

A mi *MADRE*, con mayúsculas,  
modelo de entrega y generosidad.  
Gracias por hacernos la vida fácil

Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres

*Agradecimientos*

Todo mi agradecimiento al Doctor A. García Iglesias, sin él no habría sido posible esta Tesis. A sus conocimientos, su apoyo y estímulo. El reconocimiento de haber iniciado, creado y desarrollado en Salamanca una escuela de Patología Tracto Genital Inferior. Muchos seremos los que continuaremos con su trabajo, esperando no defraudarle. Esperando contar con su figura mientras él lo considere oportuno.

Al Dr. David Beltrán Vaquero, que en la distancia, ha enviado el estímulo necesario para seguir con el trabajo.

A la Dra. Sánchez Estella, mi maestra en el campo de la ginecología, de las relaciones con las pacientes y de la ética profesional. Te has convertido, sin quererlo, en el modelo a seguir para varias generaciones de ginecólogos que hemos tenido la suerte de contar contigo. Gracias por tu apoyo incondicional en tantos momentos, algunos difíciles, por tu estímulo para emprender retos profesionales e inculcar la necesidad de la formación continua.

A todos mis compañeros, cada uno con sus características y habilidades, aportando al grupo los conocimientos y el esfuerzo para conseguir un futuro brillante para la ginecología de Salamanca.

Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres

Dr. Ángel García Sánchez, Director del Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral "*Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres*" realizada por Dña. María José Doyague Sánchez, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, reúne todas las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Para que conste y a petición del interesado, expido el presente certificado.

Salamanca Diciembre 2015

Fdo. Prof. D. Ángel García Sánchez

Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres



VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO  
FACULTAD DE MEDICINA

Calle Alfonso X el Sabio s/n, 37007 - Salamanca  
dpto..cbd@usal.es

El Dr. Ángel García Iglesias y el Dr. Ángel García Sánchez Profesores Titulares de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Salamanca y el Dr. David Beltrán Vaquero Centro de Diagnóstico Médico Internacional, Ayuntamiento de Madrid

CERTIFICAN que:

La presente Tesis Doctoral, titulada “Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres”, realizada por Dña. María José Doyague Sánchez, licenciada en Medicina y Cirugía, se ha realizado bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, méritos suficientes de originalidad, metodología y rigor científico para que su autor pueda optar con ella al título de Doctor.

Por ello, autorizamos la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Fdo.	Fdo.	Fdo.
Dr. Ángel García Iglesias	Dr. Ángel García Sánchez	Dr. David Beltrán Vaquero

Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	16
<b>1.1. EL VIRUS DEL PAPILOMA.</b>	20
<b>1.1.1. ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL PAPILOMA</b>	23
<b>1.1.2. CICLO BIOLÓGICO</b>	27
<b>1.1.3. ENTRADA DEL VIRUS</b>	27
<b>1.1.4. ETAPAS DEL CICLO VITAL</b>	28
<b>1.2. RESPUESTA INMUNE</b>	30
<b>1.3. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR HPV Y CARCINOGENESIS</b>	32
<b>1.3.1. INFECCIÓN POR VPH Y ONCOGÉNESIS</b>	32
1.3.1.1. Eliminación	34
1.3.1.2. Infección Latente	35
1.3.1.3. Infección Clínica	35
1.3.1.4. Reactivación	35
1.3.1.5. Recurrencia	35
1.3.1.6. Persistencia	35
1.3.1.7. Progresión	35
<b>1.3.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS HPV</b>	39
<b>1.3.3. CO-FACTORES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENESIS DEL VPH</b>	41
1.3.3.1. CO-FACTORES MEDIOAMBIENTALES o EXÓGENOS	42
a. Hábito Tabáquico	42
b. Anticonceptivos hormonales	43
c. Utilización del preservativo	43
d. Número de partos	44

e. Otras infecciones de transmisión sexual	44
f. Factores nutricionales	44
1.3.3.2. CO-FACTORES VIRALES	45
a. Genotipo viral	45
b. Variante de VPH	45
c. Carga viral	46
d. Integración viral	46
e. Coinfección	46
f. Metilación de genes virales	48
1.3.3.3. FACTORES DEL HUESPED	48
a. Inmunosupresión	48
b. Hormonas endógenas	49
c. Factores genéticos	49
<b>1.4. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>49</b>
<b>1.4.1. IMPACTO NUMÉRICO DE LA INFECCIÓN POR VPH</b>	<b>49</b>
<b>1.4.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE CÉRVIX</b>	<b>50</b>
<b>1.4.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS CERVICALES     INTRAEPITELIALES</b>	<b>52</b>
1.4.3.1. CIN I	52
1.4.3.2. CIN II-III	53
<b>1.5. SINTOMATOLOGÍA</b>	<b>54</b>
<b>1.5.1. VERRUGAS CUTÁNEAS</b>	<b>55</b>
<b>1.5.2. VERRUGAS GENITALES</b>	<b>56</b>
<b>1.5.3. PAPILOMA RESPIRATORIO</b>	<b>58</b>

<b>1.5.4. VPH EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS</b>	59
<b>1.6. TRANSMISIÓN</b>	59
<b>1.6.1. VERTICAL</b>	59
<b>1.6.2. CONTACTO SEXUAL</b>	60
<b>1.6.3. TRANSMISIÓN HORINZONTAL</b>	60
<b>1.7. ACTUACIÓN FRENTE A LAS LESIONES CERVICALES</b>	61
<b>1.8. TRATAMIENTO</b>	64
<b>1.8.1. TRATAMIENTO ABLATIVO o DESTRUCTIVO</b>	66
1.8.1.1. Criocoagulación	66
1.8.1.2. Termocoagulación	66
1.8.1.3. Electrocoagulación	67
1.8.1.4. Laser	67
<b>1.8.2. TRATAMIENTO ESCISIONAL. CONIZACIÓN</b>	68
1.8.2.1. Conización Bisturí Frío	68
1.8.2.2. Conización Laser	68
1.8.2.3. Conización Asa Diatérmica (Lletz, Leep)	69
<b>1.8.3. HISTERECTOMÍA</b>	70
<b>1.9. TRATAMIENTO PREVENTIVO</b>	71
<b>1.9.1. PREVENCIÓN PRIMARIA. La vacuna del papiloma</b>	71
1.9.1.1. Tipos de vacunas	71
1.9.1.2. Seguridad de las vacunas	72
1.9.1.3. Principios de las vacunas L1 de VPH	73
1.9.1.4. Mecanismos de protección	75
1.9.1.5. Especificidad de tipo	75

1.9.1.6. Duración de la protección	76
1.9.1.7. Cuando y a quién vacunar	78
<b>1.9.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA</b>	<b>79</b>
1.9.2.1. Cribado citológico	79
1.9.2.2. Nuevas tecnologías	83
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>88</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>88</b>
<b>3.1. PARA EL PRIMER OBJETIVO SE ESTABLECEN LAS SIGUIENTES HIPÓTESIS</b>	<b>88</b>
<b>3.2. PARA EL SEGUNDO OBJETIVO SE ESTABLECEN LAS SIGUIENTES HIPÓTESIS</b>	<b>89</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>89</b>
<b>4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>89</b>
<b>4.2. CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA</b>	<b>90</b>
<b>4.3. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA</b>	<b>93</b>
<b>4.3.1. CRITERIO DE INCLUSIÓN DE LA MUESTRA</b>	<b>93</b>
<b>4.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>	<b>93</b>
<b>4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO</b>	<b>94</b>
<b>4.5. PROCEDIMIENTO Y TÉCNICA</b>	<b>94</b>
<b>4.5.1. PROCEDIMIENTO</b>	<b>94</b>
<b>4.5.2. TÉCNICAS</b>	<b>95</b>

<b>4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	98
<b>4.6.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA</b>	98
<b>4.6.2. CONTRASTE DE HIPÓTESIS</b>	98
<b>4.6.3. DESARROLLO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	100
<b>5. RESULTADOS</b>	101
<b>5.1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO</b>	101
5.1.1. Distribución por edad	101
5.1.2. Distribución por paridad	102
5.1.3. Distribución por la actividad laboral	103
5.1.4. Distribución por lugar de residencia	104
5.1.5. Hábitos de la mujer	105
5.1.6. Métodos anticonceptivos	106
5.1.7. Resultados de la citología	107
5.1.8. Imagen colposcópica vasos	108
5.1.9. Imagen colposcópica	109
5.1.10. Resultados anatomo-patológicos	110
5.1.11. Localización de la lesión	111
5.1.12. Tamaño de la lesión	112
5.1.13. Tratamiento realizado	113
5.1.14. Márgenes de resección	114
5.1.15. Penetración endocérvix	115
<b>5.2. RESULTADOS A LOS 6 MESES</b>	116
5.2.1. Citología	
5.2.2. Imagen colposcópica vascular a los 6 meses	117
5.2.3. Hallazgos colposcópico a los 6 meses	118
5.2.4. Tamaño de la lesión a los 6 meses	119
<b>5.3. RESULTADOS A LOS 12 MESES</b>	120

5.3.1.	Citología a los 12 meses	120
5.3.2.	Valoración colposcópica a los 12 meses	121
5.3.3.	Localización de la lesión a los 12 meses	122
5.3.4.	Tamaño de la lesión a los 12 meses	123
5.4.	ESTUDIO GENOTIPO VIRAL	124
5.4.1.	Genotipo viral HPV al inicio	124
5.4.2.	Genotipo viral a los 12 meses	125
5.5.	ESTUDIO MULTIVARIANTE	126
5.5.1.	Análisis multivariante del genotipo viral	126
5.5.2.	Análisis multivariante. Características de la población	127
5.5.3.	Análisis multivariante de la modalidad del tratamiento	128
5.5.4.	Análisis multivariante de la localización de la lesión	129
5.5.5.	Análisis multivariante según el tamaño de la lesión	130
5.5.6.	Análisis multivariante de las características colposcópicas	131
5.5.7.	Análisis multivariante de las características vasculares	132
5.5.8.	Análisis multivariante de los márgenes de resección	133
6.	DISCUSIÓN	134
7.	CONCLUSIONES	146
8.	BIBLIOGRAFÍA	147
9.	ANEXOS	176
9.1.	Consentimiento informado Tratamiento	
9.2.	Hoja informativa tras el tratamiento	
9.3.	Hoja verificación quirúrgica	
9.4.	Registro colposcopia	
9.5.	Programa de la Junta Castilla y León 2013	
9.6.	Clasificación Colposcópica Barcelona 2012	
9.7.	Clasificación vasos colposcópicos 1981	



## 1. INTRODUCCION

El cáncer cervical, con 528.000 casos nuevos al año, es el cuarto cáncer mas frecuente que afecta a las mujeres en el mundo, después del de mama, colorrectal y pulmón, afectando sobre todo a los países con bajo recursos del África subsahariana. Es la cuarta causa de muerte por cáncer de las mujeres en el mundo (266.000 muertes en el 2012). El 70% de los casos ocurren en áreas con bajo nivel de desarrollo y 1/5 de los nuevos casos se diagnostican en la India.

El cáncer de cuello tiene devastadores efectos humanos, sociales y económicos y no debe ser una sentencia de muerte, ni siquiera en los países subdesarrollados. La incidencia en el África subsahariana es de 34.8 nuevos casos por cada 100.000 mujeres al año con una mortalidad de 22.5 por 100.00 mujeres por esta enfermedad. Comparando la incidencia en EEUU 6.6 y 2.5 por 100.000. Esta drástica diferencia se explica por la facilidad al acceso de los programas de screening para su temprano diagnóstico y tratamiento.

Regiones de alto riesgo, con una estimación de más de 30 ASRs por 100.000, incluyen el este de África (42,7), Melanesia (33.3), Sur (31,5) y Oriente (30,6) África. Las tarifas son más bajas de Australia / Nueva Zelanda (5,5) y Asia Occidental (4,4). Cáncer de cuello uterino sigue siendo el cáncer más común en las mujeres en el África Oriental y Oriente. Hubo un estimado de 266.000 muertes por cáncer cervical en todo el mundo en 2012, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer



en las mujeres. Casi nueve de cada diez (87%) muertes por cáncer cervical se producen en las regiones menos desarrolladas. La mortalidad varía 18 veces entre las diferentes regiones del mundo, con tasas que van desde menos de 2 por 100.000 en Asia Occidental, Europa Occidental y Australia / Nueva Zelanda a más de 20 por 100.000 en Melanesia (20.6), Oriente (22,2) y Este (27,6) África. (1)

Estos hallazgos establecen la necesidad de aplicar la herramientas disponibles para el cáncer de cuello uterino: la vacunación contra el VPH en combinación con los programas nacionales bien organizados para la detección y el tratamiento. “These findings bring into sharp focus the need to implement the tools already available for cervical cancer, notably HPV vaccination combined with well-organized national programmes or screening and treatment,” stresses Dr Wild. (2)

A pesar de que las verrugas y los papilomas se conocen desde tiempos prehistóricos, su naturaleza infecciosa solo se reconoció desde principios del siglo pasado (3) (4). El desarrollo de análisis moleculares, la confirmación de la pluralidad del virus del papiloma, estructura y organización del genoma la actividad génica y su papel en desarrollo del cáncer humano fueron intensamente estudiados en los años 70 y 80. Estos estudios recibieron un fuerte impulso, como consecuencia de la hipótesis de que algunas variedades del virus del papiloma humano desempeñaba una función importante en el cáncer de cuello uterino humano (5) (6).

