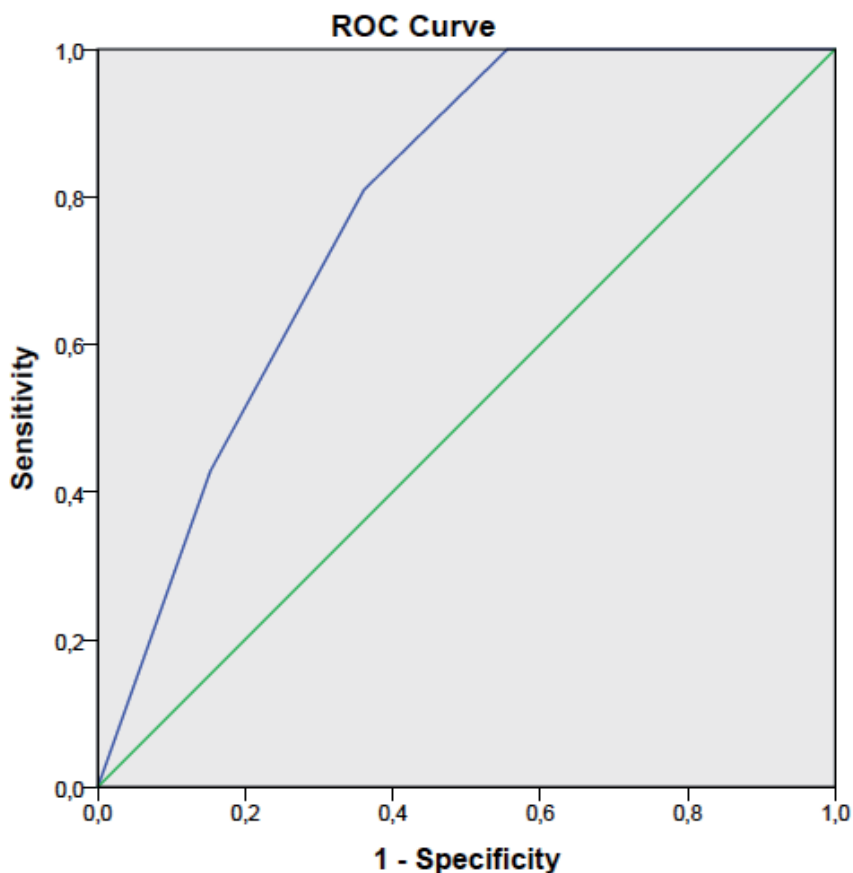
5.10.2. Model multivariat de regressió logística binària a CIN3

El model multivariant de regressió logística binària de progressió a CIN3 mostra que les pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 i citologia prèvia de HSIL tenien 7 vegades més de possibilitats de progressar a CIN3 en els 2 anys posteriors al diagnòstic. Mentre que les pacients que tenien la infecció pel VPH16 en el moment del diagnòstic, el risc de progressió a CIN3 va ser de 3 vegades més, tal i com es mostra a la Taula 94.

Taula 94: Model multivariant de RLB de CIN3

VARIABLE	OR (95% IC)	P
Citologia prèvia HSIL	7,3 (2,1-24,6)	0,001
VPH16 positiu	2,9 (1,0-8,6)	0,052

Gràfic 19: Corba ROC de la capacitat de discriminació del model multivariant de RLB de CIN3



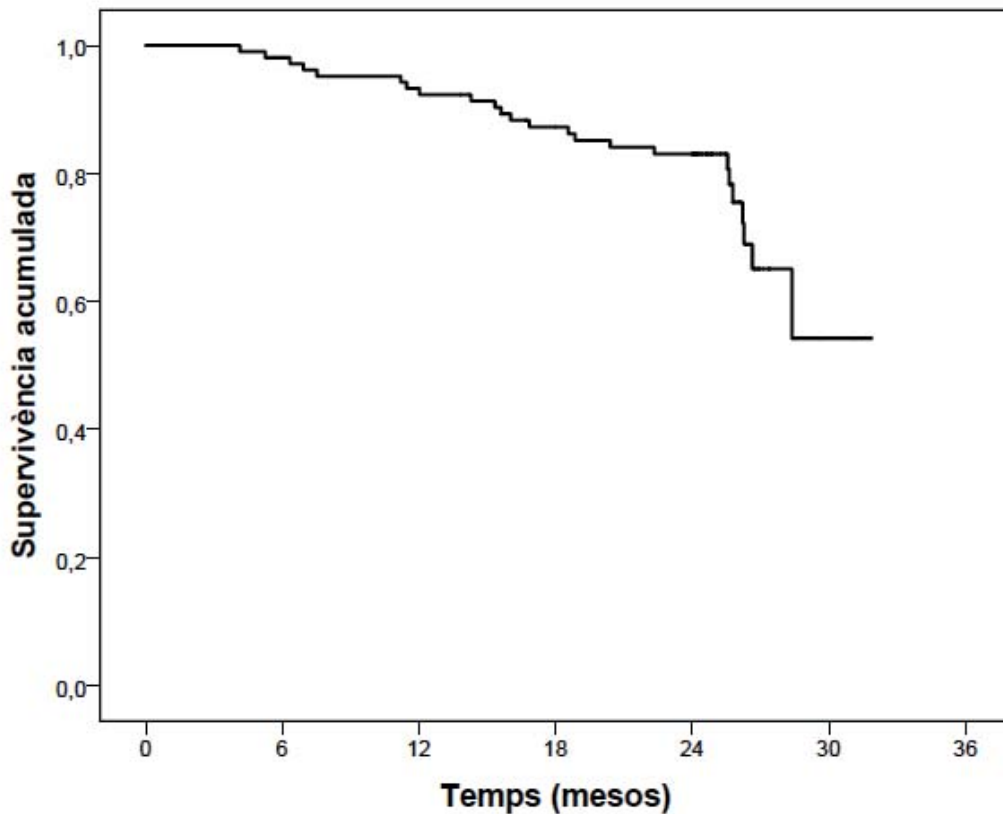
Capacitat de discriminació del model, ASC (95% IC):0,782 (0,688-0,876)
Calibració del model, Hosmer-Lemesow test: p=0,137

La Corba ROC mostra la capacitat de discriminació del model multivariant de regressió logística binària calculat, mostrant una àrea sota la corba (95% IC): 0,782 (0,688-0,876) el que indica que és model predictiu bo.

5.11. TEMPS DE PROGRESSIÓ A CIN3

A continuació es va analitzar el temps de progressió de les lesions de CIN2 a CIN3 a través de les corbes de Kaplan-Meier. Tal i com s'observa en el Gràfic 20:

Gràfic 20: Corbes de Kaplan-Meier per la progressió a CIN3 de les lesions de CIN2



Analitzat el temps lliure de progressió a CIN3 del CIN2 a través de les corbes de Kaplan-Meier, s'observa que el Gràfic 20 no representa adequadament l'evolució en el temps de progressió, sinó més aviat l'evolució en el temps de la detecció, que pot ser molt diferent del moment en què realment ha progressat. Per tant el gràfic representaria més adequadament el temps lliure de detecció de la progressió. Ja que s'observa que la majoria dels

CIN3 es detecten posterior als 2 anys de seguiment quan es realitza la conització diagnòstica que permet detectar els possibles CIN3 ocults que no s'havien diagnosticat prèviament.

No hem trobat indicat analitzar a través de corbes de Kaplan-Meier les diferents variables com la influència del genotipat viral, l'edat i NKG2C en el temps de progressió, ja que el temps de la detecció de la progressió no es correspon al temps de la progressió real.

6. DISCUSSIÓ

Els resultats d'aquest estudi aporten un major coneixement sobre la història natural de la patologia cervical preinvasiva, específicament del CIN2. L'anàlisi de les característiques epidemiològiques, anatomo-patològiques i immunitàries de les pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 ens ha permès identificar factors o marcadors útils per predir l'evolució de les lesions d'aquestes pacients. El coneixement de les relacions entre totes aquestes variables ha de permetre optimitzar el seguiment i el tractament de les pacients amb lesions de CIN2, i en conseqüència disminuir el sobre-tractament de les lesions potencialment reversibles.

Aquest és el primer estudi observacional prospectiu que analitza l'estat immunològic, concretament l'estat de les cèl·lules NK per predir l'evolució del CIN2, amb la hipòtesis de que una pitjor funcionalitat del les cèl·lules NK, demostrada per uns nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK disminueix la capacitat de regressió espontània del CIN2. Sabent que la infecció pel CMV s'associa a canvis en la distribució dels receptors de les cèl·lules NK, s'ha demostrat que aquest canvi de distribució de receptors de les cèl·lules NK, concretament del receptor activador NKG2C, podria ajudar a predir l'evolució de les lesions de les pacients amb CIN2.

6.1. POBLACIÓ D'ESTUDI

La mostra estudiada va incloure 105 pacients amb diagnòstic histològic de CIN2, dels quals 93 van finalitzar el protocol establert de seguiment durant 2 anys. Al ser el primer estudi que té com a objectiu l'estudi de les cèl·lules NK per predir l'evolució del CIN2, el càlcul del tamany mostral es va realitzar estimant una regressió del CIN2 del 40%. Comparant amb altres estudis que plantejaven un maneig conservador en les pacients amb CIN2, el present estudi inclou una mostra superior als altres, a excepció del *Castle i col.* [50] que inclou 357 pacients a partir de les dades de ALTS que tenia com objectiu principal establir el millor maneig de les pacients amb ASC-US i LSIL, i *McAllum B i col.* [52] que és un estudi retrospectiu que inclou 157 pacients menors de 25 anys que realitzen un maneig conservador.

Respecte a l'adherència a l'estudi de les pacients amb CIN2, s'ha vist que el maneig conservador té molta acceptació, ja que el 66,5% (105/158) de

les pacients a les que se'ls va proposar participar en l'estudi van acceptar ser incloses. De les 32 pacients que van preferir directament ser sotmeses a una conització, 7 no podien acudir als seguiments perquè migraven o per motius laborals no podien seguir tants controls, i només 14 van ser excloses per motius mèdics com era la immunosupressió o el fet de tenir una colposcòpia no satisfactòria. Al analitzar els criteris d'exclusió establerts es va evidenciar que un 50% de les pacients excloses per criteris mèdics (colposcòpia no satisfactòria o tractament immunosupressor) van presentar lesions de CIN3 a la peça de conització comparat amb el 10,3% de CIN3 present a les pacients excloses per motius personals ($p=0,005$). Aquest fet ens porta a afirmar que els criteris mèdics d'exclusió establerts a l'estudi són adequats per identificar a les pacients amb més risc de progressió i descartar-les per a opcions terapèutiques més conservadores. El fet que el protocol de seguiment s'hagi basat en procediments realitzats a la pràctica clínica habitual àmpliament acceptats i estandaritzats han possibilitat que la conductibilitat d'aquest estudi hagi estat òptima.

L'edat mitja de les pacients incloses a l'estudi va ser de $30,5 \pm 6,7$ anys amb una edat mínima de 18 anys i una edat màxima de 56 anys. Això suposa una diferència important comparat amb la majoria d'estudis previs que només inclouen pacients per sota 25 anys [47-48,51-52]. El fet que l'edat no hagi estat un criteri d'exclusió ens ha permès analitzar aquest paràmetre detalladament, com s'explicarà més endavant.

El protocol dissenyat de seguiment es va basar en control citològic i colposcòpic cada 4 mesos durant 2 anys, amb realització de biòpsia cervical a l'any si continuava la lesió. Es va proposar fer controls cada 4 mesos, per tractar-se d'una lesió amb més risc de progressió que el CIN1, en el que es realitzen controls cada 6 mesos segons els protocols acceptats per la majoria de societats científiques. El temps de seguiment establert en la mostra de 2 anys, va ser escollit per ser el període observacional de temps que es recomana en els protocols actuals de maneig conservador en pacients amb CIN2 [41,66].

6.2. EVOLUCIÓ DE LA LESIÓ DEL CIN2

En el present estudi s'han reportat unes taxes de regressió completa del 44%, regressió parcial a CIN1 del 22%, persistència a CIN2 del 12% i progressió del 23% als 2 anys de seguiment. Aquests resultats són molt similars a la majoria estudis previs [49,51,53], a excepció dels estudis que només inclouen pacients amb citologia prèvia de LSIL que reporten taxes de regressió al voltant del 74% [53], i estudis que només inclouen menors de 21 anys que reporten taxes de progressió del 5 i 8% [47,48]. És important destacar que seguint el protocol establert i els criteris d'inclusió i exclusió definits no s'ha detectat cap cas de Carcinoma invasor, fet que pot fer pensar que és un maneig conservador que es pot aplicar amb un bon marge seguretat. Per altra banda, cal remarcar que amb aquest protocol s'ha evitat la conització, i per tant el sobre-tractament, d'un 44% de pacients incloses, el 74% de les quals eren nul·líparas. Aquest fet és important ja que la conització s'ha relacionat amb resultats obstètrics desfavorables com el de part prematur [59,60]. A més a més es podria valorar evitar la conització i continuar un temps més de maneig conservador a el 22% més de les pacients que havien regressat parcialment, presentant CIN1 posterior a 2 anys de seguiment, ja que la seva tendència era a no progressar.