El descubrimiento de nuevos tipos de VPH en el cáncer de cuello uterino y otros cánceres ano-genitales (7) (8) y sus precursores (9) (10) dieron lugar a un fuerte auge en la actividad investigadora y a un incremento de publicaciones sobre el VPH (11)

En 1972 Stepania Jablonska, define la relación entre el virus del papiloma humano y el cáncer de piel en las epidermodisplasia verruciformes. Posteriormente, descubre el VPH 5 junto a Gerard Orth (del instituto Paster) en el cáncer de piel (12). Más tarde en 1976 el virólogo alemán Zur Hausen publica la hipótesis de que el papiloma virus juega un importante papel en la aparición del cáncer cervicouterino y en 1983 identifica el HPV 16 y 18. Recibe el premio Nobel de medicina en 2008, junto a Francois Barre-sinoussi y Luc Montagnier.(13).

Uno de los descubrimiento más importantes en la investigación oncológica de los últimos 25 años, ha sido la demostración de que el cáncer de cuello está promovido por la infección persistente de ciertos genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano.

La evidencia científica ante los numerosos e irrefutables estudios, ha permitido demostrar y describir pormenorizadamente que el cáncer de cuello uterino es en realidad, una secuela a largo plazo de una infección de transmisión sexual, no resuelta y provocada por ciertos genotipos de VPH (14).

Las asociaciones observadas entre la infección por VPH y el cáncer cervical, son las más positivas dentro de la oncología humana actual, existiendo consenso mundial en calificar al VPH como la causa necesaria, aunque insuficiente, debido al gran número de infecciones que se resuelven espontáneamente (15).

Varios virus se han relacionado con la producción de cáncer: adenovirus, herpes virus, poliomavirus, retrovirus etc. Se estima que aproximadamente el 20 % de las neoplasias en humanos están producidas por virus. En este sentido los papilomavirus causan más del 5 % de todos

los tumores malignos en el ser humano, siendo el cáncer de cérvix el tumor más típico al que se asocia. Quinientos mil casos de cáncer cervicouterino se diagnostican al año en el mundo, provocando un cuarto de millón de fallecimientos, siendo la mayoría (80 %), en países en vías de desarrollo. En España se supone que es la segunda neoplasia más frecuente entre mujeres jóvenes (14-44 años), por detrás del cáncer de mama. Los gastos médicos derivados del contagio de VPH son superponibles a los VIH (16).

El virus del Papiloma humano pertenece a la familia de los papilomavirus y como tal, es capaz de infectar solamente los queratocitos de la piel y las mucosas. La mayoría no producen síntomas y algunos producen verrugas, mientras que otros (en la minoría de los casos) progresan a cánceres de cérvix, vulva, vagina y pene, orofarínge y ano. Investigaciones recientes revelan cierta asociación entre HPV y un incremento del riesgo vascular (17).

Más de treinta a cuarenta tipos de VPH son transmitidos por contacto sexual, e infectan la región ano-genital. Algunos de ellos causan verrugas genitales y otros virus llamados de alto riesgo, cuando causan infecciones persistentes pueden progresar a lesiones desde precancerosas hasta cáncer invasivo. Sin embargo la mayoría de las infecciones por estos tipos de alto riesgo no causan enfermedad (18).

La mayoría de las infecciones por VPH en mujeres jóvenes son temporales y no tienen significancia a largo plazo. Al año regresan el 70 % de las infecciones y un 90 % lo hace a los 2 años (19). Sin embargo, cuando persiste la infección (un 5-10 % de las mujeres infectadas), hay un riesgo importante de desarrollar lesiones precancerosas en el cérvix, que pueden progresar a cáncer cervicouterino. Este proceso tarda por lo

general un tiempo variable, dependiendo de la respuesta inmunológica, periodo durante el cual se deben detectar y tratar las lesiones y evitar la progresión a cáncer invasivo (20).

### **1.1. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

El virus del papiloma humano ha convivido con la especie humana durante milenios, sufriendo relativamente pocos cambios en su composición genética. Es un virus antiguo, omnipresente, bien adaptado al huésped e inteligentemente aislado de la respuesta inmune. Son virus muy estables con capacidad de infección duradera y resistente a múltiples agentes terapéuticos. Pueden afectar a distintos huéspedes, incluidos animales, con especificidad de especie, con los que han ido evolucionando a través de millones de años. Ocasionan infecciones silentes, clínicas, transitorias, latentes o persistentes que afectan al epitelio escamoso (piel y mucosas), que van desde infecciones asintomáticas a lesiones benignas o procesos malignos. Pueden afectar a la piel, región anogenital o región anal

Taxonómicamente los virus del papiloma humano pertenece a la familia Papillomaviridae, que incluye 16 géneros diferentes. Los que afectan al hombre se agrupan en 5 géneros : Alpha, Beta, Gamma, Mu y nu papilomavirus.

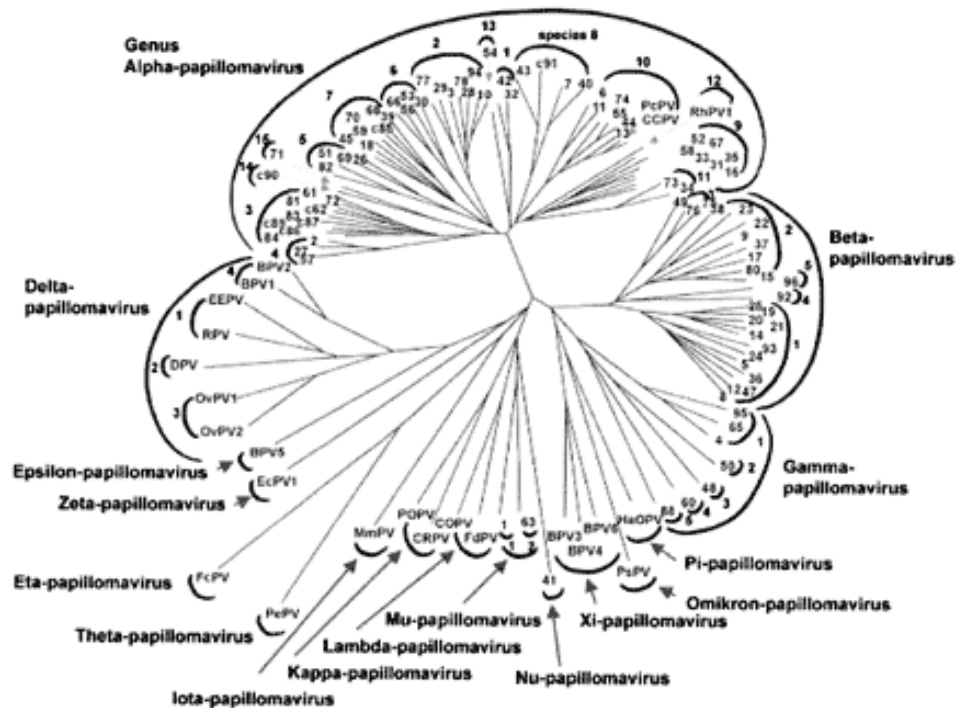


Figura 1. Árbol filogenético del virus papiloma (21)

En función de su *tropismo* se clasifican en:

1. GENOTIPOS DE VPH QUE AFECTAN A LA PIEL.  
 Producen generalmente infecciones inaparentes en sujetos inmunocomprometidos. Se aíslan frecuentemente en verrugas cutáneas de enfermos con epidermodisplasia verruciforme, Inmunodeficiencia Severa Combinada, en lesiones cutáneas en pacientes inmunodeprimidos post-transplante y en algunas lesiones epiteliales como enfermedad de Bowen, queratosis actínica (1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63, 65).
  
2. GENOTIPOS DE VPH QUE AFECTAN A LAS MUCOSAS (alfa papillomavirus ). Se identifican en lesiones benignas y malignas del tracto ano-genital de ambos sexos.

Ocasionalmente, estos tipos virales se aíslan en tejidos de la cavidad oral, orofaringe, laringe y en menor grado esófago, conjuntiva y lecho ungueal, (6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 73).

3. Finalmente el último grupo de VPH se encuentran, indistintamente en tejidos y lesiones cutáneas o mucosas (2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62 y 72) y su asociación con lesiones malignas está menos establecida.

Los HPV cutáneos mucosos del género alfa se clasifican según su capacidad y habilidad para promover la transformación maligna de las células infectadas, interfieren con la proliferación y estabilización del genoma celular :

- LR-HPV: *Bajo Riesgo Oncogénico*. 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89. No relacionados con procesos malignos.
- HR-HPV: *Alto Riesgo Oncogénico*.
  - Carcinogénicos. WHO (World Health Organisation) describe doce tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59.
  - Probable carcinogénico: el 68
  - Posible carcinogénico: el 26, 53, 66, 67, 70, 73 y 82.

Se asocian a lesiones de alto grado y cáncer de cérvix, vagina, vulva, pene, ano, amígdalas, orofaringe y base de la lengua.

La expresión clínica más conocida de la infección viral la constituyen los condilomas acuminados o verrugas genitales, asociados en el 90 % a infecciones por los genotipos 6 y 11. (22)

### 1.1.1. ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

Los virus del papiloma son pequeños (55 nm), desnudos, compuesto por una cápside icosaédrica de 72 capsómeros, que envuelve a una doble cadena de ADN circular de 8000 pares de bases.

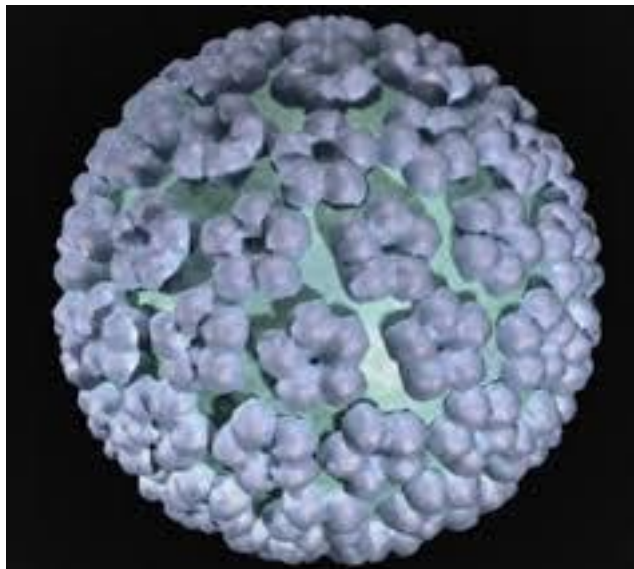


Figura 2. *Virus Papiloma HPV*

Se conoce la secuencia de mas de 150 tipos de VPH, de los cuales 40 infectan el aparato genital.

El genoma viral del VPH, posee nueve marcos de lectura abierta (Open Reading Frames: ORFs) diferentes. Cada uno representa un gen viral que codifica una proteína responsable de las características biológicas del virus (afinidad por el huésped, tropismo celular y patogenia de la infección). Su genoma lo comparten los 200 genotipos secuenciados hasta la fecha, constanding de tres partes. (23)

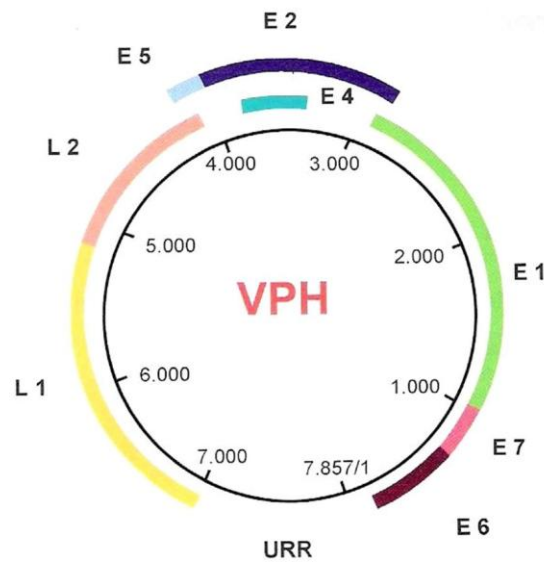


Figura 3. *Regiones HPV*

- I. REGION TEMPRANA (E): representa al 45 % del genoma. Tiene las ocho regiones de lectura abierta (E1-E8) que codifican las proteínas no estructurales cuya función es controlar la replicación del ADN viral.
- Proteínas E1-E2: pueden actuar como activadores de la transcripción.
    - E1. Recluta la maquinaria del DNA para la replicación viral
    - E2.
      - \* Punto de integración del genoma viral en el huésped y así regula la expresión de E6 y E7 (sobrexpresión)
      - \* Recluta E1, para mejorar la replicación viral.
      - \* Papel importante en la transferencia de DNA a las células hijas durante la división de las células del huésped.



- Proteínas E4. . La mas abundante y tardía. Interviene en la maduración, amplificación, replicación y liberación viral
- Proteínas E5: oncoproteína que interviene en las etapas iniciales. Estimula la proliferación viral, evita el sistema inmune del huésped (HLA-I). No se integra en el DNA huésped (episoma)
- Proteínas E6: oncoproteína transformadora. Su diana principal p53 (proteína supresora tumoral). Evita fenómenos de apoptosis celular en respuesta al daño celular, desestabilización cromosómica, integración el DNA viral en el huésped y activación de la telomerasa
- Proteína E7: oncoproteína transformadora. Altera la regulación del ciclo celular. Su diana, el gen supresor del retinoblastoma pRb. Su inactivación favorece la replicación viral y celular manteniendo la diferenciación de las queratinocitos en fase S.

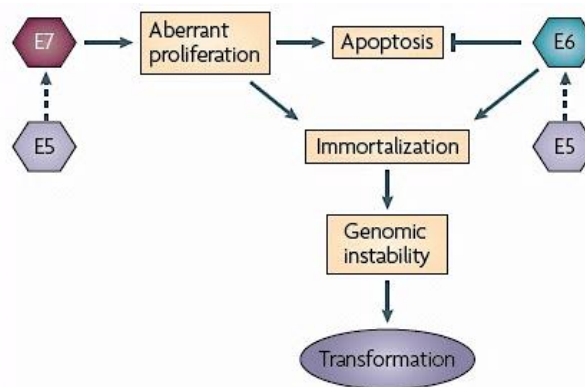


Figura 4. Acción oncoproteínas E6 y E7 (24)

- II. REGION TARDIA: (L) Corresponde al 40 % del genoma. Codifica proteínas estructurales. Consta de 2 genes L1-L2, cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside. Son necesaria para la penetración del virus en la

membrana basal del queratinocito, punto de partida de la infección viral

III. REGIÓN LARGA DE CONTROL LCR, constituye el 15 % del genoma viral. Contiene el origen de la replicación y algunas regiones promotoras, estimuladoras y represoras de la expresión de genes (E6 y E7) y replicación viral. (25)

E1, E2, E4, E5, E6 y E7 son las primeras proteínas expresadas en la replicación viral en las capas bajas e intermedias del epitelio. L1 y L2 se expresan tardíamente, en las capas superficiales del epitelio en donde tiene lugar el ensamblaje y liberación viral.

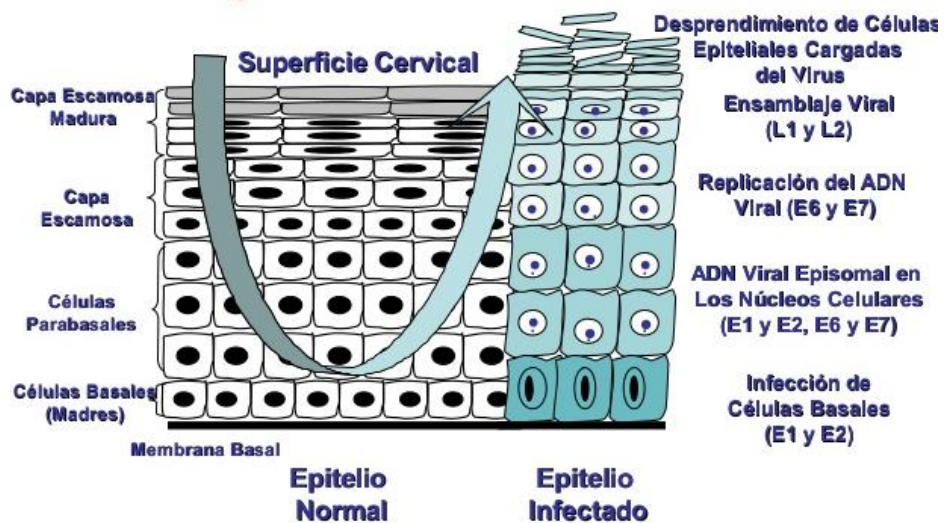


Figura 5. Expresión de las proteínas virales (26)

Los genes de expresión temprana (E) difieren en su secuencia entre los diferentes tipos de VPHs y son utilizados para la detección específica del virus.

Los genes de expresión tardía (L) presentan muchas similitudes entre los diferentes tipos. L1 ORF es la zona más constante del genoma viral y se ha utilizado para la clasificación de los diferentes tipos de HPV (27). Constituye la diana diagnóstica, respuesta serológica a la infección y base en la síntesis de las vacunas profilácticas

### **1.1.2. CICLO BIOLÓGICO.**

Los VPH pertenecen a la familia Papillomaviridae, un grupo de virus que ha evolucionado a lo largo de millones de años que infecta a pájaros y mamíferos (28). Dentro de esta familia, el género Alphapapillomavirus se han especializado en infectar el aparato reproductor humano (21).

Los papilomavirus están perfectamente adaptados a su tejido huésped natural, la célula epitelial en vías de diferenciación de la piel o las mucosas y activa la maquinaria celular en beneficio propio (29). La capa basal y parabasal del epitelio escamoso es la que tiene la capacidad de dividirse, proliferar y diferenciarse

### **1.1.3. ENTRADA DEL VIRUS**

El VPH infecta las células de la capa basal del cérvix, normalmente en la zona transicional, que separa, geográficamente el epitelio plano estratificado no queratinizado y el glandular. La delgadez tisular de esta zona junto con pequeñas roturas tisulares y la exposición a un pH vaginal ácido propician que esta superficie anatómica sea de especial riesgo.

El HPV penetra en el citoplasma de las células basales por un mecanismo de endocitosis, el cual está mediado por complejos de

proteínas, que actúan a modo de receptor y que se unen a la porción L1 del virus. El VPH 16 y 18 lo hacen a través de la clatrina, en tanto que el VPH 31 lo realiza mediante la caveolina. Se ha sugerido que, para mantener la infección, el virus debe infectar una célula madre epitelial (30). La longevidad de estas células es la clave de la persistencia.

#### 1.1.4. ETAPAS DEL CICLO VITAL

- a. Mantenimiento del genoma y proliferación celular en las capas basales
- b. Mantenimiento y amplificación del genoma viral en las capas altas del epitelio
- c. Embalaje viral y liberación

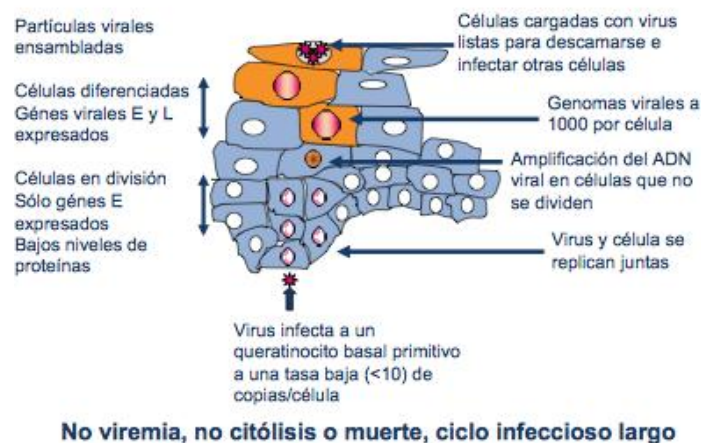


Figura 4. *Ciclo infeccioso del VPH*

El ADN viral es transportado al núcleo, se fragmenta entre E1 y E2 y se integra en el código genético de la célula epitelial. Que produce viriones, que son exocitados. Las lesiones citopáticas producidas por VPH se concretan en aberraciones cromosómicas (numéricas, estructurales y funcionales): aneuploidías, deleciones en brazo corto del cromosoma 11, y en el largo del 18 (31). Mediante hibridación genómica comparada

se han detectado en el CIN I la aparición repetida y precoz de anomalías en el cromosoma 3.

En el estrato basal la replicación del ADN es escasa (unas 40 copias por célula infectada), estrategia utilizada para eludir la respuesta inmune. Aparecen en forma de plásmidos nucleares, sólo se expresan productos de genes tempranos y corresponde al “estado no productivo” de la infección.

A medida que las células migran a los estratos superiores parabasal y espinoso, se produce multiplicación celular y amplificación del ADN viral en cantidad abundante (sobre 1.000 copias por célula), apareciendo los típicos coilocitos (fase productiva). Estos queratinocitos, con el genoma amplificado, expresan marcadores de diferenciación celular (queratinas 1, 19, 4, 13) y de entrada en el ciclo celular (MCM, Ki 67, PCNA, ciclina E y A).

La maduración y diferenciación celular hacia la superficie del epitelio se concreta en las células granulares, donde los ácidos nucleicos se envuelven por la cápside, conformando los viriones que son expulsados por las células escamosas maduras al exterior e inician el ciclo infectivo. Este proceso dura tres semanas, que es periodo de maduración de las células basales a las superficiales que se descaman.

Estas lesiones suelen ser eliminadas por la respuesta inmunitaria mediada por células del huésped contra proteínas del HPV. En un 50% se produce seroconversión, con producción de anticuerpos contra HPV L1. Algunos virus apenas estimulan la respuesta del huésped, siendo el VPH 16 muy eficaz en la tarea de eludir la respuesta inmune. Este hecho se traduce en una mayor persistencia en el tiempo, tanto de la infección como

de las lesiones que produce. Los estados de inmunosupresión producen alteraciones en la respuesta inmune humoral y celular, propiciando la aparición de tipos virales no habituales en pacientes sanas, en detrimento de la frecuencia de VPH 16. (32) (33).

## 1.2. RESPUESTA INMUNE AL VPH.

La capacidad de responder a la infección vírica es de dos tipos:

- I. Inmunidad innata o inespecífica.
- II. Inmunidad adquirida, específica o adaptativa.

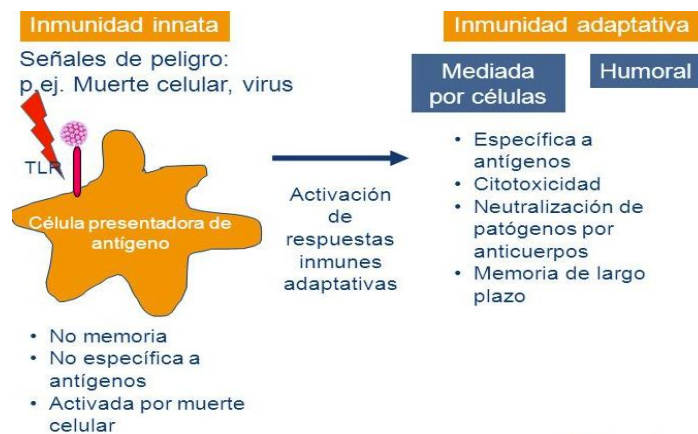


Figura 5. Cooperación sistema inmune (34)

La respuesta inmunitaria frente al virus viene determinada por las peculiares características biológicas del virus y el entorno en el que se desarrolla su tropismo.