En el moment del diagnòstic histològic de CIN3 la pacient era sotmesa a conització i ja no continuava realitzant un maneig conservador. És per aquesta raó que no es va aconseguir precisar el temps lliure de progressió a CIN3 del CIN2, ja que les nostres dades (Gràfic 20) no representaven adequadament l'evolució en el temps de progressió, sinó més aviat l'evolució en el temps de la detecció de la progressió, que pot ser molt diferent del moment en què realment havia progressat. Tot i això si que es va definir el percentatge de pacients que havien progressat el primer any que va ser del 6% i al finalitzar l'estudi el segon any que va ser del 22%. Aquesta diferència es pot explicar pel concepte que s'ha definit com CIN3 ocult, referint-se a aquella lesió de CIN3 que es troba a la peça de conització definitiu sense diagnòstic previ de CIN3. Del total de 52 conitzacions que es van realitzar, es va trobar CIN3 ocult en 6 casos, que representa una taxa de CIN3 ocult de 11,5%. Estudi previs que analitzen la taxa de CIN3 a la peça de conització amb biòpsies prèvies de CIN2 i estableixen una taxa global de CIN3 ocult del 31% si la citologia prèvia havia

estat de HSIL i del 17,6% si la citologia prèvia havia estat noHSIL [185]. Aquest valor és major que en les nostres dades les quals recullen un 22,6% de CIN3 trobats en les pacients de l'estudi (21 CIN3 / 93 pacients que van finalitzar el seguiment), i el 20,8% de CIN3 trobats a les 11 pacients sotmeses a conització directament del total de 53 pacients excloses de l'estudi. Aquestes dades globalment representen una taxa de CIN3 en biòpsia de CIN2 del 21,9% a la nostra població. D'altra banda ressaltar que dels nostres 6 casos diagnosticats de CIN3 ocult destaca que 5 tenien biòpsia prèvia de CIN2 i només un cas de biòpsia prèvia de CIN1, mentre que la citologia prèvia era de HSIL en 3 dels casos i els altres 3 de noHSIL, fet que corrobora estudis previs que estableixen la citologia prèvia com un factor de risc de CIN3 ocult.

6.2.1. FACTORS SOCIO-EPIDEMIOLÒGICS

Dels factors socio-epidemiològics estudiats com l'edat, la paritat, el tabac, el mètode anticonceptiu, la conducta sexual valorant l'edat de la primera relació sexuals, el nombre de parelles sexuals total i les malalties de transmissió sexual, sorprenentment l'únic factor que ha resultat predir l'evolució del CIN2 ha estat detectar en sang la IgG de la infecció *Clamídia trachomatis* en sang perifèrica de les dones de l'estudi. Aquesta troballa ha estat motiu de discussió en un apartat apart posteriorment.

Tot i que els protocols actuals [41,66] recomanen realitzar un maneig conservador de les lesions de CIN2 en joves i adolescents, és complicat definir una edat límit concreta. La majoria d'estudis previs inclouen pacients per sota 25 anys [47-48,51-52] per la baixa taxa de càncer de cèrvix diagnosticada per sota aquesta edat [40,76]. Els estudis que han realitzat maneig conservador en lesions de CIN2 incloent pacient amb edats entre 17 i 47 anys, no han trobat influència de l'edat i l'evolució del CIN2 [53-55]. Davant aquesta discrepància, hem volgut estudiar l'edat com a factor predictor de l'evolució de la lesió del CIN2 no restringint l'edat màxima de les dones participants en l'estudi. L'edat mitja de les pacients incloses al nostre estudi ha estat de $30,5 \pm 6,7$ anys (rang 18-56), sense trobar associació significativament estadística entre l'edat i l'evolució del CIN2. Cal destacar que es va evidenciar una tendència a la

regressió del CIN2 en dones majors de 40 anys, ja que tot i ser només 6 pacients en aquest rang d'edat totes van presentar regressió total o parcial posterior a 2 anys de seguiment. Aquesta dada és concordant amb altres estudis, encara no publicats, que s'han realitzat a la nostra unitat amb patologia de ASCUS i LSIL. Aquesta troballa es podria explicar tenint en compte la història natural del VPH [75], on es troba una alta prevalença dels VPH més agressius com el genotip 16 i 18 en edats immediates a l'inici de les relacions sexuals, mentre que en les pacients majors a 40 anys es troba menys prevalença d'aquests genotips. Concretament a la nostra població estudiada no s'ha trobat cap pacient major de 40 anys amb VPH16 o VPH18 causant de la lesió del CIN2, suggerint que en el primer contacte amb aquests genotips es crea una immunitat i que les lesions causades en majors de 40 anys són causades per altres virus menys agressius amb més probabilitat de regressar la lesió.

Tenint en compte les altres variables, en la nostra població d'estudi de pacients amb diagnòstic histològic de CIN2, es va trobar un 54,3% de pacients eren fumadores, d'aquestes un 36,2% fumaven més de 10 cigarrets al dia. Tot i que el tabac és un conegut factor de risc del càncer de cèrvix [68,101], ni el tabac ni el nombre de cigarrets van condicionar l'evolució del CIN2 en la nostra població. Si ens fixem específicament en el risc de progressió a CIN3, destaca que el 28,6% de les fumadores van progressar comparat amb el 15,9% de les no fumadores que ho van fer ($p=0,145$), fet que fa sospitar que amb una població d'estudi major, com els estudis poblacionals que estudien els factors epidemiològics, es podrien trobar associacions com ha demostrat la literatura citada.

Altres factors epidemiològics reportats com la paritat i l'ús del mètode anticonceptiu, no s'han pogut demostrar associacions amb l'evolució del CIN2. Els estudis poblacionals amb més pacients sí que han relacionat el tabac, l'ús d'anticonceptius durat més de 10 anys i la multiparitat de més de 3 fills com a factors de risc de patir més CIN3 que el CIN2 [68,186]. En aquesta línia, analitzant específicament la paritat i el risc de progressar a CIN3 de la nostra població s'observa que les nul·líparees tenien un risc de CIN3 del 17,6% en contra de les que havien parit alguna vegada a la vida que tenien un risc de progressar a CIN3 del 36,0% en els 2 anys de seguiment amb una $p=0,061$.

Aquest fet va en concordança a la literatura descrita, no arribant a la significància estadística per la limitació de la mostra a l'hora de descriure factors epidemiològics. En aquesta línia la majoria d'estudis que analitzen el risc dels factors epidemiològics en pacients amb CIN2 exclusivament, tampoc han trobat associacions estadísticament significatives, entre el tabac, la paritat i l'ús de mètode anticonceptiu [54], només l'article de *Moscicki i col.* [51] descriu una associació entre l'ús d'anticonceptius hormonal orals i la no regressió del CIN2.

En referència a la gestació, durant els 2 anys de maneig conservador es van quedar embarassades 11 pacients. D'elles només una va progressar a CIN3, una va persistir a CIN2 i la resta van regressar parcial o totalment, fet que fa pensar que el diagnòstic de CIN2 no contraindica la cerca de gestació, si les pacients compleixen els protocols de seguiments establerts. Els protocols actuals de la SEGO [41] desaconsellen realitzar tractament exerètic del CIN2 durant la gestació de manera sistemàtica, ja que s'associa a una elevada taxa de complicacions, i la progressió a càncer invasor a curt termini és excepcional. Aproximadament un 20-30% dels casos poden regressar durant la gestació. En el cas de la nostra població d'estudi es va reportar una taxa de regressió del CIN2 del 81,8% en gestants comparat amb un 63,4% de regressió en no gestants ($p=0,228$).

En quan a la conducta sexual de les pacients diagnosticades de CIN2 incloses a l'estudi de maneig conservador constatar que l'edat mitja d'inici de les relacions sexuals va ser de 17,4 (rang 13-29) anys i el nombre mitjà de parelles sexuals totals va ser de 8,8 (rang 1-40). Els nostres anàlisis no van trobar associacions estadísticament significatives entres les dades d'activitat sexual i l'evolució posterior del CIN2. Aquestes dades coincideixen amb les descrites a la literatura per altres autors que estudien factors predictors del CIN2 [55], els quals tampoc troben relació entre l'evolució del CIN2 i l'edat d'inici de les relacions sexuals [53,54]. Només l'estudi de *Moscicki i col* [51] que estudia 95 pacients menors de 25 anys descriu una relació en l'anàlisi multivariant entre la major edat d'inici de les relacions sexuals i la possibilitat de regressió del CIN2.

6.2.1.1. Chlamydia trachomatis

De les malalties de transmissió sexual estudiades en la població d'estudi per tal d'analitzar possibles cofactors de l'evolució del CIN2, només la detecció de la immunitat en la IgG per *Chlamydia trachomatis* va mostrar significància estadística. Concretament de les 9 pacients que van presentar IgG positiva a l'inici del diagnòstic de CIN2, 8 van estar analitzades per haver finalitzat el seguiment i d'aquestes només una va regressar completament mentre que la resta van presentar CIN2+ al finalitzar l'estudi. D'aquesta manera trobem que el 87,5% de les pacients a les que es va detectar IgG+ per Clamídia van evolucionar a CIN2+, en front el 29,4% de pacients amb IgG- ($p=0,001$). El model multivariant de regressió logística binària de CIN2+ es va mostrar que les pacients amb IgG+ per Clamídia tenien 19 vegades més de possibilitats de presentar CIN2+ posterior als 2 anys de seguiment com a factor independent. Aquesta forta associació podria fer valorar el fet de realitzar serologies per Clamídia a totes les pacients amb diagnòstic de CIN2 i, fins i tot, ser considerat un criteri d'exclusió de maneig conservador, tot i això faria falta més estudis per poder considerar aquests resultats com a determinants.

En el cas de les 17 pacients a les que es va detectar IgA per *Chlamydia trachomatis* no es va trobar associació estadística amb l'evolució del CIN2. La serologia mitjançant la detecció d'anticossos permet la detecció del IgM, IgA i IgG. En el cas de la *Chlamydia trachomatis*, la presència de IgM en adults amb infecció aguda del tracte genital és infreqüent, el millor mètode de detecció d'infecció aguda és la PCR en cultiu vaginal. La determinació immunoenzimàtica qualitativa d'anticossos IgA específics contra Clamídia en sang es troben presents en infeccions agudes, cròniques i recurrents, en un temps indeterminat. Els anticossos IgA descendeixen ràpidament a nivells basals seguits al tractament i la erradicació de la infecció, en canvi, un increment d'aquesta immunoglobulina específica pot indicar una infecció activa, sistèmica o crònica [187]. La presència d'anticossos IgG no mostra evidència de una infecció actual o recent, degut a que en un individu amb infecció resolta, també és possible trobar aquests anticossos. La IgG en sang persisteix durant llargs períodes de temps i desapareix molt lentament, la seva presència inclou aquells pacients que no tenen una infecció aguda i es deu a una infecció passada.

Tot i que la infecció per *Clamidia trachomatis* ha estat descrita com un cofactor involucrat en la patologia cervical i el càncer de cèrvix, identificant més risc de càncer de cèrvix en pacients seropositives per clamídia que en seronegatives [90,188,189], el seu mecanisme d'acció no està del tot clar [88]. La majoria de teories parlen d'un efecte sinèrgic entre el VPH i la Clamídia que lesiona la barrera mucosa provocant inflamació crònica i persistent que indueix a metaplàsia escamosa del cèrvix afavorint la infecció pel VPH [190,191]. Altres autors suggereixen l'efecte carcinogènic de la infecció per Clamídia, perquè aquesta interfereix en la resposta immunitària evitant l'eliminació del VPH [192,193]. En el cas dels nostres resultats, al no haver estudiat la infecció aguda a través de la PCR per Clamídia, no es pot corroborar la teoria de l'efecte sinèrgic a nivell de la mucosa cervical provocant inflamació crònica. Tot i això, si que s'ha trobat una tendència a que les 9 pacients que presenten IgG+ per Clamídia tenen menor expressió del receptor activador NKG2C que les pacients amb IgG- ($p=0,068$), fet que recolzaria la teoria de que una infecció per Clamídia resolta podria modificar el sistema immunitari i concretament, els nivells d'expressió del receptor activador NKG2C.

Només hi ha un estudi de *Moscicki i col.* estudia les MTS i l'evolució del CIN2 [51]. Aquest descriu una associació entre una infecció recent de *N. gonorrhoeae* i la regressió del CIN2. En canvi no troba associació entre una infecció recent de Clamídia i l'evolució del CIN2. Una possible explicació, és que en aquest estudi reporta la infecció aguda mitjançant una mostra vaginal i el nostre estudi detecta la IgG en sang, fet que indica una infecció crònica resolta i és en aquest cas que es posen de manifest diferències estadísticament significatives en l'expressió del receptor NKG2C de les cèl·lules NK.

Segons les nostres dades, detecció de IgG per Clamídia en el moment del diagnòstic de CIN2 és un dels factors predictors independent de persistència i progressió més important. Les pacients amb CIN2 que es detecta IgG per Clamídia tenen 19 vegades més de possibilitats de presentar CIN2+ posterior als 2 anys de seguiment. Encara que sigui un factor poc prevalent i només s'hagi identificat en 9 pacients, valdria la pena considerar-lo a l'hora de prendre decisions sobre el maneig del CIN, degut a aquesta forta associació.