- *Características del virus* que evade la respuesta innata inmune y retrasa la activación de la respuesta inmune adaptativa.
  - E6 y E7 disminuyen la respuesta del interferón Tipo 1
  - No causa viremia. Pocas proteínas virales
  - No causa inflamación ni muerte celular. Por lo que no se liberan citoquinas pro-inflamatorias (queratinocitos),

no se activan las células de Langerhans y las células dendríticas del estroma y no hay estímulo para procesamiento y presentación de antígenos (35)

- El epitelio del Tracto Genital Inferior tiene *vías de defensa*:
  - Integridad del epitelio
  - Inmunidad mediada por el interferón y NK evita la entrada del virus en las células
  - Defensa de la célula infectada. Se promueve la muerte de células infectadas y respuesta citotóxica frente a las células infectadas

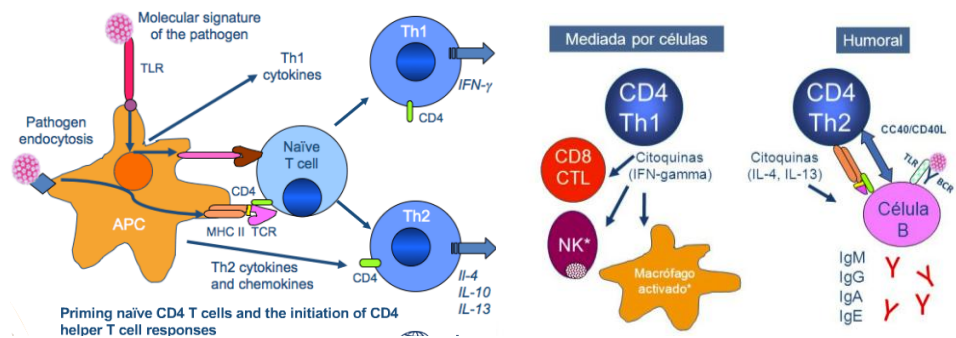


Figura 6. Respuesta sistema inmune del huésped frente a la infección HPV (34)

El virus es fagocitado por las células de Langerhans que presentan el antígeno en su superficie. El péptido viral junto con el HLA de clase II será reconocido por el receptor de las células T (TCR), presente en el linfocito CD4.

Para que el linfocito se active, debe además conectar sus receptores CD-40 y CD 28 respectivamente con los péptidos CD 40 y B7 situados

en la superficie de las células de Langherans, convirtiéndose así en linfocito T helper de tipo 1 (th1) o de tipo 2 (Th2).

Los linfocitos T helper (colaboradores) generan señales solubles (citocinas) y de membrana, que estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos, a los macrófagos a destruir los virus fagocitados y a los linfocitos T CD8 y NK a lisar las células infectadas.

La infección natural produce una deficiente respuesta ante la infección por HPV. La mitad de las mujeres infectadas no generan anticuerpos. Las células inmortalizadas por el HPV conducen a la persistencia viral, base de la transformación neoplásica. Cuando se generan anticuerpos, estos son insuficientes para evitar reinfección por el mismo tipo viral o impedir infección por otros genotipos diferentes de HPV. (36)

### **1.3. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VPH Y CARCINOGENESIS.**

#### **1.3.1. INFECCIÓN POR VPH Y ONCOGÉNESIS.**

La infección por VPH tiende de manera natural hacia la curación espontánea. Si la infección inicial no se resuelve y se hace persistente, en los serotipos de alto riesgo, puede iniciarse un proceso de carcinogénesis, que induce lesiones escamosas intraepiteliales. Son consecuencias de sucesivas alteraciones genéticas derivadas de la infección por virus del papiloma de alto riesgo oncogénico.

El ciclo comienza cuando las partículas infecciosas alcanzan la capa basal del epitelio, a través de pequeñas roturas donde se unen las



células y penetran en ellas. El ciclo de replicación en el epitelio se divide en dos partes en primer lugar el genoma viral se replica hasta aproximadamente 100 copias y durante periodos variables de tiempo mantiene este bajo número de copias en estas células inicialmente infectadas pero que todavía son competentes y capaces de replicarse, diferenciarse y queratinizarse. Otras veces la infección persiste y/o progresa, pudiendo originar diferentes lesiones que van desde CIN 1 a cáncer de cuello.

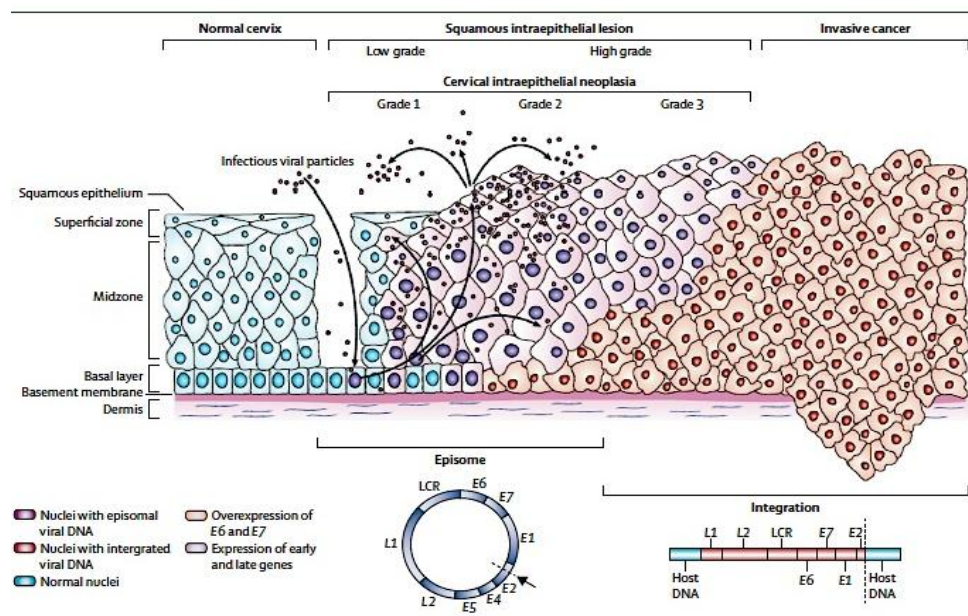


Figura 7. Lesiones ocasionadas por el virus HPV y patogénesis (37)

Muchas de estas infecciones son asintomáticas y no provocan lesiones clínicas (condilomas), ni modificaciones citológicas o histológicas subclínicas. La mayoría de las infecciones son transitorias.

Lo más frecuente es que el virus esté en forma de episomas en la célula huésped, integrándose en su genoma en las lesiones de alto grado y procesos malignos.

Todos estos procesos están modulados por la respuesta inmunitaria a la infección HPV. El virus, especialista en evadir la respuesta inmunológica, no causa viremia, no causa muerte ni necrosis celular (no estimula la inmunidad innata), la expresión de proteínas inmunógenas es tardía (L1) en capas superficiales del epitelio y la respuesta inmune se produce en etapas tardías de la infección viral.

Existen diferentes situaciones clínicas en la relación del virus con el huésped, moduladas por diferentes factores virales, del huésped, ambientales.



Figura 8. Etapas y evolución de la infección por HPV

1.3.1.1. *Eliminación.* 90%. El 90% en un plazo de 2 años por la acción de la respuesta inmune mediada por células. Pueden resultar inmunes o susceptibles a una nueva infección por el mismo virus. Ausencia de virus en capas basales (Los tests detectan en capas superficiales)

1.3.1.2. *Infección Latente.* Largo periodo de tolerancia inmunológica a la infección HPV. Presencia intracelular de genoma

(episomas) sin manifestación clínica ni subclínica. Existe replicación viral sin muerte celular, no presentación de antígenos, no reacción inflamatoria.

1.3.1.3. *Infección Clínica.*

- Vía de expresión de genes virales con síntesis y liberación de partículas virales en las capas altas del epitelio. Infección productiva: CIN 1 o Condilomas
- Desregulación en la expresión de los genes virales y transformación de las células epiteliales en Neoplasia Intraepitelial de Alto Grado (CIN 2-3) y Cáncer.

1.3.1.4. *Reactivación*, de una infección silente.

1.3.1.5. *Recurrencia*, reinfección por un mismo tipo de HPV

1.3.1.6. *Persistencia.* La detección de un mismo tipo de HPV en dos o más ocasiones, con un intervalo de tiempo determinado entre las exploraciones, asociado a un riesgo de lesiones CIN 2-3 (Koshiol et al., 2008). El sistema inmune no elimina la infección. Puede ser HPV negativo o positivo. Depende del tipo de HPV, susceptibilidad del huésped y respuesta inmune. La persistencia de los HR-HPV es necesaria para el desarrollo, mantenimiento y progresión de las lesiones precancerosas.

1.3.1.7. *Progresión.* Una pequeña proporción de casos los HR-HPV ocasionan una alteración en el control celular, que se evidencian en cambios morfológicos y citológicos denominadas Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado L-SIL (CIN 1 o condiloma acuminado). En un 10% pueden evolucionar a Lesiones

Intraepiteliales de Alto Grado H-SIL (CIN2-3). Un 30% de H-SIL regresan , pero en un 40% bajo el estímulo permanente de E6 y E7 evolucionan a cáncer invasivo.

La detección de las lesiones producidas por el HPV se basa en:

a. Citología.

Los estudios citológicos clasifican las lesiones Intraepiteliales escamosas (SIL) siglas en ingles de Squamous Intraepithelial lesión, en dos grados basándose en las recomendaciones realizadas en las reuniones de Bethesda del 1988,1991 y 2001 (38) (39).

- SIL de bajo grado (LSIL)
- SIL de alto grado (HSIL)

Los estudios histopatológicos siguiendo la clasificación de la organización mundial de la salud del 2003 (40) clasifican las lesiones como Neoplasia Intraepitelial cervical (CIN) en tres grados

- CIN 1
- CIN 2
- CIN 3

b. Colposcopia

La colposcopia se ha convertido en la norma en lo que respecta a la atención al procedimiento diagnostico posterior a una citología vaginal anómala. Cuando los resultados de la citología son anómalos, el criterio es que la paciente se someta a una colposcopia, que es el examen del cuello uterino mediante aumento óptico, después de aplicar ácido acético para resaltar las áreas alteradas.

c. Biopsia

Una vez detectadas las zonas alteradas mediante la colposcopia se procederá a la obtención de tejido exocervical y de endocérnix si la lesión penetra en el endocérnix para establecer el diagnóstico definitivo.

El proceso de carcinogénesis del VPH es lento, con etapas bien definidas y este hecho ha sido la base del éxito de los programas de detección precoz. La lesión escamosas de bajo grado es consecuencia de la infección aguda por VPH. Un 25% de las mujeres infectadas por VPH presentan LSIL. En ausencia de tratamiento, esta lesión en pacientes jóvenes evoluciona a la curación espontánea a los 12 meses, en un 61 % y en 91 % a los 36 meses (41). La probabilidad de remisión es menor en edades más avanzadas (42).

Ostor (1993) (43), realiza una revisión de la infección por HPV donde se muestra que las lesiones CIN I, remiten en el 60% , persisten en el 30 % progresan a CIN 3 en el 10 % y a la invasión 1%.

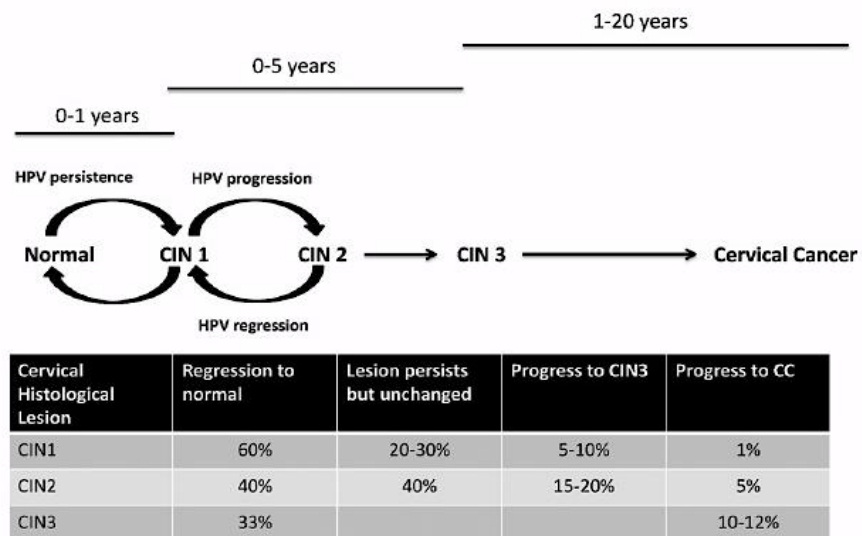


Figura 9. Evolución lesiones por HPV (44)

La persistencia en el tiempo de la infección por VPH es un factor de riesgo demostrado y necesario para la transformación celular (45).

La duración media de la infección por VPH es variable y según los distintos estudios puede oscilar, desde 6-12 meses (46) (47) y 24 meses (48) (49). Por lo general los virus de alto riesgo persisten más que los de bajo riesgo (50).

La persistencia viral se define, como detección del virus en dos o más determinaciones, realizadas en un periodo de tiempo, que oscila entre uno y dos años. Estudios epidemiológicos y moleculares han evidenciado que la persistencia de la infección por HR-HPV es imprescindible para el desarrollo de las lesiones intraepiteliales de alto grado, con fenotipo neoplásico (HSIL citológico y CIN 2 CIN 3 histológico y cáncer invasivo (51). La persistencia de infección cervical por un VPH oncogénico durante un año, multiplica por 3 el riesgo relativo de desarrollar una lesión de alto grado.