6.2.2. FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS

6.2.2.1. Citologia prèvia

La probabilitat que una pacient amb un diagnòstic de CIN2 tingui una lesió de CIN3 subjacent, ve condicionat en part pel resultat de la citologia prèvia. Quan la citologia prèvia és ASC-US o LSIL, el risc de diagnosticar una lesió de CIN3 és més baix que quan la citologia prèvia és HSIL [185,194]. Aquest fet també està descrit en pacients amb CIN1, els quals si tenen una citologia prèvia de LSIL o ASCUS, el risc de CIN3 és del 4%, mentre que en els casos de citologia prèvia de HSIL, el risc de desenvolupar CIN3 en els 5 anys posteriors és del 15% [40]. En el cas de la nostra població d'estudi aquesta dada es compleix, ja que una citologia prèvia al diagnòstic de CIN2 de HSIL conferia un risc de progressar a CIN3 als 2 anys de seguiment del 39,5% comparat amb un 8% de progressió en els casos en que la citologia va ser noHSIL ($p < 0,001$). En la mateixa línia trobem diferències estadísticament significatives en analitzar la probabilitat de regressió en funció de la citologia prèvia. Segons les nostres dades, una citologia de HSIL prèvia al diagnòstic histològic de CIN2 conferiria una probabilitat de regressió total o parcialment de la lesió de CIN2 als 2 anys de seguiment del 48,8%, mentre que en el cas en que la citologia prèvia era de noHSIL aquesta probabilitat de regressió augmentava al 80% ($p = 0,002$). La majoria d'estudis previs que han realitzat un maneig conservador amb les lesions de CIN2 només han inclòs pacients amb citologia prèvia de LSIL o no reporten aquesta dada, i per tant no han pogut analitzar la citologia prèvia com a factor predictor de l'evolució del CIN2 [50,53].

En general sembla ser que la citologia prèvia al diagnòstic de CIN2 es podria considerar com un bon indicador per predir l'evolució de CIN2. En aquesta línia, les nostres dades mostren que, tot i que les pacients amb una citologia prèvia de HSIL tenien un risc de 5 vegades més de CIN2+, també es reporta que un 48,8% de citologies de HSIL prèvies a un diagnòstic histològic de CIN2 van regressar als 2 anys de seguiment. Per tant si tractéssim directament a totes les pacients amb CIN2 i citologia prèvia de CIN2, estaríem sobretractant gairebé un 50% de les pacients. Per tant, tot i que cal considerar que una citologia de HSIL representa majoritàriament un diagnòstic histològic de CIN2-3, el tractament destructiu directe per una citologia de HSIL no és

acceptable sense la realització prèvia d'una colposcòpia adequada que permeti realitzar un diagnòstic histològic confirmatiu.

6.2.2.2. Genotip del VPH

El VPH és descrit com el factor indispensable però no suficient per la carcinogènesi cervical. En funció del seu risc de provocar càncer de cèrvix els VPH es classifiquen en d'alt risc carcinogènic que inclou els genotips 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59 o els de baix risc [16]. El VPH16 i VPH18 s'han descrit com a responsables del 70% dels casos de carcinoma de cèl·lules escamoses [13]. Estudis de cohorts amb seguiments sistemàtics prolongats han definit diferències amb la capacitat de progressió a CIN2 o CIN3 associats al tipus viral [195,196]. En un estudi realitzat a Costa Rica, les infeccions pels VPH16 i 18 van progressar a lesions a CIN3+ en un 17,2% i un 13,6%, respectivament, i les infeccions per altres tipus virals d'alt risc va progressar en un 3% amb diferències estadísticament significatives. Les dones negatives per VPH va progressar a CIN3+ en un 0,8% [195]. Aquestes observacions han estat confirmades per altres estudis en països desenvolupats [197] i suggereixen un potencial oncogènic significativament superior el els VPH 16 i VPH 18, fet que podria portar a la recomanació de realitzar proves específiques per el seguiment d'aquestes pacients.

En el cas de la nostra població d'estudi de pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 trobem que en un 86,7% dels casos es va detectar algun VPH-AR a la citologia prèvia i només en un 13,3% dels casos no es va detectar cap VPH-AR. En un 41,9% de les citologies prèvies al diagnòstic histològic de CIN2 es va detectar en VPH16, en un 6,7% el VPH18 i en un 41% dels casos es van detectar altres VPHARno16no18, descartant les coinfeccions amb VPH16 i/o VPH18. Dades molt similars es van reportar a l'estudi ATHENA [198], el qual només estudiava citologies de ASCUS per validar la tècnica COBAS i va detectar que en un 44% de les lesions de CIN2, presentaven VPH16 i un 61% dels casos per CIN3.

Analitzant l'edat en relació a cada genotip del VPH, s'ha observat que el VPH16 i VPH18 es trobaven majoritàriament a edats per sota 35 anys on existeix més possibilitats de trobar més lesions recents que persistents [75].

Concretament, un 54,1% de les infeccions en menors de 35 anys i un 21,7% de les infeccions en majors de 35 anys havia estat causada per VPH16 i/o VPH18 a la nostra població d'estudi. Per sobre de 35 anys es va detectar majoritàriament VPHARno16no18 o lesions amb VPH negatiu. Destaca que, encara que només hi hagués 6 pacients majors 40 anys, en cap d'aquestes es va detectar el VPH16 ni el VPH18. A la literatura es disposa de varies dades respecte a la variació de distribució dels genotips del VPH en funció de l'edat. *Bosch i col.* [15] en la seva revisió sobre el VPH el 2008, va observar que la prevalença del VPH-AR presentava 2 pics màxims, en joves i al voltant dels 45 anys. No obstant aquestes dades feien referència a pacients amb citologies normals. En el re-anàlisi de ALTS fet per *Gage i col.* [199] de les lesions LSIL es va observar que la prevalença del VPH16 era menor per sobre dels 30 anys respecte a les més joves. *San José i col.* [200] també va detectar una disminució de la prevalença del VPH16 i VPH18 causant del càncer invasor de cèrvix entre els grups d'edats formats per dones més joves o majors de 65 anys. En la nostra sèrie aquestes dades coincideixen, ja que es va detectar el VPH16 en un 51,8% dels casos en menors de 30 anys i en un 28,9% en majors de 30 anys. Quan vam analitzar conjuntament el VPH16 i VPH18, també es va detectar majoritàriament aquests virus en menors de 30 anys, corresponent a un 57,1% de les infeccions comparat amb un 36,5% en el cas de majors de 30 anys, destacant que en cap de les 6 pacient amb lesió de CIN2 per sobre dels 40 anys es detecta en VPH16 ni el VPH18. Tots aquestes estudis junt amb les nostres dades semblen apuntar a que a major edat, menor prevalença del VPH d'alt risc i menor prevalença del VPH16 causant de les lesions, donant exploració a perquè les lesions de CIN2 en majors de 40 anys tenen més tendència a regressar.

Quan es va analitzar l'evolució del CIN2 en funció del genotip, es va observar que cap lesió amb VPH negatiu inicial presentava CIN2+ (persistència o progressió) posterior a 2 anys de seguiment. De fet tots els casos on no es va detectar el VPH-AR a la citologia prèvia al diagnòstic del CIN2 van regressar de manera completa (n=13) o parcial (n=1). Encara que en el nostre estudi només un 15,1% de les lesions de CIN2 hagin presentat VPH-AR negatiu, aquest fet podria permetre considerar aquest subgrup de lesions com lesions de baix grau amb importants implicacions a la pràctica clínica habitual. Aquestes lesions on

no es detecta el VPH-AR podrien ser considerades com a verdares negatius pel fet que podrien estar causades per VPH de baix risc, o bé falsos negatius perquè el punt de tall clínic fos diferent a l'anàliti per trobar-se en baixos nivells de carga viral no detectable per les tècniques moleculars. El fet de que totes les lesions VPH-AR negatiu hagin regressat, va a favor de que fossin verdares negatius de la tècnica Cobas i per tant, aquesta sigui una bona tècnica de despistatge. Per tant podria ser important genotipar les lesions de CIN2, ja que si sabem que no progressaran, estalviarem tractaments, visites i desgast psicològic a les pacients.

De manera similar, encara que en sentit contrari, les lesions causades pel VPH16 o VPH18, van presentar un risc major de no regressió que les lesions que no estaven provocades per aquests genotips virals. Aquesta diferència estableix una associació estadísticament significativa entre l'evolució del CIN2 i el genotip del VPH detectat inicialment. Concretament es va observar que un 55,3% i 83,3% dels casos de VPH16 i VPH18 respectivament van presentar no regressió (CIN2+) posterior als 2 anys de seguiment, en comparació amb el 20% i 31% quan no es va detectar el VPH16 i el VPH18, respectivament. Mentre que la resta de VPHARno16no18 no es va identificar implicació en l'evolució del CIN2.

Estudis concrets de seguiment de pacients amb lesions de CIN2 també detecten el VPH, i concretament el VPH16 [50], el VPH16 i 18 [51], o la persistència del VPHAR [54] com a factor de risc de progressió a CIN3, descrivint menys regressió en aquestes lesions causades per VPHAR en comparació a la resta.

Amb els resultats exposats anteriorment es dedueix que el genotipat del VPH causant de les lesions de CIN2 podria ser de gran utilitat en el triatge d'aquestes lesions de CIN2. Així, genotipant per VPH16 i VPH18 identificarien les lesions amb més risc de progressió, mentre que el subgrup de lesions de CIN2 amb VPH-AR negatiu es podria proposar una actitud expectant o més conservadora.

L'interessat de tot és la relació entre la citologia i el tipus de VPH en el moment del diagnòstic del CIN2 i la seva evolució posterior. De fet cap cas de CIN2 precedit d'una lesió citològica de ASCUS (n=13) va progressar a CIN3, cap d'aquests era provocat pel VPH18 i només 3 eren causats pel VPH16. En

el cas dels 20 casos amb citologia prèvia de LSIL tampoc es detecta cap cas amb VPH18, però si que es detecten 9 casos (45%) amb VPH16, que coincideix amb els 5 presenten CIN2+ als 2 anys de seguiment. Unint les dades de pacients amb citologia de LSIL i ASCUS, per tal de poder-ho comparar amb altres estudis, trobem que un 27,3% (9/33) dels casos de LSIL i ASCUS es detecta VPH16. En general les pacients de CIN2 amb citologia prèvia de LSIL o ASCUS presenta una taxa de progressió a CIN3 general del 9% (3/33) i si presenten el VPH16 la taxa de progressió és del 33,3% (3/9), coincidint aquests 3 casos de progressió amb pacients amb LSIL i VPH16. En el cas de *Gage i col.* [199] que va recuperar les dades de l'estudi ALTS que estudia citologies de LSIL i ASCUS, va trobar una prevalença del 21,1% per VPH16, 30% per VPH16/18 i 34% per VPH16/18/45. En quan al risc de 2 anys de CIN3+, el màxim valor l'ofereix la detecció del VPH16, pel que va ser del 48,6% en dones de 30 anys o més, i del 37,9% en dones joves, mostrant dades molt similars a les nostres. En els casos de HSIL la taxa de progressió a CIN3 és del 39,5%, del 45% i del 40% de manera global, en casos de VPH16 i VPH18, respectivament.

Per tant, davant un diagnòstic histològic de CIN2 suggerim que la citologia prèvia pot ser una primera eina de cribratge, ja que la majoria de lesions amb citologia prèvia de noHSIL regressen, mentre que les que presenten HSIL, un 50% regressen i un 50% presenten CIN2+. En el cas de citologies amb HSIL sembla que el tipatge del VPH no seria de gran utilitat, ja que de manera global progressen un 39,5% i en casos de VPH16 i/o 18 la progressió és del 44%. El contrari passa amb citologia de ASCUS i LSIL, on la taxa de progressió és del 9% i aquesta augmenta al 33,3% si es detecta el VPH16. Resumint, podríem dir que les lesions de CIN2 amb citologia prèvia de LSIL VPH16 i HSIL sembla que tenen més probabilitat de progressió a CIN3 i per tant un seguiment més estricte o un tractament immediat seria una actitud a tenir en compte per les seves majors taxes de progressió.

Aquesta actitud es veu recolzada per les dades del model multivariant de regressió logística binària de CIN2+ que ens mostra que les pacients amb diagnòstic histològic de CIN2 i citologia prèvia de HSIL o presència del VPH16 tenien 5 vegades més de possibilitats de presentar CIN2+ en els 2 anys posteriors al diagnòstic de manera independent. Mentre que si presentaven

citologia prèvia de HSIL i en aquesta es detectava la presència del VPH16 de manera concomitant, les pacients tenien 25 vegades més de risc de presentar CIN2+ posterior als 2 anys de seguiment. Valorant aquests riscos i realitzant un estudi amb més població per confirmar aquestes dades, podríem orientar molt millor a les pacients en funció de la citologia prèvia i el genotip del VPH.

6.2.3. FACTORS IMMUNOLÒGICS

L'objectiu principal de l'estudi era demostrar la relació entre els nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK en sang perifèrica i l'evolució de les lesions de CIN2.

La relació entre els factors immunològics i l'evolució de les lesions cervicals va sorgir a partir de la major incidència i taxa de progressió de la malaltia en pacients infectades pel VIH [112]. De forma natural, les cèl·lules infectades presenten els antígens als limfòcits T a través de Complex Major d'Histocompatibilitat de classe I (MHC). Els limfòcits T les identifiquen i creen resposta contra elles. En alguns casos d'infecció per virus, es produeix un mecanisme d'evasió immunològica que consisteix en l'absència de presentació d'antigen per part del CMH de classe I. Les cèl·lules NK són cèl·lules de la immunitat innata que identifiquen les cèl·lules que no presenten MHC de classe I, eliminant-les a través de l'equilibri entre receptors activadors i inhibidors. Per tant, el funcionament de les cèl·lules NK es basa en la hipòtesis del *"missing self hypothesis"* ja que tenen la capacitat d'eliminar cèl·lules tumorals o infectades que en condicions patològiques han perdut l'expressió del MHC classe I com a mecanisme per escapar-se de la resposta immunològica dels limfòcits T [125]. Aquest funcionalment de les cèl·lules NK fa suposar el seu efecte beneficiós en l'evolució de la patologia cervical preinvasiva.

Per altre banda s'ha descrit que la infecció per CMV, s'associa canvis permanents en la distribució dels receptors de les cèl·lules NK, promovent l'expressió dels receptors NKG2C i ILT2, i disminuint l'expressió del receptor inhibidor NKG2A en algunes pacients [157,158], tot i que els mecanismes de reconfiguració resten desconeguts. En la nostra població d'estudi de pacients diagnosticades de CIN2, es va observar una prevalença de pacients IgG+ per CMV del 68,6% semblant a la descrita en la població general per altres autors

[144]. En estudiar el percentatge d'expressió de les cèl·lules NK en relació a la infecció pel CMV en la nostra població d'estudi de pacients amb CIN2, es va observar que les pacients CMV+ tenien més expressió de NKG2C i KIR, i menys expressió de NKG2A. Per tant les nostres dades van a favor de la bibliografia present de la associació establerta entre la infecció del CMV i l'expansió de NKG2C [158]. Tot i existir aquesta tendència a que pacients CMV+ expressin més NKG2C, aquesta condició no sempre es compleix. D'aquí que estudis recents hagin descrit l'existència de dos subconjunts de cèl·lules NKG2C+. El fenotip *NKG2Cbright*, que es troba exclusivament en un subgrup de persones CMV+ ($\approx 50\%$), les quals es correlacionen amb l'expansió de les cèl·lules NKG2C activades; i el fenotip *NKG2Cdim* que es correspon a l'altra meitat de pacients CMV+ i tots els individus CMV-, en els que es troben proporcions menors d'expressió de NKG2C [162]. Per altre banda, s'han descrit uns genotips del receptor NKG2C existint tres tipus de genotips diferents coneguts com a NKG2C+/+, NKG2C+/del, NKG2Cdel/del, representant el 66, 26 i 8% de la població respectivament. Estudis recents han mostrat que en nens i adults joves homozigots (NKG2C+/+), tendeixen tenir un major nombre absolut i proporció de cèl·lules *NKG2Cbright* en comparació amb els subjectes NKG2C heterozigots (NKG2C+/del). En la nostra població d'estudi de pacients amb diagnòstic de CIN2 es va observar una prevalença del 65,4%, 23,5% i 11,1% de NKG2C+/+, NKG2C+/del, NKG2Cdel/del, respectivament [163,164]. Al tractar-se d'una mostra seleccionada de risc amb una patologia cervical, sembla congruent que la distribució dels genotips NKG2C no es correspongui a les proporcions de la població sana. En la nostra població d'estudi s'observa que les pacients homozigotes (NKG2C+/+) tenien més tendència a expressar més NKG2C i KIR, i menys NKG2A, que les pacients amb doble delecció (NKG2Cdel/del) del gen NKG2C, tal i com s'observa als resultats. Per tant, les nostres dades recolzen els estudis previs que descriuen que existeix una correlació entre el genotip NKG2C i la redistribució de les cèl·lules NK en pacients sans CMV+ [162].

Basant-nos en la hipòtesis que les infeccions víriques podrien modificar la distribució del compartiment de les cèl·lules NK, es va analitzar si la infecció pel VPH-AR i els diferents genotips modifiquen l'expressió de les cèl·lules NK

en sang no vam poder demostrar cap associació entre el VPH i l'expressió dels receptors les cèl·lules NK.

Un cop analitzat els possibles factors que podien modificar l'expressió de les cèl·lules NK, ens vam centrar en demostrar l'objectiu principal de l'estudi i vam analitzar si aquesta diferent expressió de les cèl·lules NK predeia l'evolució de les lesions de CIN2 en els 2 anys de seguiment. Estudis anteriors havien relacionat el percentatge d'expressió de les cèl·lules NK amb el grau de lesió cervical. En els quals destaquen 2 treballs que evidencien menor expressió de NKG2D en pacients diagnosticades de càncer de cèrvix en comparació amb pacients sanes [181,182].

Al analitzar l'evolució del CIN2 en els 2 anys de seguiment de les 93 pacients que finalitzen l'estudi, vam observar que el fet de ser immune al CMV no canvia l'evolució del CIN2 respecte les pacients CMV-. Sabent que la infecció del CMV modifica les cèl·lules NK, seria lògic pensar que el simple fet d'haver passat la infecció del CMV pogués influir en l'evolució de les lesions. Com s'ha comentat anteriorment, tot i que de manera global es va observar que els pacients CMV+ expressaven major receptor NKG2C, aquest fet no es produïa en totes les pacients, ja que també depèn del genotip. El fet d'analitzar només la infecció pel CMV, sense tenir en compte el canvi que produeix al percentatge d'expressió de les cèl·lules NK en algunes pacients, podria ser una de les explicacions pel que no es van trobar diferències en l'evolució del CIN2, només tenint en compte la immunitat pel CMV.

El mateix es va observar quan es va analitzar les cèl·lules NK sense tenir en compte la infecció del CMV. Tot i que, com seria lògic, s'observa una tendència a que les pacients que es curen tenen menys expressió del receptor inhibidor NKG2A i més expressió del receptor activador NKG2C que les pacients que progressen, aquesta diferència no és significativa

En canvi quan es van subclassificar les pacients en funció del CMV i es va analitzar els nivells d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK, es va observar que les pacients CMV+ tenien una tendència a l'associació entre l'expressió mitjana de NKG2C i l'evolució del CIN2 ($p=0,060$). L'expressió mitjana dels receptors activadors NKG2C era major en les pacients que regressaven, en comparació amb les que no van regressar. Les diferències van ser significatives comparant l'evolució del CIN2 en regressió vs CIN2+, on es

va observar que les pacients que van regressar presenten una expressió mitjana NKG2C de 31,0 en comparació a les pacients que no van regressar (CIN2+) que presenten una expressió mitjana NKG2C de 19,2 ($p=0,013$). En la mateixa línia, comparant les pacients que van progressar a CIN3 i l'expressió NKG2C, es va observar que les pacients que no van progressar tenien una expressió mitjana NKG2C de 29,7 en comparació amb les que van progressar que era de 15,7 ($p= 0,011$).

Per altre banda en pacients CMV negatives no es troben diferències significatives en l'evolució del CIN2 i l'expressió NKG2C. Aquest fet s'explica perquè en pacients CMV negatius l'expressió de les cèl·lules NK no es modifica, i per tant, no s'observa relació entre la seva expressió i l'evolució del CIN2.

Per altre banda es va intentar establir una relació entre el genotip NKG2C i l'evolució del CIN2. Les pacients homozigotes mostren més expressió NKG2C en comparació amb les heterozigotes quan entren en contacte amb el CMV. Davant la presència de més expressió NKG2C en les pacients homozigotes, es va analitzar si aquesta major expressió NKG2C en funció del genotip estava relacionada amb l'evolució del CIN2, sense poder mostrar diferències estadísticament significatives.

De manera global es pot afirmar la hipòtesis que les cèl·lules NK podrien ser útils com a biomarcador per predir l'evolució de les lesions de CIN2, es compleix en pacients amb CMV+, possiblement perquè aquestes pacients són les que han pogut modular el sistema de les cèl·lules NK, segons les teories descrites per altres autors. En conjunt els resultats indiquen que les cèl·lules NK, especialment la subpoblació amb augment de l'expressió del receptor NKG2C podria desenvolupar un paper actiu en la resposta a les infeccions pel VPH i en l'evolució de les lesions cervicals en dones amb immunitat enfront el CMV.

6.3. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

El treball presenta una sèrie de limitacions que cal tenir en compte abans d'adoptar estratègies a la pràctica clínica habitual. Una de les més importants és que, tot i que el diagnòstic de CIN2 s'ha realitzat a través de una biòpsia colpo-dirigida per ginecòlegs especialitzats, mai es pot assegurar que en el moment del diagnòstic no hi hagués una lesió de CIN3 subjacent no biopsiada que posterior s'ha diagnosticat de progressió. Tot i així, cal remarcar que del total de 21 casos diagnosticats de CIN3 durant l'estudi, 6 (6,5%) es van diagnosticar al finalitzar l'estudi a través de la peça de conització, el que podríem considerar CIN3 ocults que no havia estat diagnosticat prèviament a través de les biòpsies durant el seguiment.

Una altra limitació a tenir en compte podria ser el tamany de la mostra. La mostra es va calcular a través del percentatge de regressió del CIN2. Aquesta ha resultat ser suficient per complir l'objectiu de l'estudi, però s'ha mostrat insuficient per aconseguir la significància estadística en la majoria de factors epidemiològics descrits prèviament a la literatura com a cofactors de l'evolució del CIN2 com és el tabac, l'ús d'anticonceptius, el preservatiu, la paritat, etc. Cal tenir en compte que aquest no era l'objectiu principal del nostre estudi. La majoria de treballs epidemiològics són poblacionals o amb mostres majors.

Tot i acabar conclouent que l'estudi de l'expressió de les cèl·lules NK en pacients amb immunitat enfront el CMV podria ajudar a predir les taxes de persistència i progressió del CIN2, cal remarcar que l'aplicabilitat clínica rutinària d'aquesta tècnica per analitzar les cèl·lules NK és molt laboriosa i de moment sembla que justificaria el seu cost. Tot i això, si més estudis prospectius i observacionals demostren la seva utilitat podria ser cada cop més cost-efectiva.

6.4. LINIES DE FUTUR

Aquest treball d'investigació presenta varis resultats que anticipen un futur prometedor pel maneig de les lesions de CIN2. Es tracta d'un estudi ben acceptat per les pacients, amb uns criteris d'inclusió i exclusió consensuats per la majoria de guies i que es podrien aplicar a la pràctica clínica habitual.

En primer lloc és el primer estudi prospectiu observacional que relaciona el sistema immunitari, i més concretament el percentatge d'expressió dels receptors de les cèl·lules NK amb l'evolució del CIN2. Les cèl·lules NK són una important arma del sistema immunitari innat especialitzades a eliminar cèl·lules tumorals i infectades per virus. Aquest fet dóna suport i aporta noves línies d'investigació en la recerca del sistema immutari i la seva relació amb el VPH. Per altre banda, els nostres resultats coincideixen amb estudis previs que descriuen que la infecció per CMV s'associa a una redistribució dels receptors de les cèl·lules NK. La importància d'aquesta redistribució de les cèl·lules NK en pacients que han tingut la infecció del CMV, permet que es pugui identificar una població de més risc de persistència o progressió del CIN2. La determinació dels receptors NK podria tenir una aplicació clínica en l'assessorament pronòstic de les pacients amb diagnòstic de CIN2. La incorporació d'aquesta tècnica, podria permetre un triatge millor de les pacients i adequar una actitud més individualitzada.

De totes les variables estudiades, la citologia prèvia de HSIL, la infecció del VPH 16 i 18, així com la serologia positiva per Clamídia, han presentat un risc de persistència i progressió del CIN2 (CIN2+) als 2 anys. Aquestes variables han estat incloses en el model multivariant de regressió logística binària de CIN2+ mostrant que les pacients amb IgG Clamídia gairebé totes presenten CIN2+ posteriors a 2 anys de seguiment de manera independent. Mentre que si tenen només la citologia prèvia de HSIL o presència del VPH16, un 33% presenta CIN2+. En el cas que presentin conjuntament la citologia prèvia i VPH16 tenen un 66% de CIN2+, permetent així orientar amb més precisió, de l'evolució del CIN2 amb la informació de la que disposem habitualment quan tenim un diagnòstic de CIN2.

Per altre banda, l'edat que la majoria d'estudis previs havien considerat com a criteri d'exclusió majors de 25 anys, al nostre treball no es demostra que sigui un factor de risc de progressió. D'aquesta manera, futurs estudis poden incloure totes les edats per acabar de confirmar aquestes dades, i així poder oferir el maneig conservador a més població.

Amb tota aquesta informació i la d'estudi futurs, es podria desenvolupar un sistema de puntuació de suport que inclogués totes les variables predictores, per prendre decisions individualitzades en el maneig de les

pacients amb diagnòstic histològic CIN2. Concloent que la combinació de varis marcadors pot ajudar a predir millor l'evolució de les lesions que utilitzant només un test, i utilitzar la tecnologia com a suport per la presa de decisions clíniques i millorar el maneig de les pacients. Alguns grups d'investigació ja estan treballant en aquesta línia [201].

En conclusió, els resultats d'aquesta tesis ofereixen, no sols un millor coneixement de les característiques demogràfiques i immunològiques de les pacients amb CIN2, sinó també una oportunitat única per establir relacions de causalitat entre les cèl·lules NK i l'evolució del CIN2 mitjançant l'abordatge prospectiu i multidisciplinari. S'han de realitzar més estudis prospectiu per identificar altres factors que poden influir en l'evolució de les lesions cervicals. Les recerques futures haurien d'aplicar les noves tècniques biomoleculares i els factors de risc clínics ja coneguts perquè junt amb la tecnologia ajudessin a prendre decisions clíniques més individualitzades.