### **1.3.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS HPV (25)**

- Inmortalización. A través de la acción E6 y E7 viral
- Abolir la respuesta al daño celular, con lo que se acumula alteraciones genéticas en las células infectadas
- Inestabilidad genómica, a través de E6 y E7. Monosomías, trisomías, rotura de cromátides, pérdida de la heterocigosidad,.... Cambios frecuentes en los cromosomas 1, 3, 5, 6, 11, 17 y 18.
- Alteración en la proliferación y diferenciación celular, sobre todo por la acción de E7

- Inhibición de la apoptosis, no eliminándose las células dañadas e infectadas. Intervienen oncoproteínas E2, E6 y E7.
- Alteraciones de proto-oncogenes específicos: RAS, MYC, ERB, Metilación de genes promotores,....

En condiciones normales, las aberraciones genéticas que sufre una célula epitelial, reparadas por la mediación de dos proteínas (p53 y RB), que regulan negativamente el ciclo e inducen apoptosis. Dos regiones del genoma del VPH de alto riesgo, E6 y E7, producen sendas proteínas degradantes del mismo nombre, capaces de bloquear a la P53 y RB.

La oncoproteína E7 al degradar a RB (proteína supresora de tumores del retinoblastoma) libera el factor de insquiciación E2F, con lo que se bloquea la represión del ciclo celular, G1/S y se inicia un ciclo aberrante. La oncoproteína E6 degrada la p53, perpetuando la inmortalización celular, además para evitar la erosión de los telómeros resultantes de la división descontrolada, activa la hTERT (transcriptasa en reverso de la telomerasa humana) (52).

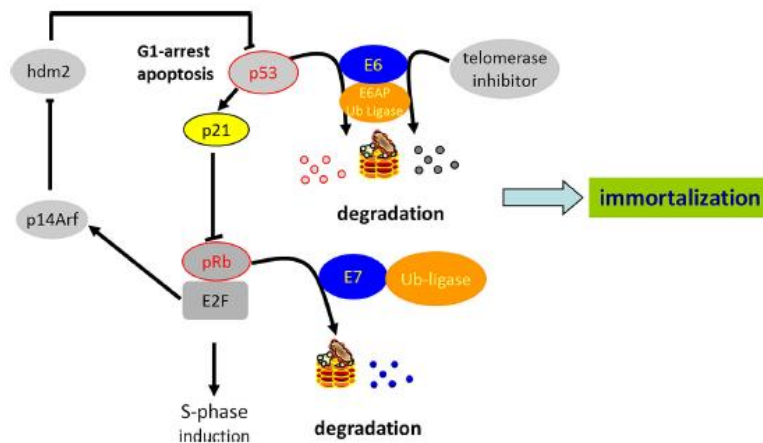


Figura 10. Interferencia oncoproteínas E6 y E7 con el ciclo celular (53)

Por este mecanismo de “transregulación” el HR-VPH, es responsable de la disminución de la vigilancia y capacidad reparativa de la célula, pudiéndose iniciar así un proceso neoplásico (54).

La transformación tumoral requiere la evasión de la respuesta inmune, lo que conduce a la persistencia de la infección. La incapacidad de la respuesta inmune para resolver la infección en un plazo de tiempo corto o medio, generalmente menor de 2 años, aumenta las posibilidades de que exista un daño celular continuado y como consecuencia un proceso susceptible a la neoplasia.

La infección viral es causa necesaria, pero no suficiente, del cáncer de cuello uterino. La infección por VPH, es frecuente en la población, la mayoría la aclaran y no progresan a cáncer de cérvix: Por tanto es necesario que intervengan, co-factores en el proceso de carcinogénesis cervical, que modulan el riesgo de progresión de la infección por VPH a cáncer (55).

### **1.3.3. CO-FACTORES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENESIS DEL VPH**

El VPH induce proliferación celular y los tipos oncogénicos pueden producir cáncer. Las células infectadas disminuyen su capacidad para reparar mutaciones y acumulan pequeñas anomalías a medida que se multiplican.

Tienen dificultad para responder a estímulos reguladores y diferenciadores (como ácido retinoico y calcio) y son susceptibles a factores externos. Una serie de cofactores actúan facilitando la infección, favoreciendo su persistencia y promoviendo la progresión de las lesiones



intraepiteliales, dificultando la regresión o favoreciendo el paso a cáncer invasor. Epidemiológicamente se observa que en general, incrementan hasta tres veces el riesgo cuando se asocian a VPH.

La interpretación sobre co-factores asociados a la persistencia ha sido dificultosa, dado el carácter predominantemente transitorio de la infección, está claro que otros factores también intervienen. Sin embargo no está claro que fase(s) del proceso carcinogénico intervienen más estos factores.

Dado el carácter ubicuo del VPH la fase más crítica de la carcinogénesis cervical no es la adquisición de la infección, sino la fase que implica la progresión a lesiones clínicamente importantes. Clínicamente no se ha realizado ningún estudio que intente separar los factores de riesgo de persistencia viral de aquellos asociados a la progresión neoplásica. Los dos fenómenos no son idénticos, pero hasta el momento, han estado tan estrechamente asociados, pero solo recientemente los epidemiólogos, están empezando a diferenciarlos. Se cree que la persistencia a largo plazo con progresión es poco común, ante la falta de conocimientos exactos como delimitar la infección por el VPH, persiste o persistente de larga duración, aun puede ser de utilidad evaluar los factores de riesgo asociados a la progresión de una infección persistente (MOSCICKI). (56)

La progresión de la infección de VPH a CIN III también incluye una fase de persistencia del VPH. Existe una superposición entre los factores de riesgo identificados para la persistencia del VPH y los factores de riesgo asociados a la progresión de positividad para VPH (transitoria más persistente) a CIN III. Estos incluyen en primer lugar, las características de la propia infección (tipo de VPH, Infección

única/múltiple o carga viral). Se han identificado factores del huésped y factores conductuales que desempeñan un papel en la persistencia del VPH y en el riesgo de progresión a lesiones precancerosas. Se ha evaluado el riesgo de CIN III o cáncer de cuello uterino en mujeres VPH positivas y se ha identificado al tabaquismo como co-factor y así lo han confirmado estudios prospectivos recientes (57) (58).

#### 1.3.3.2. COFACTORES MEDIOAMBIENTALES O EXOGENOS.

- a. *Habito tabáquico.* En mujeres infectadas por el VPH, es el cofactor mas importante de progresión, con un aumento del riesgo de 2-4 veces frente las no fumadoras (59). El tabaco tiene un efecto carcinogénico directo y produce alteraciones de la inmunidad local en el cuello uterino, contribuyendo a cronificar la infección. El tabaquismo parece ser un co-factor importante, pero no esta del todo claro en que fase de la carcinogénesis cervical interviene.
  
- b. *Anticonceptivos hormonales.* El consumo de contraceptivos hormonales durante 5 o más años, actúa como cofactor para padecer cáncer cervical, pues aumenta la expresión del E6 y E7 del VPH. Los estrógenos favorecen la proliferación de las lesiones ya establecidas y los gestágenos pueden estimular la expresión viral. Los estrógenos y los gestágenos de los contraceptivos inhiben la apoptosis a nivel cervical y modifican la respuesta inmunitaria local lo que facilitaría la carcinogénesis, sobre todo si el consumo es superior a 10 años. El riesgo disminuye 8 años después de haberlos suspendido (60) (61). A pesar de ello, los hallazgos asociados al uso de anticonceptivos orales como co-factor del desarrollo de

lesiones cervicales de alto grado en mujeres VPH positiva son más ambiguos (59). Ninguno de los estudios prospectivos llevados a cabo hasta la fecha han identificado una asociación entre el uso de anticonceptivos y CIN 3 en mujeres VPH positivas (62) (63)

c. *Utilización del preservativo.* Los primeros estudios no identificaron ningún efecto del uso de preservativo en la persistencia del VPH, pero los resultados de un reciente estudio de seguimiento han puesto de manifiesto una asociación entre la duración prolongada la infección del VPH y el uso infrecuente de preservativo durante una infección por VPH (64). Así mismo, otros dos estudios han reportado asociaciones entre el uso de preservativos y una menor persistencia de tipos de VPH de alto (65) y bajo riesgo (66). Otros estudios de cohorte han concluido que el uso de preservativo disminuye el riesgo de lesiones de alto grado en mujeres VPH positivas (67) (68). También se ha demostrado que el uso de preservativo aumenta la regresión de VPH y del CIN en mujeres infectadas por VPH (69).

d. *Número de partos.* Estudios casos control relacionan la alta paridad con CIN 3 y carcinoma de cérvix. Las modificaciones hormonales del embarazo y las modificaciones cervicales ocasionadas podrían explicar esta asociación (70) (71).

e. *Otras infecciones de transmisión sexual.* Las infecciones de transmisión sexual, Clamydias, herpes, VIH, actúan como cofactores del desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y cáncer del cuello uterino.

La infección por la *Clamydia trachomatis* parece ser un cofactor en el desarrollo de lesiones preneoplásicas y cáncer de cuello uterino, cuyo mecanismo de acción sería por la inducción de inflamación crónica y metabolitos mutagénicos (72) (73).

Se ha demostrado la asociación de la seropositividad del virus herpes simple tipo 2, con un riesgo aumentado de cáncer de cuello uterino (74).

Las pacientes con VIH positivas tienen mayor riesgo de infección por VPH y de padecer cáncer cervical.

La Vaginosis Bacteriana (VB) modifica el pH, promueve la metaplasia escamosa de la ZT y la producción de nitrosaminas y ocasionando desbalance microbiano. (75)

- f. *Factores Nutricionales*. Aunque la evidencia es muy limitada para llegar a conclusiones, se considera que el consumo de alimentos antioxidantes como frutas y vegetales se relacionan con la disminución del riesgo de padecer cáncer de cuello de útero. La asociación es casi consistente, sobre todo con la ingestión de vitamina C, E, A y carotenos. La ingestión en la dieta de folatos, Vitamina B6 y B12, pueden estar también implicados en la carcinogénesis cervical. No obstante no existen conclusiones definitivas que relacionen dieta VPH y riesgo de cáncer de cuello de útero (76).

#### 1.3.3.3. COFACTORES VIRALES.

Dentro de los factores asociados al VPH tenemos:

- a. *Genotipo Viral*. Es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preinvasiva, siendo los genotipos 16 y 18 los que presentan mayor riesgo de

progresión (77). Los genotipos 16, 18 y 45 tienen una integración más efectiva en el genoma humano que otros genotipos, por lo que pueden desarrollar de forma más rápida lesiones de alto grado (78).

- b. *Variante del VPH.* El reconocimiento de mínimas variaciones en la secuencia de bases del ADN del VPH ha permitido identificar los genotipos.

Las variantes del VPH 16 muestran diferencias geográficas que se han relacionado con distintos riesgos de cáncer y los tipos no europeos están asociados con mayor riesgo (79). Se sugiere que las variantes pueden influir en la historia natural de la infección por dos mecanismos: diferencias en su capacidad funcional o evasión del sistema inmunitario del huésped. Dadas las diferencias geográficas es posible que su papel en la persistencia y progresión esté relacionado con polimorfismos inmunogenéticos (80).

- c. *Carga Viral.*

La carga viral es un marcador de infección persistente. Se ha sugerido que una carga viral elevada indica una mayor posibilidad de integración del ADN viral en el genoma del huésped. Sin embargo, es discutible la utilidad de medir la carga viral para pronosticar la progresión a cáncer. En mujeres con infección VPH 16 o 18 y citología normal, una carga viral elevada, determinada por PCR en tiempo real, se asocia con mayor riesgo de progresión a CIN y cáncer (81, 82). La carga viral medida mediante HC2 muestra un incremento progresivo paralelo a la gravedad de la lesión. (83). La presencia de cifras superiores a 100 URL se asocia con una lesión cervical en más

del 90% de los casos y esta asociación es prácticamente constante para cifras superiores a 1000 URL. Por el contrario un elevado porcentaje de estos casos con determinaciones inferiores a 10 URL no presentan lesión cervical. Sin embargo la presencia de una baja carga viral no debe ser excluyente de una lesión grave (83).

d. *Integración Viral.*

El riesgo de que se produzca integración aumenta con una elevada carga viral. Sin embargo algunos autores, apoyan la idea de que el VPH 16 es capaz de inducir la transformación maligna sin que haya integración, lo que indica que seguramente intervienen otros factores para que ocurra la transformación (84).

e. *Coinfección.*

Es discutible si la coinfección con varios tipos virales aumentaría el riesgo de progresión. Se ha comunicado la evidencia de que la tasa de aclaramiento es independiente de la coinfección con otros tipos virales, al menos en mujeres inmunocompetentes (85). La evidencia más reciente apunta a que los genotipos que infectan el cérvix actúan de forma independiente en el desarrollo de las lesiones cervicales y que la vacunación frente a los tipos 16 y 18 no originará un cambio del potencial oncogénico de los VPH no incluidos en la vacuna.