7. CONCLUSIONS

- L'expressió basal dels receptors de cèl·lules NK, no es relaciona amb l'evolució posterior de les lesions de CIN2. En casos de pacients portadores de CMV (IgG+) s'observa menor expressió del receptor activador de NKG2C en les pacients que presenten persistència o progressió de les lesions de CIN2 durant el seguiment durant 2 anys.
- En finalitzar els 2 anys de seguiment s'han registrat unes taxes de regressió completa de les lesions CIN2 del 44%, regressió parcial a CIN1 del 22%, persistència del CIN2 del 12% i progressió a CIN3 del 23%.
- Els factors epidemiològics estudiats com l'edat, el tabac, la paritat, la conducta sexual i el mètode anticonceptiu no resulten ser factors predictors de l'evolució del CIN2.
- La detecció de la serologia IgG de la *Chlamydia trachomatis* en sang en pacients amb lesions de CIN2 s'ha relacionat amb 19 vegades més risc de persistència i progressió de les lesions de CIN2, de manera independent.
- El genotip del VPH més freqüent causant de les lesions de CIN2 és el VPH 16, present en gairebé un 50% dels casos. Les pacients en les que es detecta el VPH16 tenen 5 vegades més de risc de persistència o progressió, mentre que les lesions VPH-AR negatiu regressen.
- La majoria de lesions histològiques de CIN2 estan precedides d'una citologia de HSIL i aquesta està relacionada amb 5 vegades més risc de CIN2+ en els 2 anys de seguiment.
- De tots els cofactors estudiats que podrien modificar la distribució dels receptors de les cèl·lules NK, es demostra que la immunitat a la infecció del CMV provoca una major proporció de cèl·lules NK que expressen el receptor NKG2C, indicant que el CMV pot alterar el repertori de les cèl·lules NK.

- En analitzar els criteris d'exclusió establerts es va evidenciar que un 50% de les pacients excloses per criteris mèdics (colposcòpia no satisfactòria o tractament immunosupressor) van presentar lesions de CIN3 a la peça de conització comparat amb el 10,3% de CIN3 present a les pacients excloses per motius personals, suggerint que els protocol establert de maneig conservador de les lesions de CIN2 és segur.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):359-86.
- [2] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1374-403.
- [3] Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Alemán A, Rojas D, Torrella A, Chico M, Vicente M, Díaz JM, Larrañaga N, Marcos-Gragera R, Sánchez MJ, Perucha J, Ramos M, Navarro C, Ardanaz E, Bigorra J, Rodrigo P, Peris Bonet R. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. *Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)*, 2014.
- [4] Lowndes CM. Vaccines for cervical cancer. *Epidemiol Infect* 2006; 134 (1): 1-12.
- [5] De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014;15(1):23-34.
- [6] Gondos A, Chokunonga E, Brenner H, Pakin DM, Sankila R, Borok MZ, et al. Cancer survival in a southern African Urban Population. *Int J Cancer* 2004;112:860- 864.
- [7] Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M y cols. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-9.
- [8] Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136(10):1266-97.
- [9] Stoler M, Bergeron C, Colgan TJ, Ferenczy A, Herrington S, Kim KR, et al. Tumours of the uterine cervix. Squamous cell tumours and precursors. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, eds. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4th ed. Lyon: International Agency of Research on Cancer (IARC) 2014; 169- 206.
- [10] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- [11] Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013;382(9895):889-99.
- [12] López-Saavedra, Lizano-Soberón. Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano: La historia que no termina, *Cancerología* 1 .2006:31-55

- [13] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV y cols. Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–27.
- [14] 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;124(3):512–7.
- [15] Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26(10):1-16
- [16] Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK. Human papillomavirus: what every provider should know. *YMOB. Elsevier Inc* 2013;208(3):169–75.
- [17] Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* 2015;7(7):3863-90
- [18] Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997. 102: 3-8.
- [19] Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370:890-907.
- [20] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4): 244-65.
- [21] Gurumurthy M, Peevor R, Fiander A. Human papillomavirus update (including vaccination). *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 2013;23(8):231–7.
- [22] Bekkers R, Massuger L, Bulten J, Melcher W. Epidemiological and clinical aspects of human of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004;14:95-105.
- [23] Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:252-258.
- [24] Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BKS, Howell L. Natural history of cervical squamous intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;92:727- 735.
- [25] Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993;12(2):186–92.
- [26] Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006;24:43-53.
- [27] Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2005;19(2):439-58
- [28] IARC Working Group on evaluation of cervical cancer screening programmes. Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986; 293: 659-64.
- [29] Puig-Tintoré LM, Castellsagué X, Torné A, et al. Coverage and factors associated with cervical cancer screening: results from the AFRODITA study: a population-based survey in Spain. *Journal of Lower Genital Tract Disease.* 2008; 12:82-9.

- [30] de Sanjosé S, Ibáñez R, Rodríguez-Salés V, Peris M, Roura E, Diaz M, Torné A, Costa D, Canet Y, Falguera G, Alejo M, Espinàs JA, Bosch FX. Screening of cervical cancer in Catalonia 2006-2012. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:532.
- [31] de Sanjosé S, Alejo M, Combalia N, Culubret M, Tarroch X, Badal JM, Méndez I, Autonell J, Bosch FX. [Screening history in women with infiltrating uterine cancer]. *Gac Sanit*. 2006;20(2):166-7.
- [32] Scarinci IC, Garcia FA, Kobetz E, Partridge EE, Brandt HM, Bell MC, et al. Cervical cancer prevention: new tools and old barriers. *Cancer* 2010; 116 (11):2531-42 .
- [33] Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000; 132: 810-9.
- [34] Bulkman NW, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Long-term protective effect of high-risk human papillomavirus testing in population-based cervical screening. *Br J Cancer* 2005;92(9):1800-2.
- [35] Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ* 2008;337:a1754.
- [36] Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol* 2011;12(7):663-72.
- [37] Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014;383(9916):524-32.
- [38] Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol*. 2015;136(2):189-97.
- [39] Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data. *BMJ* 2009;339:b2968.
- [40] Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, Cheung LC, Raine-Bennett T, Gage JC, Kinney WK. Five-year risk of CIN 3+ to guide the management of women aged 21 to 24 years. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17:S64-8.
- [41] Oncoguía SEGO: Prevención del cáncer de cuello de útero. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Octubre 2014.
- [42] Castle PE, Gage JC, Wheeler CM, Schiffman M. The clinical meaning of a cervical intraepithelial neoplasia grade 1 biopsy. *Obstet Gynecol* 2011;118(6):1222-9 .
- [43] Elit L, Levine MN, Julian JA, Sellors JW, Lyt-wyn A, Chong S, et al. Expectant management versus immediate treatment for low-grade cervical intraepithelial neoplasia : a randomized trial in Canada and Brazil. *Cancer* 2011;117(7):1438-45.
- [44] Katki HA, Gage JC, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, et al. Follow-up testing after colposcopy: five-year risk of CIN 2 positive after a colposcopic diagnosis of CIN 1 or less. *J Low Genit Tract Dis* 2013;17(5 Suppl 1):S69-S77.

- [45] McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008;9(5):425-34.
- [46] Chan JK, Monk BJ, Brewer C, Keefe KA, Osann K, McMeekin S, Rose GS, Youssef M, Wilczynski SP, Meyskens FL, Berman ML. HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for 'natural' regression of CIN 2 and 3. *Br J Cancer*. 2003;89(6):1062-6.
- [47] Moore K, Cofer A, Elliot L, Lanneau G, Walker J, Gold MA. Adolescent cervical dysplasia: histologic evaluation, treatment, and outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(2):141.e1-6.
- [48] Fuchs K, Weitzen S, Wu L, Phipps MG, Boardman LA. Management of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescent and young women. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2007;20(5):269-74.
- [49] Guedes AC, Zeferino LC, Syrjänen KJ, Brenna SM. Short-term outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: considerations for management strategies and reproducibility of diagnosis. *Anticancer Res*. 2010;30(6):2319-23
- [50] Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol*. 2009 Jan;113(1):18-25.
- [51] Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, Shiboski S. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*. 2010;116(6):1373-80
- [52] McAllum B, Sykes PH, Sadler L, Macnab H, Simcock BJ, Mekhail AK. Is the treatment of CIN 2 always necessary in women under 25 years old? *Am J Obstet Gynecol* 2011;205(5):478-7.
- [53] Discacciati MG, de Souza CA, d'Otavianno MG, ngelo-Andrade LA, Westin MC, Rabelo- Santos SH, et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gyne- col Reprod Biol* 2011;155(2):204-8.
- [54] Ho GY, Einstein MH, Romney SL, Kadish AS, Abadi M, Mikhail M, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2: managed by watchful waiting. *J Low Genit Tract Dis* 2011;15(4):268-75.
- [55] Wang SM, Colombara D, Shi JF, Zhao FH, Li J, Chen F, Chen W, Li SM, Zhang X, Pan QJ, Belinson JL, Smith JS, Qiao YL. Six-year regression and progression of cervical lesions of different human papillomavirus viral loads in varied histological diagnoses. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(4):716-23
- [56] Bleecker E, Koehler E, Smith J, Budwit D, Rahangdale L. Outcomes after management of young women with cervical intraepithelial neoplasia 2 with a 6-month observation protocol. *J Low Genit Tract Dis*. 2014;18(1):46-9
- [57] Vergote IB, Makar AP, Kjørstad KE. Laser excision of the transformation zone as treatment of cervical intraepithelial neoplasia with satisfactory colposcopy. *Gynecol Oncol*. 1992;44(3):235-9.
- [58] Wright TC Jr, Gagnon S, Richart RM, Ferenczy A. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia using the loop electrosurgical excision procedure. *Obstet Gynecol*. 1992;79(2):173-8.
- [59] Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2006;367(9509):489-98.

- [60] Simoens C, Goffin F, Simon P, Barlow P, Antoine J, Foidart JM, Arbyn M. Adverse obstetrical outcomes after treatment of precancerous cervical lesions: a Belgian multicentre study. *BJOG*. 2012;119(10):1247-55
- [61] Poon LC, Savvas M, Zamblera D, Skyfta E, Nicolaides KH. Large loop excision of transformation zone and cervical length in the prediction of spontaneous preterm delivery. *BJOG*. 2012;119(6):692-8.
- [62] Wuntakal R, Castanon A, Sasieni PD, Hollingworth A. Pregnancy outcomes after treatment for cervical intraepithelial neoplasia in a single NHS hospital. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(4):710-5
- [63] Jakobsson M, Gissler M, Paavonen J, Tap- per AM. Loop electrosurgical excision procedure and the risk for preterm birth. *Obstet Gynecol* 2009;114(3):504-10.
- [64] Dolman L, Sauvaget C, Muwonge R, Sankaranarayanan R. Meta-analysis of the efficacy of cold coagulation as a treatment method for cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *BJOG*. 2014;121(8):929-42.
- [65] Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;12
- [66] Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW; 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol* 2013;121(4):829-46.
- [67] International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100B. A review of human carcinogens. Part B: Biological agents. Lyon: IARC; 2012.
- [68] Castellsague X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; (31):20-8.
- [69] International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2007;120(4):885-91.
- [70] Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intraepithelial lesions in young women. *Lancet*. 2004; 364:1678–83.
- [71] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural History of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *NEJM*. 1998; 338:423–8.
- [72] Elfgrén K, Kalantari M, Moberger B, Hagmar B, Dillner J. A population- based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(3): 561-7.
- [73] Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P y cols. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*. 2001; 357(9271): 1831-6.
- [74] Sawaya GF, McConnell KJ, Kulasingam SL. Risk of cervical cancer associated with extending the interval between cervical cancer screenings. *N Engl J Med* 2003; 349:1501-1509.
- [75] Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med* 2005;353(20):2101-4.

- [76] Benard VB, Watson M, Castle PE, Saraiya M. Cervical carcinoma rates among young females in the United States. *Obstet Gynecol* 2012;120(5):1117-23
- [77] Castle PE, Bulten J, Confortini M, Klinkhamer P, Pellegrini A, Siebers AG, et al. Age-specific patterns of unsatisfactory results for conventional Pap smears and liquid-based cytology: data from two randomised clinical trials. *BJOG* 2010;117(9):1067-73
- [78] Castellsague X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol* 2012;84(6):947-56.
- [79] Moscicki AB, Cox JT. Practice improvement in cervical screening and management (PICSM): symposium on management of cervical abnormalities in adolescents and young women. *J Low Genit Tract Dis* 2010;14(1):73-80.
- [80] Ishi K, Suzuki F, Saito A, Kubota T. Infect Prevalence of HPV, Chlamydia Trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in commercial sex workers in Japan. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8:235-239.
- [81] Juarez LA, Wheeler CM, Uribe-Salas FJ, et al. HPV: a highly prevalent sexually transmitted disease agent among female sex workers from Mexico City. *Sex Transm* 2001;28(3):125-130.
- [82] Touzé A, De San José S, Coursaget P, et al. Prevalence of antihuman papillomavirus type 16, 18, 31 and 58 virus-like particles in women in the general population in prostitutes. *J Clin Microb* 2001;39(12):4344-48.
- [83] Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001;285(23):2995-3002
- [84] Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*. 2003 Feb 1;157(3):218-26. Erratum in: *Am J Epidemiol* 2003;157(9):858.
- [85] Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, Peto J. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2000;83(11):1565-72.
- [86] Munoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Munoz A. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004; 190(12):2077-2087.
- [87] Trottier H, Silveira Ferreira, Patricia Thoman, Maria C. Costa, Joao S. Sobrinho, Jose Carlos M. Prado, Thomas E. Rohan, Luisa L. Villa, Eduardo L. Franco. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res* 2010; 70(21):8569-8577.
- [88] Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2014;289(4):715-23
- [89] Anttila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk of development of cervical squamous cell carcinoma. *J Am Med Assoc* 2001; 285:47-51.
- [90] Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van Den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW; IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive

cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 2004;111(3):431-9.

[91] Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, et al. Herpes simplex virus and risk for cervical cancer: a longitudinal nested case-control study in the Nordic countries. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 687-692.

[92] Peres AL, Camarotti JR, Cartaxo M, Alencar N, Stocco RC, Beçak W, Pontes-Filho NT, Araújo RF, Lima-Filho JL, Martins DB. Molecular analysis and conventional cytology: association between HPV and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2015;14(3):9497-505.

[93] Magaña-Contreras M, Contreras-Paredes A, Chavez-Blanco A, Lizano M, Cruz-Hernandez Yde L, Cruz-Hernandez Ede L. Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population. *J Med Virol* 2015;87(12):2098-105

[94] Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, Temmerman M, Vanden Broeck D. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2012;7(10):e45201.

[95] Thomas DB, Qin Q, Kuypers J, Kiviat N, Ashley RL, Koetsawang A, Ray RM, Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol*. 2001;153(8):732-9.

[96] Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359(9312):1093-101.

[97] Hinkula M, Pukkala E, Kyyrönen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J et al. A population based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *Br J Cancer* 2004;90:1025- 1029.

[98] Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, de Briton RC, Gaitan E, et al. Parity as a risk factors for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 1989;130:486-496.

[99] Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;118(6):1481-95.

[100] Szarewski A, Maddox P, Royston P, Jarvis M, Anderson M, Guillebaud J, Cuzick J. The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. *BJOG* 2001;108(3):295-303.

[101] Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, Bosch FX, de Sanjosé S, Dillner J, Gram IT, Tjønneland A, Munk C, Pala V, Palli D, Khaw KT, Barnabas RV, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Fagherazzi G, Kaaks R, Lukanova A, Steffen A, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Klinaki E, Tumino R, Sacerdote C, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Weiderpass E, Redondo ML, Sánchez MJ, Tormo MJ, Barricarte A, Larrañaga N, Ekström J, Hortlund M, Lindquist D, Wareham N, Travis RC, Rinaldi S, Tommasino M, Franceschi S, Riboli E. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer* 2014;135(2):453-66.

- [102] Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(12):868-73.
- [103] Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, Beral V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003; 361(9364):1159-67.
- [104] International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, 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* 2007:1609–21.
- [105] Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent HPV infection, external genital warts or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* 2002;29:725.
- [106] Tokudome S, Suzuki S, Ichikawa H, Hosono A, Maeda K, Marumoto M, Arakawa K, Agawa H, Ghadimi R. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer*. 2004;112(1):164
- [107] Winer RL, Hughes JP, Feng Q. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 2006;354:2645-54.
- [108] Castellsagué X, Díaz M, Vaccarella S, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Bosch FX. Intrauterine device use, cervical infection with human papillomavirus, and risk of cervical cancer: a pooled analysis of 26 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1023-31.
- [109] Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370:59-67.
- [110] Pietrzak B, Mazanowska N, Ekiel AM, Durlik M, Martirosian G, Wielgos M, Kaminski P. Prevalence of high-risk human papillomavirus cervical infection in female kidney graft recipients: an observational study. *Virol J* 2012;9:117.
- [111] Hemminki K, Dong C, Vaittinen P. Familiar risks in cervical cancer: is there a hereditary component? *Int J Cancer* 1999; 82: 775-81.
- [112] Wright TC Jr, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Van Devanter N, Sun XW. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. *New York Cervical Disease Study. Obstet Gynecol* 1994;84:591-7.
- [113] Ahdieh L, Muñoz A, Vlahov D, Trimble CL, Timpson LA, Shah K. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and seronegative women. *Am J Epidemiol* 2000;151:1148-57.
- [114] Massad LS, Xie X, D'Souza G, Darragh TM, Minkoff H, Wright R, Colie C, Sanchez-Keeland L, Strickler HD. Incidence of cervical precancers among HIV-seropositive women. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212(5):606.
- [115] Denslow SA, Rositch AF, Firnhaber C, Ting J, Smith JS. Incidence and progression of cervical lesions in women with HIV: a systematic global review. *Int J STD AIDS* 2014;25:163-77.
- [116] Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulhad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* 2007;150:199-209.

- [117] Padilla-Paz LA. Human Papillomavirus Vaccine: History, Immunology, Current Status, and Future Prospects. *Clin Obstet and Gynecol* 2005;48:226-40.
- [118] Schiller JT, Lowy DR. Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. *Semin Cancer Biol* 1996;7:373-82.
- [119] Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006;116:1167-73.
- [120] Murray P. A 9-Valent HPV Vaccine in Women. *N Engl J Med* 2015;372(26):2568.
- [121] Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001;3(13):1167-71.
- [122] Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.:65-91.
- [123] Yokoyama WM, Scalzo AA. Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes Infect* 2002;4:1513-21.
- [124] Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett* 2005;100:7-13.
- [125] Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*.1990;11(7):237-44.
- [126] Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-74.
- [127] Chiesa S, Tomasello E, Vivier E, Vely F. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol* 2005;42:477-84.
- [128] Aramburu J, Balboa MA, Ramírez A, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 1990;144:3238-47.
- [129] Carretero M, Cantoni C, Bellón T, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1997;27:563-67.
- [130] Parham P: MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005;5(3):201-14.
- [131] Gasser S, Raulet DH: Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 2006;214:130-42.
- [132] Benson DM Jr, Caligiuri MA. Killer immunoglobulin-like receptors and tumor immunity. *Cancer Immunol Res* 2014;2(2):99-104.
- [133] Besson C, Roetyneck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, Antoni G, Hermine O, Brice P, Ferme C, Carde P, Canioni D, Brière J, Raphael M, Nicolas JC, Clavel J, Middleton D, Vivier E, Abel L. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PLoS One* 2007;2(5):406.
- [134] Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004;18(12):2002-7.

- [135] Samaridis J, Colonna M. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 1997;27:660-5.
- [136] Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol* 2004;25:670-6.
- [137] Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999;285:730-2.
- [138] Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* 2010;235(1):267-85..
- [139] de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, Jafferji I, Trowsdale J, Liefers GJ, van de Velde CJ, Kuppen PJ. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* 2012;12:24.
- [140] Smyth MJ, Swann J, Kelly JM, Cretney E, Yokoyama WM, Diefenbach A, Sayers TJ, Hayakawa Y. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 2004;200(10):1325-35.
- [141] Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Salih HR. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* 2012;189(3):1360-71
- [142] Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, Vyas YM. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol* 2003;171(12):6891-9
- [143] Puig-Tintoré LM, Alba A, Bosch FX, Castellsagué X, Coll C, Cortés X, et al. La infección por papilomavirus. Documento de consenso de la SEGO, SEC y AEPCC. Documentos de Consenso SEGO 2002. Madrid: Meditex-Sanex 2003.p.41-104.
- [144] Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001:2675-705.
- [145] Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 2001;13:458-64.
- [146] French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003;15:45-51.
- [147] Bughio F, Umashankar M, Wilson J, Goodrum F. Human Cytomegalovirus UL135 and UL136 Genes Are Required for Postentry Tropism in Endothelial Cells. *J Virol* 2015;89(13):6536-50.
- [148] Farrell HE, Degli-Esposti MA, Davis-Poynter NJ. Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses. *Immunol Rev* 1999;168:187-97.
- [149] Gumá M, Angulo A, Lopez-Botet M. NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:207-23.
- [150] Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 2004;65:500-6.

- [151] Gamadia LE, Rentenaar RJ, van Lier RA, ten Berge IJ. Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Hum Immunol* 2004;65:486-92.
- [152] Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989;320:1731-5.
- [153] Rahbar A, Orrego A, Peredo I, Dzabic M, Wolmer-Solberg N, Strååt K, Stragliotto G, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival. *J Clin Virol* 2013;57:36-42.
- [154] Romo N, Fitó M, Gumá M, Sala J, García C, Ramos R, Muntasell A, Masiá R, Bruguera J, Subirana I, Vila J, de Groot E, Elosua R, Marrugat J, López-Botet M. Association of atherosclerosis with expression of the LILRB1 receptor by human NK and T-cells supports the infectious burden hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(10):2314-21.
- [155] Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Ness J, Chabas D, Strober J, McDonald J, Belman A, Milazzo M, Gorman M, Weinstock-Guttman B, Rodriguez M, Oksenberg JR, James JA; US Pediatric MS Network. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology* 2011;76(23):1989-95
- [156] Britt W, et al: Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:417-70
- [157] Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, Ruiz L, and López-Botet M. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1 infected patients. *J Infect Dis* 2006;194:38-41.
- [158] Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, and López-Botet M. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 2006; 107:3624-31
- [159] Antrobus RD, Khan N, Hislop AD, et al. Virus-specific cytotoxic T lymphocytes differentially express cell-surface leukocyte immunoglobulin-like receptor-1, an inhibitory receptor for class I major histocompatibility complex molecules. *J Infect Dis* 2005;191:1842-53.
- [160] Costa-Garcia M, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. *J Immunol* 2015;194(6):2715-24.
- [161] Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N. and López-Botet, M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004;104:3664–71
- [162] Muntasell A, Vilches C, Angulo A, López-Botet M. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur J Immunol* 2013;43(5):1133-41
- [163] Miyashita, R., Tsuchiya, N., Hikami, K., Kuroki, K., Fukazawa, T., Bijl, M., Kallenberg, C. G. et al. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol* 2004;16:163–8.
- [164] Moraru, M, Cisneros E, Gómez-Lozano N, de Pablo R, Portero F, Cañizares M, Vaquero M, et al. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2012;188:4412–20.

- [165] Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, Noguera-Julian A, Muñoz-Almagro C, Alarcón A, Juncosa T, et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur J Immunol* 2012;42:3256–66.
- [166] Muntasell A, López-Montañés M, Vera A, Heredia G, Romo N, Peñafiel J, Moraru M, Vila J, Vilches C, López-Botet M. NKG2C zygosity influences CD94/NKG2C receptor function and the NK-cell compartment redistribution in response to human cytomegalovirus. *Eur J Immunol* 2013;43:3268-78.
- [167] Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu YL, Cičin-Šain L, Dechanet-Merville J, Derhovanessian E, Ferrando-Martinez S, Franceschi C, Frasca D, Fulöp T, Furman D, Gkrania-Klotsas E, Goodrum F, Grubeck-Loebenstein B, Hurme M, Kern F, Lilleri D, López-Botet M, Maier AB, Marandu T, Marchant A, Matheï C, Moss P, Muntasell A, Remmerswaal EB, Riddell NE, Rothe K, Sauce D, Shin EC, Simanek AM, Smithey MJ, Söderberg-Nauclér C, Solana R, Thomas PG, van Lier R, Pawelec G, Nikolich-Zugich J. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2014;55:54-62.
- [168] Eskander RN, Tewari KS. Immunotherapy: an evolving paradigm in the treatment of advanced cervical cancer. *Clin Ther* 2015;37(1):20-38.
- [169] Rincon O, Pareja R, Jaramillo S, Aristizábal B. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relacion compleja. *Revista Colombiana de Obsetricia y Ginecología* 2007;58:202-12.
- [170] Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):59-65.
- [171] Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):540-50.
- [172] Hachisuga T, Fukuda K, Kawarabayashi T. Local immune response in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52(1):3-8
- [173] Li C, Ma C, Zhang W, Wang J. The immune function differences and high-risk human papillomavirus infection in the progress of cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2014;35(5):557-61.
- [174] Sheu BC, Lin RH, Ho HN, Huang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol* 1997;56:39-48.
- [175] Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 2002;57:61-79.
- [176] Textor S, Dürst M, Jansen L, Accardi R, Tommasino M, Trunk MJ, Porgador A, Watzl C, Gissmann L, Cerwenka A. Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int J Cancer* 2008;123(10):2343-53.
- [177] Rebmann V, Regel J, Stolke D, Grosse-Wilde H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cancer Biol* 2003;13:371-7.
- [178] Ma D, Gu MJ, Liu BQ. A preliminary study on natural killer activity in patients with gynecologic malignancies. *J Tongji Med Univ* 1990;10:159-63.
- [179] Yang JH, Chen MJ, Chen HF, Lee TH, Ho HM, Yang YS. Decreased expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells in eutopic endometrium in women with adenomyosis. *Hum Reprod* 2004;19:1974-8.
- [180] zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690-8.