Son diversos los factores asociados a un mayor riesgo de adquirir una infección múltiple por VPH:

- Las *mujeres jóvenes* menores de 30 años tienen mayor riesgo de infección por varios tipos virales.

- El *comportamiento sexual*, es otro factor importante, la edad de inicio de las relaciones sexuales, el número de parejas sexuales y el comportamiento sexual de la pareja están asociados a un mayor riesgo de infección múltiple.
- El *estado inmunológico* de la paciente también es relevante, pues el riesgo de coinfección por varios tipos virales es mayor en paciente VIH.
- El *hábito tabáquico* se considera otro factor influyente ya comentado. La IARC ha clasificado el hábito tabáquico como causa de cáncer de cérvix (86) (87). En los resultados de la ICESCC después de ajustar por potenciales factores de confusión, las mujeres fumadoras presentaban un aumento significativo de riesgo de cáncer de cérvix en comparación con las mujeres que nunca había fumado RR=1,60; IC 95 % 1,48-1,73 (88). El riesgo fue menor para las ex fumadoras RR=1,12 IC 95%, 1,01-1,25. No se observó ninguna tendencia en las estimaciones del riesgo respecto al tiempo transcurrido desde el cese del hábito tabáquico (tendencia  $p=0,6$ ). En las fumadoras actuales el riesgo aumentaba en función del número de cigarrillos fumados al día, para más de 15 cigarrillos día, pero no en función del hábito tabáquico. Los patrones de riesgo fueron similares cuando el análisis se limitó a mujeres positivas para ADN del VPH. Los posibles mecanismos que explican el efecto del hábito tabáquico incluyen una reducción de la respuesta inmunitaria del cuello uterino, efectos relacionados con el metabolismo de las hormonas femeninas y daños

genéticos directos producidos por carcinógenos relacionados con el tabaco.

f. *Metilación de genes virales*

Junto con la metilación de los oncogenes, modifican la gravedad de la lesión y la persistencia o eliminación. (89)

1.3.3.4. COFACTORES DEL HUESPED

a. *Inmunosupresión.*

La respuesta inmune, esta considerado como un potente mecanismo de resistencia frente el desarrollo de carcinomas, desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de los mismos. La regresión de las lesiones inducidas por VPH están acompañas de una reacción característica de hipersensibilidad retardada dependiendo de linfocitos T auxiliares, TH de acuerdo con lo publicado por la Agencia internacional para investigaciones sobre el cáncer 1997. Las mujeres con inmunosupresión secundaria por VIH o trasplantadas con tratamiento inmunosupresor, tienen mayor riesgo de desarrollar canceres ano-genitales asociados (90). En estas pacientes se ha comprobado a nivel cervical la disminución de linfocitos CD 4 y la inversión CD4/CD8, así como la disminución de linfocitos natural Killer. Dicha alteración de la inmunidad facilitaría la integración de ADN viral del VPH (91).

b. *Hormonas Endógenas*

c. *Factores Genéticos*

- Polimorfismos genéticos de la respuesta inmune
  - o Citokinas



- KIR y HLA ligands
- Sistema HLA
- Fenómenos Epigenéticos (silenciación genética vía metilación) (Vaccine 30S)
- Polimorfismos genéticos de reparación de daño celular (92)

## **1.4. EPIDEMIOLOGIA**

### **1.4.1. IMPACTO NUMÉRICO DE LA INFECCIÓN POR VPH.**

Es difícil establecer estimaciones en torno al volumen de mujeres portadoras de infecciones ocultas por VPH y el espectro de lesiones asociadas.

Mediante técnicas de hibridación molecular de alta sensibilidad (PCR), específica de tipo puede considerarse que la prevalencia de ADN de VPH en la población femenina es inferior al 10 % en los países desarrollados y ligeramente superior al 15 % en los países desarrollados (93, 94).

### **1.4.2. EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE CÉRVIX.**

El cáncer de cérvix representa uno de los problemas más importantes de salud del mundo, ya que es la segunda causa de muerte por tumor maligno en la mujer, detrás del de mama. 527.000 nuevos casos en 2012, de los que el 85% se produjeron en países subdesarrollados, donde representan el 12% de los cánceres femeninos (95).

Factores de recurrencia de las lesiones de alto grado de cuello uterino tras extirpación con márgenes libres

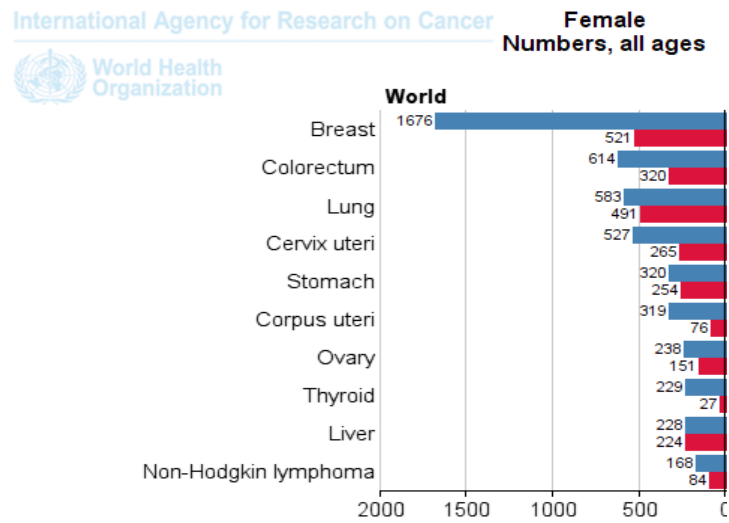


Figura 11. *Incidencia de cáncer.* Globocan 2012. IARC

La prevalencia de cáncer de cuello de útero es muy variable de unas regiones a otras y está íntimamente relacionado con el nivel socio-económico de la población. Aproximadamente el 85% de ellos se producen en países en vías del de desarrollo, principalmente en Asia, África y Sudamérica, donde el cáncer cervical representa el 15% del total de los canceres femeninos. Sin embargo en los países industrializados el cáncer de cuello de útero supone alrededor del 3,6% de los nuevos casos de cáncer (96, 97).

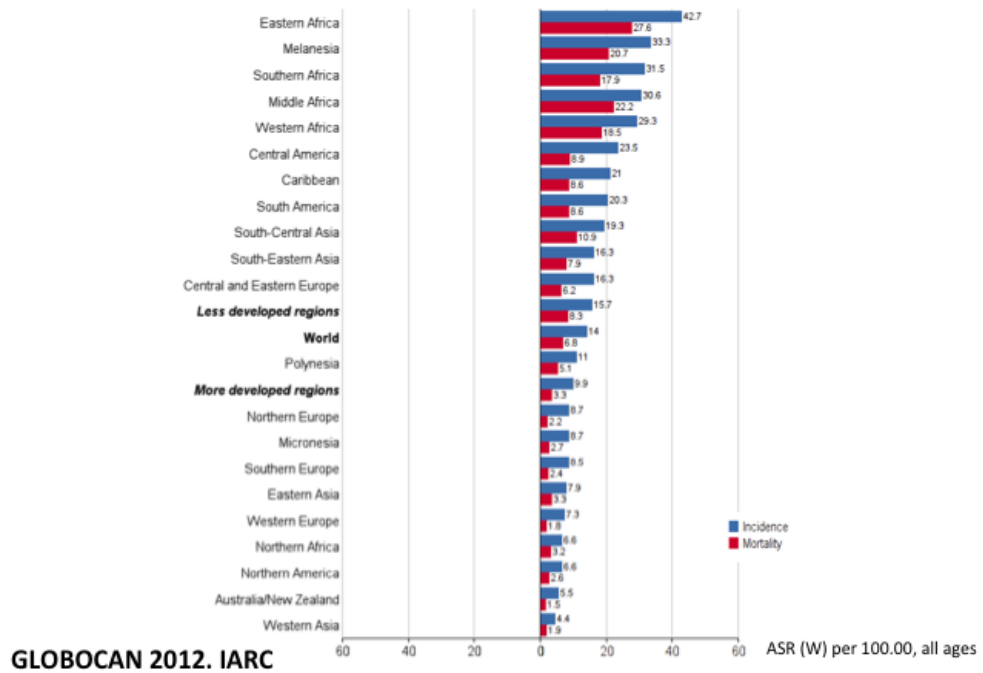


Figura 12. *Incidencia y Mortalidad Mundial por cáncer de cérvix.*  
GLOBOCAN 2012. IARC. Por 100.000 habitantes en cualquier edad

En Europa se observan tasas muy elevadas en los países del este de Europa y tasas bajas en los países del sur de Europa, así como en algunos nórdicos. España está incluida dentro de las poblaciones de riesgo moderado bajo de cáncer de cuello uterino. La incidencia de cáncer de cuello uterino en España es de 7,6 casos por 100.000 mujeres /año, se estima que en España se diagnostican aproximadamente unos 2103 casos de cuello uterino por año (98). Representa el séptimo tumor maligno más frecuente a nivel global y el segundo cáncer más frecuente en mujeres entre 15 y 44 años. No obstante existen notables diferencias de unas regiones a otras.

Con respecto a la mortalidad el cáncer de cuello uterino es la causa de 227.899 casos de muerte a nivel mundial de las cuales el 88% ocurren en países en vías de desarrollo (99, 100). En Europa el cáncer de cérvix es

la séptima causa de mortalidad por cáncer pero en la mujer joven de 18-45 años es la segunda (101). Existen diferencias geográficas en Europa sobre la supervivencia a los 5 años, siendo del 63% (102) y en Zimbabwe del 30,5% (103). Se calcula que en España mueren aproximadamente 2 mujeres día por cáncer cérvico uterino (104).

### **1.4.3. EPIDEMIOLOGIA DE LAS NEOPLASIAS CERVICALES INTRAEPITELIALES.**

El pico de mayor incidencia del CIN ocurre entre los 25-29 años. El impacto sobre la fertilidad de los métodos para tratar la displasia es pequeño pero significativo, incluso siendo estos poco agresivos (105) (106).

#### **1.4.3.1. CIN I.**

La displasia leve en contadas ocasiones progresa a moderada-severa, durante los dos años que siguen al diagnóstico y presentan una elevada tasa de regresión espontánea. En la mayoría de los casos la observación sin tratamiento es la opción aconsejada.

El riesgo de progresión es del 13%, similar al de mujeres con Colposcopia y biopsia negativa en el estudio ALTS (107). Existe sin embargo una baja reproductibilidad entre patólogos cuando diagnostican displasia leve una pieza de biopsia.

El problema de no tratar una CIN es discernir si una displasia moderada-severa diagnosticada en su seguimiento es una progresión de una CIN o estaba oculta desde el inicio. Se han propuesto unos criterios para orientar la conducta terapéutica en LSIL-CIN I, considerando tratar la lesión en los siguientes

supuestos: si es extensa, central, penetrando en el endocérnix, si hay discordancias, edad superior a los 35 años o persistencia durante más de dos años, de todas formas el manejo se puede establecer de la siguiente manera:

- Adolescentes. La prevalencia de la infección por HPV llega al 54 % al inicio de las relaciones sexuales (108), con una resolución espontánea en 2 años del 90 %, como el cribado debe de iniciarse a los 3 años de la primera relación sexual, en jóvenes con CIN I, se hará citología a los 12 y 24 meses, si tienen citología H SIL, a los 12 meses o ASCUS a los 24 meses y se practicara una Colposcopia. La ASCCP no recomienda realizar test de VPH por la elevada prevalencia.
- Gestantes citología y Colposcopia sin tratamiento.
- CIN I precedida de ASCUS, ASC-H o L-SIL citología y Colposcopia cada 6 meses y/o test VPH-AR cada 12 meses.
- CIN I precedida de H-SIL o AGC. La discordancia entre citología y biopsia es un criterio de riesgo que hace aconsejable el tratamiento, aunque últimamente se puede realizar citología y Colposcopia a los 6 meses

#### 1.4.3.2. CIN II-CIN III.

Estas lesiones tienen más riesgo de progresar o persistir que de regresar, pues la mayoría son proliferaciones monoclonales con inestabilidad genética. Sin tratamiento las tasas de regresión, persistencia o progresión son del 43%, 35% y 22% para CIN II y de 32%, 56 % y 14% para CIN III.

Los métodos escisinales reducen la incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix y para ser efectivos deben abarcar

completamente la ZT. Mas del 70% de mujeres con Colposcopia insatisfactoria y CIN II-III tienen un carcinoma oculto en la pieza de conización (109) (110).

La histerectomía no es aceptable como tratamiento de entrada en una CIN II-III. Si la colposcopia es satisfactoria y la paciente es muy joven, puede optarse por métodos ablativos. En los casos de colposcopia no adecuada o displasia de alto grado recurrente el método será escisional.

El adenocarcinoma in situ a menudo es multifocal y penetrante en el canal endocervical. No es garantía de curación el que los márgenes de la resección no estén afectados, por lo que la histerectomía pudiera ser el tratamiento de elección (111).

## 1.5. SINTOMATOLOGIA

En estadios iniciales el cáncer de cérvix es asintomático al igual que el CIN que no da síntomas. Una docena de VPH, incluyendo 16, 18, 31 y 45, son conocidos como de alto riesgo oncogénico, dado que pueden progresar a carcinoma cérvico uterino, cáncer anal, vulvar, vaginal y de pene (112). Algunos tipos particularmente el 16, se puede asociar a cáncer orofaríngeo, englobando los cánceres de cabeza y cuello (113) el cual es independiente del consumo de tabaco y alcohol.

La mayoría de las infecciones por VPH son eliminadas por el sistema inmune rápidamente y no progresan. Pero las infecciones persistentes si pueden terminar en cáncer cérvico uterino en un periodo de aproximadamente de una década aunque depende de múltiples factores (114).

La transmisión sexual del VPH causa la mayor parte de los cánceres anales y un 25% de la patología maligna de la boca y orofaringe, que comúnmente se desarrolla en la zona de la amígdala, esto ha provocado un aumento de los cánceres orales en los no fumadores (115).

También se conoce la conexión del VPH con el cáncer anal, este es de 17-31 veces más frecuente en hombres homosexuales o bisexuales que heterosexuales. Incluso se ha propuesto un screening del cáncer anal mediante técnica de citología en poblaciones de alto riesgo no obstante no existe acuerdo sobre la conveniencia de este cribado (116).

### 1.5.1. VERRUGAS CUTÁNEAS

Algunas infecciones por VPH pueden producir verrugas, que son lesiones cutáneas proliferativas no cancerosas. La infección produce el rápido crecimiento de las células superficiales de la piel clasificándose de la siguiente forma:

- *Verrugas comunes*: Son frecuentes en las manos y en los pies, pudiendo presentarse en otras áreas como codos y rodillas. Las verrugas comunes tienen una superficie característica similar a una "coliflor". Los VPH cutáneos también pueden producir verrugas genitales que no están asociadas con el cáncer cervicouterino.
- *Verrugas plantares*: Se pueden encontrar en las plantas de los pies creciendo hacia dentro, causando dolor al andar.
- *Verrugas subungueales*: Que son de más difícil tratamiento que las de otras localizaciones.

- *Verrugas planas*: Se encuentran habitualmente en los brazos cara o frente. Se presentan habitualmente en niños y adolescentes, en personas con buen funcionamiento del sistema inmune y no se asocian al cáncer.

### 1.5.2. VERRUGAS GENITALES

Las verrugas anales o genitales, conocidas con condromas acuminados, es el signo mas reconocido de la infección por HPV. A pesar de la gran variedad de tipos suelen causarlos el 6 y el 11, siendo los responsables de más del 90 % de los casos. (117) (118)

Los tipos de virus 6 y 11 fueron clonados por primera vez a partir de verrugas genitales, también conocidas como verrugas ano-genitales o condilomas y papilomas laríngeos en los años 1981 y 1982 (21).

El uso de expresiones VPH de riesgo oncogénico bajo y alto o VPH debajo riesgo y alto riesgo empezó a extenderse a finales de los años 80.

La condilomatosis asociada al VPH 6 y 11 tiene manifestaciones clínicas e histológicas idénticas (119). Estudios recientes han demostrado que cerca del 100% de las verrugas genitales están causadas por el VPH 6 o el 11, pero que el 20-50% de estas lesiones también muestran co-infecciones por tipos de alto riesgo (119) (120). Las verrugas no suelen tener una morbilidad importante o mortalidad, pero si ocasionan una morbilidad psicológica significativa y conllevan elevados costes para el sistema sanitario. Ocasionalmente las verrugas persisten durante periodos prolongados y en raras ocasiones pueden malignizarse. Las verrugas genitales son altamente infecciosas con una tasa de transmisión de cerca del 65 %, desde una pareja sexual infectada a una pareja sexual susceptible



y con periodo de incubación de entre tres semanas y 8 meses, dando lugar a la aparición de verrugas en los individuos infectados en 2-3 meses (120). Una vez desarrolladas las verrugas puede mostrar cambios mínimos a lo largo del tiempo aumentar o volverse más numerosas o bien resolver espontáneamente. La mayoría de los ensayos de tratamiento de verrugas controladas con placebo muestran tasas de regresión basas el 5% a corto plazo aunque en periodo de seguimiento de 16 semanas el 20% de las mujeres y el 5 % de los hombres que utilizaron placebo mostraron una remisión de más del 50% de las verrugas detectadas al inicio del estudio. Las verrugas en regresión contienen significativamente más células T CD4+ tanto en el estroma bajo las lesiones como en la propia condilomatosis y una mayor expresión de marcadores de activación. No existen datos sobre las posibles tasas de regresión espontánea que puedan darse en un periodo de seguimiento mayor.

Las opciones actuales del manejo viene determinadas porque generalmente las verrugas genitales son percibidas como antiestéticas o desfigurantes por la persona infectada y han mostrado estar asociadas a altas tasas de morbilidad psicológica y sentimientos de vergüenza (121). En este sentido muchas personas afectadas por verrugas desean ser tratadas para eliminar las lesiones. (122). Sin embargo el tratamiento no es sencillo. Se dispone de un amplio sistema de terapias pero estas no han sido siempre utilizadas de forma lógica y eficiente, observándose respuestas inadecuadas al tratamiento y recurrencias después de una aparente remisión (122). Este hecho supone un problema no solo para la persona infectada sino también para los servicios sanitarios, ya que se destinan grandes cantidades de tiempo al manejo de estos casos. Los tratamientos de los que se dispone en la actualidad contra las verrugas pueden clasificarse bajo distintas categorías en función de su mecanismo de acción. Como tratamientos más frecuente, se han utilizado (122): los

agentes antiproliferantes, las terapias destructivas o de escisión y la utilización de inmunomoduladores y vacunas terapéuticas.

La mayoría de las pacientes que adquieren la enfermedad la eliminan con rapidez, no llegando a presentar verrugas u otros síntomas, nuevamente pero si pueden transmitir la enfermedad a otros aunque aparentemente estén asintomáticos.

Los de VPH que producen las verrugas genitales, no tienen relación con el cáncer cérvico-uterino, pero este no excluye la presencia de los tipos de alto riesgo, en el mismo paciente pudiendo desarrollar la enfermedad.

Además los tipos de VPH que producen verrugas genitales no son los mismos que producen verrugas en otras localizaciones del cuerpo como manos o muslos.

### **1.5.3. PAPILOMA RESPIRATORIO**

Los tipos 6 y 11 pueden producir una condición clínica denominada papilomatosis respiratoria recurrente en la que se forman verrugas en la laringe y otras localizaciones del árbol bronquial (123).

Estas verrugas pueden recurrir con frecuencia, requerir cirugías repetidas e interferir con la respiración y en casos excepcionales progresar a cáncer (124).

La papilomatosis respiratoria recurrente también denominada laríngea es poco frecuente y se caracteriza por el crecimiento recurrente de los papilomas benignos en las vías respiratorias. Pueden aparecer en

cualquier parte de las vías respiratorias pero es más frecuente en la laringe. La enfermedad puede aparecer en la infancia apareciendo en la gran mayoría de los casos durante los cuatro primeros años de vida (125) o en la edad adulta y con un pequeño pico de incidencia entre los 21 y 30 años. Los síntomas de presentación más comunes son la ronquera y la obstrucción respiratoria. Aunque los papilomas son benignos su carácter recurrente y su localización en las vías aéreas obligan a realizar extirpaciones quirúrgicas frecuentes para mantener libres la vías aéreas.

El riesgo de diseminación de la enfermedad a las vías respiratorias bajas parece aumentar en pacientes traqueotomizados. La enfermedad raramente es mortal pero es difícil de llevar y acarrea una tremenda carga para los pacientes y sus familiares. (126)

#### **1.5.4. VPH EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS**

En casos excepcionales el VPH puede ocasionar epidermodisplasia verrocoforme, en pacientes inmunocomprometidos. El virus produce sobreproducción de queratina en las células epiteliales produciéndose en las pacientes lesiones cutáneas generalizadas en forma de verrugas o cuernos cutáneos. (127, 128)

### **1.6. TRANSMISIÓN HPV**

#### **1.6.1. VERTICAL**

En muy raras ocasiones se produce una trasmisión vertical, del VPH de madre a hijo en el paso por el canal del parto. La trasmisión perinatal de los tipos 6 y 11 pueden resultar en el desarrollo de la papilomatosis respiratoria recurrente juvenil.

Aunque excepcionalmente en EEUU se describen 2 casos por cada 100.000 niños (129) este riesgo es sustancialmente mayor en mujeres que presentan verrugas genitales en el momento del parto, siendo el riesgo de contagio menor del 1%.

### **1.6.2. CONTACTO SEXUAL**

Es la vía de contagio más estudiada por el riesgo de progresión a cáncer cérvico uterino. Al menos se han identificado 40 tipos de VPH que pueden infectar la zona genital. Se considera la enfermedad de transmisión sexual más frecuente. Se produce fundamentalmente por las relaciones heterosexuales con penetración, siendo el número de parejas el principal factor de infección

Los determinantes de la prevalencia:

- Edad del inicio de las relaciones
- Frecuencia de relaciones
- Pareja reciente
- Número de parejas sexuales
- Comportamiento sexual del varón

Si la mujer presenta una pareja sexual por año, durante cuatro años la probabilidad de contagiarse con el VPH es mayor del 85 %. Los preservativos no protegen al 100% del contagio, ya que ha exposición de la zona perineal con la piel de la pareja. La circuncisión disminuye el riesgo de contagio. Es más frecuente la transmisión mujer a hombre (3:1)

### **1.6.3. TRANSMISIÓN HORIZONTAL. Vectores:**

El intercambio de productos contaminados con el VPH puede ser otra fuente de contagio mucho menos significativa. La transmisión de

virus bajo riesgo (LR-HPV) a la vulva o vagina, a través de dedos, tampones o relaciones sin penetración. Aunque es posible, la transmisión por otras vías diferentes del contacto sexual es mucho más infrecuente (130).

### **1.7. ACTUACIÓN FRENTE A LAS LESIONES CERVICALES.**

En la infección cervical por VPH no ocurre como en la vulva, donde las lesiones son clínicamente manifiestas. Esta afección subclínica solo puede detectarse mediante citología, identificación molecular del ADN viral Colposcopia y biopsia.

La citología como método de cribado ha logrado disminuir la incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix (131), si bien con las limitaciones que supone la interpretación subjetiva, la insuficiente cobertura de la población (132) y su baja sensibilidad, aunque esta queda suplida en parte por la REPETICIÓN de la prueba.

Actualmente se utiliza la citología en medio líquido en detrimento de la extensión en porta del frotis cérvico vaginal.

Se ha conseguido una mayor sensibilidad diagnóstica en las SIL sin aumentar la proporción de ASCUS, con la posibilidad de detectar el VPH (Captura de híbridos). En un estudio aleatorizado se concluye que las pruebas que detectan reflejos de ADN del VPH tienen mayor sensibilidad y menor especificidad de la citología para detectar la displasia. Además con la citología en medio líquido se aumentó la sensibilidad muy levemente, pero también aumentaron los falsos negativos. (133)

Aunque hay una alta correlación entre citología e histología, una citología única puede no detectar la mitad de las displasias severas o invasivas confirmadas histológicamente. Un estudio aleatorizado y dos metaanálisis muestran una baja sensibilidad (30%) y elevada especificidad (90%) de la citología para la detección de las lesiones escamosas de cérvix, limitaciones más acusadas para las displasias de origen glandular, donde el cribado citológico ha sido incapaz de disminuir las tasas de incidencia y mortalidad por adenocarcinoma.

Los VPH de alto riesgo oncogénico, están presentes en el 90% de los cánceres de cérvix y en la mayoría de las lesiones CIN II/CIN III. El test conjunto confiere una mayor capacidad diagnóstica con una sensibilidad para CIN II o CIN III del 95 % y un valor predictivo positivo del 27%. (134)

La probabilidad de no tener enfermedad cuando el test es negativo para el test VPH se acerca al 99 %, por lo que disminuye el riesgo de contraer cáncer cervical en los próximos 5-8 años. Las mujeres con negatividad en la citología y en el test de VPH tienen un riesgo inferior a 1 entre mil de tener un CIN II o CIN III no detectado.