- [181] García-Iglesias T, del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cáncer and precursor lesions. *BMC Cancer* 2009;9:186.
- [182] Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy A, Troyo-Sanroman R, Bravo-Cuellar A, Delgado-Rizo V, Garcia-Iglesias T, Hernandez-Flores G, Del Toro-Arreola S. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 2008;8:16.
- [183] Fotino M, Merson EJ, Allen FH Jr. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Ann Clin Lab Sci* 1971;1(2):131-3.
- [184] Moraru M, Cañizares M, Muntasell A, de Pablo R, López-Botet M, Vilches C. Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction. *Tissue Antigens* 2012;80:184–7.
- [185] Kinney W, Hunt WC, Dinkelspiel H, Robertson M, Cuzick J, Wheeler CM; New Mexico HPV Pap Registry Steering Committee. Cervical excisional treatment of young women: a population-based study. *Gynecol Oncol* 2014;132(3):628-35.
- [186] Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, Smith K, Mathews C, Allen RA, Zhang R, Wang S, Wentzensen N. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2013;128(2):265-70.
- [187] Mattila, A et al, Detection of Serum Antibodies to Chlamydia trachomatis in Patients with Chlamydial and Nonchlamydial Pelvic Inflammatory Disease by IPAzyme Chlamydia and Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* 1993;31(4):998-1000.
- [188] Koskela P, Anttila T, Bjørge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E, Saikku P, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2000;85(1):35-9.
- [189] Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angström T, Anttila T, Bergman F, Hallmans G, Ikäheimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl U, Paavonen J, Dillner J. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2002;101(4):371-4.
- [190] Paavonen J. Chlamydia trachomatis infections of the female genital tract: state of the art. *Ann Med* 2012;44(1):18-28
- [191] Markowska J, Fischer N, Filas V, Fischer Z, Breborowicz J, Markowski M. The role of Chlamydia trachomatis infection in cervical cancer development. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999;20(2):144-6.
- [192] Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Törnberg S, Hansson BG, Wang X, Arnheim L, Dahl V, Bremell D, Persson K, Dillner J, Rylander E. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 2005;116(1):110-5.
- [193] Zenilman JM. Chlamydia and cervical cancer: a real association? *JAMA*. 2001;285(1):81-3.
- [194] Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The Relationship of Community Biopsy-Diagnosed Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 to the Quality Control Pathology-Reviewed Diagnoses:An ALTS Report. *Am J Clin Pathol* 2007;127(5):805–15.

- [195] 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;97(14):1072–9
- [196] Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Mod. Pathol* 2006;20(2):167–74.
- [197] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14): 1066-71.
- [198] 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;135(3):468–75.
- [199] 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;22(6):1095–101.
- [200] de Sanjose S, Wheeler CM, Quint WG, Hunt WC, Joste NE, Alemany L, Bosch FX. Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group, Myers ER, Castle PE. Age-specific occurrence of HPV16- and HPV18-related cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22(7):1313-8.
- [201] Kyrgiou M, Poulidakis A, Panayiotides JG, Margari N, Bountris P, Valasoulis G, Paraskevaidi M, Bilirakis E, Nasioutziki M, Loufopoulos A, Haritou M, Koutsouris DD, Karakitsos P, Paraskevaidis E. Personalised management of women with cervical abnormalities using a clinical decision support scoring system. *Gynecol Oncol* 2016;141(1):29-35.

9. ANNEXES

ANNEXE 1: APROVACIÓ DEL COMITÈ ÈTIC



Informe del Comitè Ètic de Investigació Clínica

Doña M^a Teresa Navarra Alcrudo Secretaria del Comitè Ètic de Investigació Clínica Parc de Salut MAR

CERTIFICA

Que este Comitè ha evaluado el proyecto de investigación clínica nº 2011/4293/I titulado "Valor predictivo de las células NK en la progresión y transformación invasiva de la neoplasia Intraepitelial Cervical Grado 2" propuesto por el Dr. Ramón Carreras Collado del Servicio Ginecología y Obstetricia del Hospital del Mar.

Que adjunta documento de consentimiento informado.

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas que se solicitan está plenamente justificado.

Y que este Comitè acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado en el Hospital del Mar por el Dr. Ramón Carreras Collado como investigador principal tal como recoge el ACTA de la reunión del día 7 de Junio de 2011.

Lo que firmo en Barcelona, a 8 de Septiembre de 2011

COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA
CEIC - PARC DE SALUT MAR

Firmado.....
Doña M^a Teresa Navarra Alcrudo

CONSORCI MAR PARC DE SALUT DE BARCELONA | NIF: S-080047E | PAPER ECOLÒGIC

CEIC – Parc de Salut MAR
Dr. Aiguader, 88 | 08003 Barcelona | Telèfon 93 316 06 77 | Fax 93 316 06 36
ceic-psmar@imim.es | www.parcdesalutmar.cat

ANNEXE 2: CONSENTIMENT INFORMAT

Consentimiento Informado para la participación en el estudio CIN2 - NK

Valor predictivo de las células NK en la progresión y transformación invasiva de la Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2

Apellidos y nombre de la paciente	Fecha Nacimiento	Código

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio “**Valor predictivo de las células Nk en la progresión y transformación invasiva de la Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2**”.

Declaro haber leído detenidamente y comprendido el contenido de la Hoja de Información para las pacientes, así como el presente Consentimiento Informado.

Además, el doctor/la doctora Sr./Sra.me ha explicado en una conversación privada de forma clara y detallada las condiciones, la relevancia, el alcance, los riesgos y beneficios del estudio. He tenido la ocasión de plantearle preguntas y todas ellas han sido contestadas. He dispuesto de tiempo suficiente para tomar una decisión.

Entiendo que la participación en el estudio es voluntaria. En cualquier momento, y sin necesidad de justificación, puedo retirar mi conformidad a participar en el estudio. De ello no se derivará ningún tipo de perjuicio que pueda afectar al posterior tratamiento médico que reciba.

Se me ha hecho entrega de la hoja de información para las pacientes, así como del Consentimiento Informado.

Declaro mi conformidad con que las personas encargadas y autorizadas por el Parc de Salut Mar, así como los organismos de control nacionales e internacionales competentes del estudio – todos ellos obligados a guardar secreto profesional – tengan acceso a mis datos personales, es decir, al expediente médico donde figuran dichos datos, siempre y cuando esto sea preciso para verificar que se lleva un registro completo y correcto de los datos relevantes para la evaluación científica, así como que el estudio se está ejecutando correctamente.

Nombre de la paciente	Firma de la paciente	Fecha (escrita a mano)

Declaro que he informado a la paciente arriba firmante sobre las condiciones, la relevancia, el alcance, los riesgos y beneficios del estudio. Le he hecho entrega de la Hoja de información para las pacientes, así como de un duplicado firmado del presente Consentimiento Informado.

Firma del médico responsable	Fecha (escrita a mano)

Un original de este documento se conservara junto con la documentación del médico responsable relacionada con el estudio.

La paciente recibe un duplicado firmado

Médico responsable:
Dirección:
Teléfono:

Consentimiento Informado para la participación en el estudio CIN2 - NK

Valor predictivo de las células NK en la progresión y transformación invasiva de la Neoplasia Intraepitelial cervical grado 2

Estimada paciente:

En el análisis de citología realizada durante su profilaxis de cáncer, se ha detectado una irregularidad. Este resultado necesita ser aclarado con una prueba, que consiste en la realización de una "colposcopia del cuello uterino". Esta colposcopia se basa en la visión a gran aumento de dicho cuello uterino, usando tinciones especiales que ayudan a localizar las posibles lesiones que han causado la alteración citológica, y a obtener una biopsia de cada una de ellas.

Estas lesiones cervicales están causadas por un virus bien conocido, el virus del Papiloma Humano, un virus muy frecuente entre las personas capaces de causar las verrugas genitales y otras lesiones desapercibidas a simple vista, con capacidad de ir degenerando con el tiempo hasta convertirse en pequeños tumores de cuello uterino.

Actualmente, las lesiones de bajo grado (CIN-1) son tratadas de manera conservadora con controles cada 6 meses, por tener una alta probabilidad de desaparecer al poco tiempo (hasta 90%). Las lesiones de medio-alto grado (CIN-2 y 3) tienen una capacidad de regresión menor (alrededor del 30-40% en el caso de los CIN-2). Sin embargo, hoy en día no somos capaces de identificar aquellas pacientes que curarán por si solas. De hecho, todas las lesiones de medio-alto grado son tratadas mediante la realización de una intervención en la que se extrae un pequeño fragmento de cuello uterino, conocida como conización. Esta intervención se realiza con una asa conectada a un generador de electricidad de alta frecuencia. Aunque es sencilla no está exenta de riesgos como sangrado, estenosis cervical, extirpación incompleta de la lesión, infección, alteraciones psicoafectivas, problemas obstétricos a largo plazo).

Nuestra equipo realiza actualmente un estudio clínico, cuyo objetivo es identificar aquellas cuyas lesiones de CIN-2 son susceptibles de regresar espontáneamente, es decir que son capaces de resolverse por si solas. Nosotros le proponemos realizar un seguimiento exhaustivo de dicha lesión, durante un periodo máximo de 2 años, a fin y efecto de dar una oportunidad a su sistema inmune de resolver dicha lesión, y así evitar una posible conización innecesaria. En cualquier caso, si en algún momento se identificara una progresión a una lesión de alto grado (CIN-3) se procedería a una conización terapéutica según protocolo habitual. Cabe señalar, que la progresión de un CIN-2 a un CIN-3 es como máximo del 22% y a un carcinoma microinvasor de 5% en mas de 12 meses.

Ejecución del estudio

Para la aclaración de su resultado se le solicitará presentar-se en esta misma consulta especial de colposcopia, donde se le informará del resultado y de las posibles conductas a seguir. Se le tomará una muestra de sangre, y se le hará una entrevista sobre sus antecedentes médicos y quirúrgicos.

En caso de participar en nuestro estudio, se la citará en 3 meses para el 1er control colposcópico, y se enviarán las muestras de sangre y de tejido cervical a analizar en busca de células NK, unas células que luchan contra las infecciones virales y las células cancerosas.

En ese 3er control se realizarán colposcopia y extracción sanguínea, de manera que podamos evaluar la evolución de la lesión cervical. Y así cada 4 meses y hasta un total de 24 meses, donde se realizará una evaluación final de la lesión cervical. En caso de persistir o no regresar del todo, se realizará un tratamiento definitivo excisional. En caso de regresión completa, se le dará el alta para control en su ambulatorio.

Todas las muestras enviadas al laboratorio serán usadas únicamente para este estudio, y serán guardadas de acuerdo a las exigencias de las normativas por la cual se regulan los ensayos clínicos y demás legislaciones legalmente aplicables.

Ventajas y riesgos de la participación en el estudio

Basándose en los resultados de este estudio clínico existe la posibilidad de desarrollar nuevos y mejores métodos de tratamiento conservador de las lesiones cervicales CIN-2. Usted como

participante podría tener la ventaja de ahorrarse una intervención quirúrgica, que como hemos dicho anteriormente es sencilla y rápida, pero no deja de tener unas complicaciones agudas (sangrado, infección, estenosis de canal, perforación uterina y vesical) y a largo plazo (complicaciones obstétricas como parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, complicaciones neonatales), que podrían evitarse.

Pero también debe ser consciente que cabe la posibilidad, aunque muy pequeña, que su lesión evolucione a un grado superior, de manera que deba ser conizada sin poder terminar el estudio.

Sus derechos como paciente

Su participación en este estudio se realiza sobre una base voluntaria. En cada momento usted tiene el derecho de revocar su decisión de participación en el estudio. No surgirá ninguna consecuencia negativa para usted en el caso que opte por no participar o bien en caso de revocar su decisión de participar en el estudio.

Usted no recibirá ninguna remuneración por la participación en este estudio. Pero tampoco surgirán costos para usted, relacionados con las medidas realizadas en el marco del estudio.

Sírvase dirigirse a su médico responsable en caso de tener dudas durante la realización del estudio.

Confidencialidad de los datos

La totalidad de los datos de carácter personal que se obtengan durante su participación en el presente estudio, se mantendrá confidencial en la medida que la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de protección de datos de Carácter personal y el real Decreto 223/2004, del 6 de febrero por el cual se regulan los Ensayos Clínicos y demás legislación y normativa legalmente aplicables, así exijan.

ANNEXE 3: FULL DE RECOLLIDA DE DADES



FULL RECOLLIDA DADES: CIN2-NK

DATA	DR/A
------	------

NOM	
NHC	EDAT
ID	TELÈFON
PROFESSIÓ	ESTUDIS
RAÇA	ESTAT

ANTECEDENTS MÈDICS

MLT	
Imm.Supr.	TTX Imm.Supr.
ANTECEDENTS FAMILIARS	
SEROLOGIES: Lues - Chlamidia - Herpes - VHB - VIH - CMV	

HÀBITS TÒXICS

Fumadora?	Passiva?	Exfumadora?
Any inici	Tipus tabac	Cig/Dia
Cannabis	Haxix	Altres:

ANTECEDENTS GINECO-OBSTÈTRICS

MQ	TM
TPAL	IVES
MENOPAUSA	DUR
PF	ACO (quin-Anys)
RS (inici-2 anys-total)	
MPI	RS anal
ETS	
Vacuna del VPH	

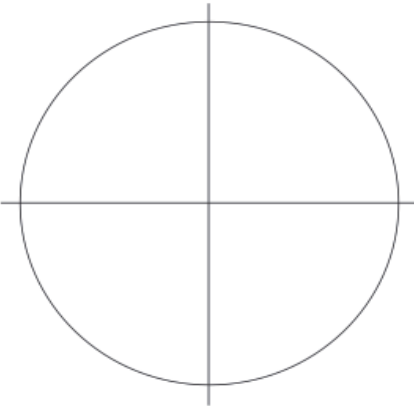
EXPLORACIÓ FÍSICA 1ª VISITA

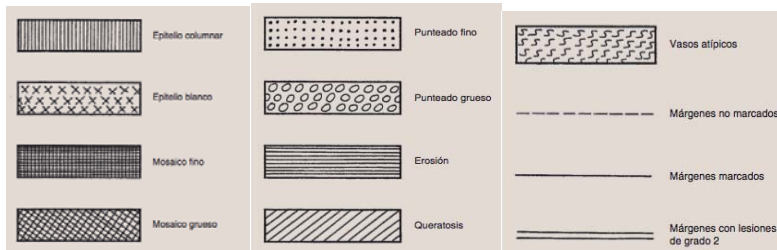
GE		VAGINA
CERVIX: polip - Naboth - eritroplasia - leucoplaquia - condiloma - lesions violàcies - leucorrea - atrofia - erosió - queratosi		
Data	Cito - Colposcopia - Bx	Resultat

FULL RECOLLIDA DADES: CIN2-NK

GE	VAGINA
CERVIX: polip - Naboth - eritroplasia - leucoplaquia - condiloma - lesions violàcies - leucorrea - atrofia - erosió - queratosi	

COLPOSCÒPIA

<input type="checkbox"/> Colposcopia satisfactoria <input type="checkbox"/> Unió escamocolumnar <input type="checkbox"/> Exocervical <input type="checkbox"/> Endocervical Observacions normals <input type="checkbox"/> Epitelio escamoso originario <input type="checkbox"/> Trófico <input type="checkbox"/> Distrófico <input type="checkbox"/> Epitelio columnar <input type="checkbox"/> Zona de transformación normal Observacions anòmals <input type="checkbox"/> Epitelio fino blanco en reacció al ácido acético <input type="checkbox"/> Mosaico regular <input type="checkbox"/> Punteado regular <input type="checkbox"/> Positividad parcial al yodo <input type="checkbox"/> Área negativa al yodo <input type="checkbox"/> Epitelio grueso blanco en reacció al ácido acético <input type="checkbox"/> Mosaico irregular <input type="checkbox"/> Punteado irregular <input type="checkbox"/> Vasos atípicos <input type="checkbox"/> Sospecha de neoplasia invasiva <input type="checkbox"/> Pólipo <input type="checkbox"/> Endometriosis <input type="checkbox"/> Herpes <input type="checkbox"/> Queratosi <input type="checkbox"/> Fina <input type="checkbox"/> Gruesa <input type="checkbox"/> Inflamación <input type="checkbox"/> Condilomatosis <input type="checkbox"/> Tejido de granulación <input type="checkbox"/> Resultados terapéuticos <input type="checkbox"/> Erosión <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Atrofia	<input type="checkbox"/> Colposcopia insatisfactoria <input type="checkbox"/> Unió escamocolumnar no completamente visible <input type="checkbox"/> Cuello uterino no visible <input type="checkbox"/> Inflamación grave <input type="checkbox"/> Atrofia grave  Biopsia <input type="checkbox"/> Exocérnix <input type="checkbox"/> Endocérnix <input type="checkbox"/> Vagina Fotograma <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> Cuello uterino <input type="checkbox"/> Vagina
--	---



Impressió Diagnòstica	
Biòpsia	

ANNEXE 4: CHECK-LIST DEL FICOLL



CHECKLIST PROTOCOLO “Valor predictivo de las células NK en la progresión y transformación invasiva de la Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2”

Código paciente: CIN2-NK.....

Fecha

Operador

Lugar de trabajo

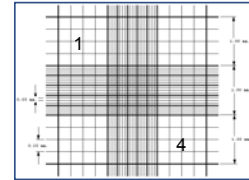
Check-list previo procedimiento:

- Comprobar disponibilidad de lugar de trabajo
- Comprobar disponibilidad de centrífuga basculante
- Comprobar disponibilidad de Ficoll y PBS no estéril
- Comprobar disponibilidad de material (rotulador permanent-marker, 2 Falcon 50mL, 1 tubo cónico Sarstedt tapón amarillo, gradillas, pipetor, pipeta 10mL, puntas, pipeta Pasteur, cámara de Neubauer, microscopio, azul tripano, 5 criotubos, “quesito” isopropanol, recipiente de desechos orgánicos).

Check-list real time:

- 1. Atemperar Ficoll y verter 16mL de Ficoll en 1 tubo Falcon 50ml (pipetor automático con pipeta de 10mL).
- 2. Rotular y colocar en gradillas adecuadas:
 - o 2 Falcon 50 mL (1 para diluir sangre periférica con PBS, 1 para Ficoll)
 - o 2 tubos cónicos 15mL tapón amarillo (Sarstedt; o similar)
- 3. Verter sangre total (4 tubos heparinizados ó EDTA y rotulados con código de la paciente) en Falcon 50mL.
- 4. Separar 1ml de sangre total en criotubo para análisis genético
- 5. Lavar los tubos EDTA con 2mL de PBS y verter la sangre en Falcon 50mL.
- 6. Repetir el paso 4 (total: 32 mL de sangre diluída 1:1 con PBS)
- 7. Verter “gota a gota” la sangre diluída en 1 Falcon de 50mL (pipetor automático con pipeta de 10mL).
- 8. Centrifugar el Falcon de 50 mL en centrífuga basculante a 2100rpm a Tª 24-25°C durante 30 minutos.
 - o DESACELERACIÓN MÍNIMA / aceleración suave
- 9. Descartar volumen plasmático.
- 10. Recoger anillo de PBMCs con pipeta Pasteur e introducirlo en 2 tubos cónicos Sarstedt con tapón amarillo.
- 11. Añadir PBS hasta el límite del recipiente.
- 12. Centrifugar a 1800 rpm durante 8 minutos
 - o aceleración y desaceleración máximas
- 13. Decantar manualmente sobrenadante.
- 14. Resuspender el pellet con 1mL de PBS, y unificar el contenido de 2 tubos cónicos Statedt con tapón amarillo en 1 solo.
- 15. Añadir PBS hasta el límite del recipiente.
- 16. Centrifugar a 1000rpm durante 8 minutos.
- 17. Decantar el sobrenadante manualmente.
- 18. Repetir los pasos 14 a 17 tantas veces como sea necesario hasta obtener sobrenadante transparente, a especificar los lavados totales:
 - o 1 lavado
 - o 2 lavados
 - o 3 lavados

- 4 lavados o más.....
- 19. Resuspender el pellet definitivo en 2mL de PBS + 2% FBS.
- 20. Acudir a la Sala de Cultivos P2 y diluir la muestra en azul tripano para realizar contaje.
- 21. Realizar contaje en microscopio (2 campos en diagonal) y anotarlo:
 - Campo 1:
 - Campo 4:
- 21. Centrifugar la muestra (2mL en tubo cónico Sarstedt tapón amarillo) a 1250rpm durante 5 minutos.
- 21. Durante la centrifugación realizar el recuento de células:



$$\frac{\text{c\u00e9ls campo 1} + \text{c\u00e9ls campo 3}}{2} = \text{c\u00e9ls} / \text{campo} \cdot \text{dil. azul} \cdot 10^4 = \text{c\u00e9ls/mL} \cdot \text{n\u00b0 mL} = \text{c\u00e9ls totales}$$

- 22. Durante la centrifugación rotular los criotubos:
 - Lateral: CIN2-NK / Código pct / n\u00b0 tubo / fecha
 - Tap\u00f3n: C\u00f3digo pct / n\u00b0 tubo
 - Tubo 1: CIN 2_NK 5 \cdot 10^6 c\u00e9ls – Ester (.....\u00b5L)
 - Tubo 2: CIN 2_NK 10^6 c\u00e9ls – Ester (.....\u00b5L)
 - Tubo 3: CIN 2_NK 10^6 c\u00e9ls – Ester (.....\u00b5L)
 - Tubo 4: CIN 2_NK 10^6 c\u00e9ls – Ester (.....\u00b5L)
 - Tubo 5: CIN 2_NK (Gen\u00e9tica)
- 23. Resuspender pellet con 1mL suero FBS.
- 24. Introducir gota a gota 1mL suero con DMSO al 20% almacenado a 4\u00b0C.
- 25. Repartir muestra en los distintos microtubos seg\u00fan rotulaci\u00f3n.
- 26. Colocar criotubos en “quesito” isopropanol. c\u00e9ls/campo
- 27. Colocar “quesito” en congelador “A” a -80\u00b0C (3\u00b0 planta PRBB, laboratorio UPF) durante un m\u00ednimo de 12 horas (-1\u00b0C/min).
- 28. Entrega de la check-list al supervisor.

Eventualidades a comentar:

.....

.....

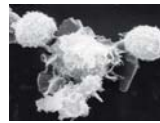
.....

.....

.....

.....

ANNEXE 5: CHECK-LIST DE LA CITOMETRIA DE FLUX



IMMUNOLOGIA

CHECKLIST PROTOCOLO "Valor predictivo de las células NK en la progresión y transformación invasiva de la Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2"

DESCONGELACIÓN-CITOMETRÍA DE FLUJO

Código paciente: CIN2-NK.....
Fecha
Operador
Lugar de trabajo

Check-list previo procedimiento:

- Comprobar disponibilidad de lugar de trabajo, microcentrífuga 5415 R Eppendorf y FACS (Inmunología)
- Comprobar disponibilidad de medio completo de complementado, baño a 37°C,
- Comprobar disponibilidad de material (rotulador permanent-marker,
.....).

Check-list real time **descongelación rápida:**

- 1. Preparar tubo con 12mL de medio completo.
- 2. Introducir el vial congelado en baño a 37°C (manualmente) hasta que quede un cubito.
- 3. Añadir al vial –gota a gota- medio completo hasta que llegue al máximo de capacidad.
- 4. Añadir el contenido del vial al tubo.
- 5. Centrifugar a 1200rpm durante 6 minutos (aceleración y desaceleración máximas).
- 6. Eliminar el sobrenadante.
- 7. Resuspender el volumen con 1mL de Medio Completo.
- 8. Repetir el conteo celular:
 - o Células totales en vial (previamente):
 - o Células totales en vial (actualmente):.....
 - o Índice de viabilidad:

Check-list real time **citometría de flujo:**

- 1. Repartir la muestra en tubos Eppendorf (el volumen necesario para sumar un total de 300.000 células/Eppendorf):
 - o $300.000 \text{ células} \times (1000 \mu\text{L} / \dots \text{ células totales}) = \dots \mu\text{L}$
- 2. Resuspender en 1mL PBS la muestra de cada Eppendorf.
- 3. Centrifugar a 3000rpm x 5 minutos (microcentrífuga).
- 4. Descartar tantos μL de sobrenadante -mediante pipeta p1000- como sean necesarios para llegar a un volumen de 50 μL (homogeneización de concentración: 300.000 células en 50 μL).
- 5. Introducir 50 μL /tubo de solución de bloqueo IgG humana (previamente preparada).
- 6. **Incubación** 25 minutos a 4°C.
- 7. Centrifugar a 3000rpm x 5 minutos (microcentrífuga).
- 8. Introducir 100 μL Ac's Indirectos primarios:
 - o Anti-myc / NKG2A / NKG2C / NKG2D / ILT2 / KIR

- 9. **Incubación** 30 minutos a 4°C.
- 10. Centrifugar a 3000rpm x 5 minutos (microcentrífuga).
- 11. Descartar 150µL de sobrenadante mediante pipeta p200.
- 12. Resuspender con 1mL PBS.
- 13. Centrifugar a 3000rpm x 5 minutos (microcentrífuga).
- 14. Descartar 1000µL sobrenadante mediante pipeta p1000.
- 15. Introducir 100µL Ac Secundario (Ficoeritrina-PE).
- 16. **Incubación** 25 minutos a 4°C. FOTOPROTEGER LAS MUESTRAS.
- 17. Preparar Ac's directos:
 - o 5 µL CD3 PerCP x tubos = µL + 10% extra (...µL) = µL CD3
 - o 10 µL CD56 FITC x tubos = µL + 10% extra (...µL) = µL CD56
 - o µL CD8 APC x tubos = µL + 10% extra (...µL) = µL CD8
- 18. Resuspender en 1000µL PBS.
- 19. Centrifugar a 3000rpm x 5 minutos (microcentrífuga).
- 20. Descartar 1100µL sobrenadante.
- 21. Repetir los pasos 18-20: 2 veces más.
 - o 2º lavado
 - o 3r lavado
- 22. Introducir Ac directos (primarios): 5µL CD3 + 10µL CD56 + ... µL CD8 = ... µL/tubo
 - o Añadir a TODOS los Eppendorf, EXCEPTO a los controles sin anticuerpo!
- 23. **Incubación** 20 minutos a 4°C. FOTOPROTEGER LAS MUESTRAS.
- 24. Resuspender en 1000µL PBS.
- 25. Centrifugar a 3000rpm x 5 minutos (microcentrífuga).
- 26. Descartar 950µL sobrenadante con pipeta.
- 27. Repetir los pasos 23-25: 1 vez más.
- 28. Resuspender en 300µL PBS.
- 29. Acudir al citómetro a analizar las muestras.

Eventualidades a comentar:

.....

.....

.....

.....

.....

.....