En 2005 la IARC (Internacional Agency for Research of Cancer) confirma la utilidad del test VPH en la reducción en la incidencia y mortalidad del cáncer cervical al tratarse de un método fiable y reproducible con una sensibilidad al VPH superior a la citología.

Si la citología y el test de VPH son negativos, es factible demorar el intervalo de cribado hasta 5 años ya que la incidencia acumulada del CIN III o carcinoma es del 0,16% a los 45 meses y del 0,33% a los 10 años.

En 2006 se establece un documento de consenso para el cribado primario del cáncer de cérvix, respaldado por la SEGO, la Sociedad Española de Citología, la Sociedad Española de Patología Cervical y Colposcopia y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (135).

La SEGO edita una actualización del Cribado del Cáncer Cervical en el 2014 y la AEPCC en Noviembre del 2015.

El algoritmo comienza con la primera citología a los 25 años. una Citología cada 3 años entre 25-30 años. Entre 30-65 años co-test, citología mas HPV, con una periodicidad de 5 años. A los 65 años finaliza el cribado. Si la citología es negativa y el VPH es positiva, se realizaría al año. Si la citología es positiva se seguiría el protocolo de la citología anormal. (136)

La positividad del VPH en los países desarrollados para mujeres mayores de 30 años es el 10%, por lo que más del 80% muestran citología y test negativo. Se ha propuesto el test de VPH como cribado primario único a partir de esta edad, reservando la citología para las VPH positivas, o bien realizar directamente el test del VPH teniendo en consideración que los genotipos 16 y 18 provocan respectivamente el 70% de los canceres escamosos y el 80% de los adenocarcinomas de endocérvix. De hecho la infección persistente por VPH 16 representa un riesgo acumulado de CIN II o más a los 10 años del 22 % y la infección por VPH 18 del 17 %. Si se trata de otros de Alto riesgo es del 2% y si no hay virus la tendencia es cero.

Se recomienda la realización de Colposcopia inmediata a las pacientes positivas para VPH 16 y 18, con repetición cada 6 meses, dado

el elevado riesgo de displasia severa. Las mujeres VPH positivas pero negativas para 16 y 18, la colposcopia se haría al año.

La American Society for Cervical Pathology and Colposcopy modifican en 2009 sus guías clínicas, considerando el genotipo del virus cuando la citología es normal. Si se trata del VPH 16 y 18 la Colposcopia sería inmediata y son el resto de virus se realizará citología y test de VPH al año.

El 15% de las pacientes con ASCUS tienen lesiones de CIN II o más. La prevalencia de la infección de VPH entre mujeres con citología normal se sitúa en el 16,2 % (133).

La Junta de Castilla y León en el año 2012 ha establecido un programa de cribado poblacional para detectar las lesiones pre-malignas y malignas de cuello uterino. El programa de cribado comienza a los 25 años y finaliza a 65. La realización de las tomas de citología se realizan en las consultas de atención primaria. Si la citología es positiva, se establece la segunda fase de cribado donde la paciente es derivada a atención especializada para el control y seguimiento hasta que los estudios sean negativos, tanto la citología como de VPH. A partir de este momento volvería al programa de cribado en atención primaria (137).

## **1.8. TRATAMIENTO**

La evolución natural de un CIN es variable y depende en primer lugar del tipo de VPH involucrado. En muchas mujeres se ha realizado múltiples intervenciones con la finalidad de erradicar el virus y la presencia de cualquier lesión cervical, lo que ha dado como resultado un tratamiento costoso con una morbilidad variable.



Los tratamientos son diversos, habitualmente se realizan con anestesia local. En los últimos tiempos se ha producido unos notables cambios en la actitud terapéutica de las lesiones preinvasoras. Mientras que hace unos años se realizaban tratamientos intensivos y muy agresivos, como eran la conización con bisturí, o la amputación cervical e incluso la histerectomía, actualmente se realizan tratamientos conservadores. La Colposcopia desempeña una función básica en el manejo de las lesiones ya que permite objetivar las lesiones y orientar el el tratamiento.

En ocasiones, con el control colposcópico se pueden establecer criterios de control, evaluando la evolución de las lesiones sin llegar a realizar tratamientos destructivos o escisionales sobre el cuello del útero (138).

- TRATAMIENTOS DESTRUCTIVOS O ABLATIVOS
  - Criocoagulación.
  - Electrocoagulación.
  - Termocoagulación
  - Laser de CO2.
  
- TRATAMIENTOS ESCISIONALES. CONIZACIÓN
  - Conización con bisturí frío
  - Conización Laser CO2
  - Asa de diatermia (Lletz).
  
- HISTERECTOMÍA (ocasional),

La elección del tratamiento debe realizarse en base a las características de la lesión: tamaño, localización y grado histopatológico de la lesión.

### **1.8.1. TRATAMIENTO DESTRUCTIVO**

#### **1.8.1.1. CRIOCOAGULACIÓN**

Consiste en la destrucción de los tejidos del cérvix mediante óxido nítrico. La destrucción máxima se obtiene con la técnica de doble congelación (139). El tratamiento mediante criocoagulación es muy utilizado por su sencillez y bajo coste; se utiliza de forma ambulatoria es indoloro y con escasos efectos adversos, realizando una buena reparación del cérvix.

Como inconvenientes está que se destruye el tejido próximo a la lesión, la profundidad de destrucción es aproximada y puede presentar dificultades de destrucción en las lesiones grandes. Los fracasos del tratamiento son más frecuentes en el CIN III y en lesiones extensas, en la actualidad su empleo se utiliza en lesiones de bajo grado y de pequeño tamaño.

#### **1.8.1.2. TERMOCOAGULACIÓN:**

Consiste en la destrucción del tejido mediante calor entre 100 y 120 °C y una profundidad aproximada de 4 mm.

Es un tratamiento que se puede realizar de forma ambulatoria sin anestesia, el mayor inconveniente es que puede

destruir tejido próximo normal y no se puede determinar la profundidad de la destrucción.

#### 1.8.1.3. ELECTROCOAGULACION

Se realiza mediante fulguración y coagulación utilizando un electrodo esférico unido a una unidad de electrocirugía. Precisa anestesia.

En los momentos actuales tanto la termocoagulación como la electrocoagulación se utilizan poco en la actualidad.

#### 1.8.1.4. VAPORIZACION LASER

Supuso un avance importante en el tratamiento de las lesiones del cérvix. La ventaja del tratamiento con Laser es que se realiza bajo control colposcópico. La zona que se destruye bajo visión directa, pudiendo dejar los márgenes de seguridad que se crean convenientes y estableciendo la profundidad adecuada a las características de la lesión, que debe de ser al menos de 7 mm.

El tratamiento con Laser tiene múltiples ventajas entre que las tendríamos que resaltar, que es un tratamiento ambulatorio, se realiza con control colposcópico, mínima alteración de los tejidos perilesionales, buena cicatrización postratamiento, alto índice de eficacia. Hay que tener en cuenta que hay que descartar la extensión al canal endocervical, descartan la presencia de microinvasión, no aporta anatomía patológica. (140)

## 1.8.2. TRATAMIENTOS ESCISIONAL. CONIZACIÓN

Al igual que la histerectomía, la conización extirpa la lesión y permite el estudio histopatológico amplio. La conización tiene la ventaja que conserva el útero.

El tratamiento mediante conización esta *indicada* en:

- Lesión no abarcable colposcopicamente y la extensión endocervical ,(zona de transformación tipo 3). (141)
- Discrepancias entre técnicas diagnosticas
- Sospecha de microinvasión
- Adenocarcinoma in situ de endocérvix
- Recurrencia tras tratamiento destructivo
- Lesión intraepitelial de alto grado

### 1.8.2.1. CONIZACIÓN CON BISTURI FRIO

Durante muchos años el tratamiento del CIN con conservación del cuello fue la conización con bisturí frío. Con el tiempo ha sido desplazada por otras técnicas como es el Laser y/o el asa de diatermia. Tenía la gran ventaja que no existían artefactos térmicos. Pero precisaba anestesia. (142)

### 1.8.2.2. CONIZACIÓN LASER.

Se realiza de forma ambulatoria con anestesia local. Permite el diseño del tamaño de cono dependiendo de las características de

la lesión. La profundidad del cono nunca será inferior a los 7 mm. La problemática derivada de este tratamiento es que se artefactan a veces considerablemente los tejidos que se remiten para estudio histopatológico. Además del coste del equipo y aprendizaje (143)

#### 1.8.2.3. CONIZACIÓN CON ASA DE DIATERMIA (LLETZ-LEEP)

Este tipo de tratamiento se comenzó a utilizar hace 25 años (144), alcanzando gran difusión al incorporar asas de mayor tamaño que permiten la exéresis de toda la zona de transformación. En Europa se conoce como Lletz en EEUU se conoce como Leep. Actualmente es el método mas utilizado.

Como *ventaja*, la conización permite la obtención de material para estudio histopatológico. Puede realizarse de modo ambulatorio con anestesia local.

Presenta algunos *inconveniente* como es el alto porcentaje de escisiones incompletas, que puede llegar al 44% (145) o la excesiva extirpación de tejido con la finalidad de obtener márgenes más amplios. Actualmente se han descrito alteraciones en la fertilidad, acortamiento del cérvix durante el embarazo, así como distocias de dilatación o partos pretérmino. (146)

Las complicaciones más frecuente de la conización serían:

- *Hemorragia.*

La hemorragia es la complicación más frecuente en el postoperatorio, tanto inmediato como tardío, solamente en un

1% de los casos requiere ingreso y hospitalización y la realización de sutura hemostática.

- *Infección.*

Es muy rara y prácticamente inexistente. Por lo tanto la utilización de antibióticos previa al tratamiento no es necesaria salvo en casos muy concretos.

- *Estenosis cervical.*

La imposibilidad de paso de una sonda de 3 mm se considera como una estenosis cervical. Suele tratarse con dilataciones cervicales. La oclusión total puede originar hematómetra, llevando en ocasiones a tener que realizar una histerectomía. Estas estenosis suelen ser consecuencias de conizaciones muy amplias y coagulaciones por sangrados abundantes.

- *Infertilidad.*

Es un aspecto muy controvertido los posibles efectos de la conización, pudiendo dar lugar a abortos y partos pretérmino. No se han descrito efectos sobre la fertilidad después del tratamiento con Laser. Existen disparidad de criterios si con el tratamiento con Lletz hay un mayor riesgo de prematuridad (147) (148). Hay estudios que señalan que la profundidad del cono se relaciona con partos pretérmino. (149) (150) (151)

### **1.8.3. HISTERECTOMÍA.**

No esta indicada como tratamiento primario del CIN por la alta morbilidad. Se indica cuando se asocia a otros procesos que requieran la intervención.

Las posibles *indicaciones* serían:

- La imposibilidad de realizar la técnica de conización
- la imposibilidad de seguimiento postratamiento.

## 1.9. TRATAMIENTOS PREVENTIVO

### 1.9.1. PREVENCIÓN PRIMARIA. Vacuna del papiloma humano.

Las vacunas del VPH inducen una intensa y sostenida respuesta inmune, en contra de la pobre respuesta humoral que produce la infección natural. Las vacuna frente al VHP no es terapéutica, es preventiva frente a reinfecciones y sobre a la infección otros tipos de virus.

Se dispone de tres vacunas recombinantes frente al VPH que utilizan como inmunógeno la proteína mayor de la cápside L1, que forma partículas semejantes a virus (152). Se administran por vía intramuscular.

#### 1.9.1.1. *Tipos de vacunas.* Existen dos tipos de vacunas:

- Bivalente frente a VPH 16 y 18 y se administra a los 0, 1 y 6 meses.
- Tetravalente frente a 6, 11, 16, 18.
- Pentavalente comercializada solamente en EEUU.

El porcentaje de mujeres con anticuerpos detectables a los 44 meses es del 60%. El descenso del título de anticuerpos no se relaciona con la pérdida de eficacia, ya que hasta el momento no existe una correlación inmonológica de protección capaz de

determinar el dintel mínimo de anticuerpos necesarios para asegurar la eficacia.

Incluir varios antígenos en la misma vacuna no provoca interferencia inmunológica y supone que la protección sobre el VPH sea de por vida sin necesidad de recurrir a revacunaciones. Cuando se aplicó una cuarta dosis a los 60 meses se observó un aumento del título de anticuerpos de 21,4 y 16,6 veces para VPH 16 y VPH 18 respectivamente, confirmándose también un aumento de anticuerpos para los tipos no vacunales (VPH 31 y 45). Se desconoce si las infecciones cervicales repetidas por VPH inducirán idéntico efecto. (Reactivación de la respuesta inmune cuando esta empieza a decaer, que se observa como respuesta a la revacunación).

Parece claro que la vacuna frente al VPH confiere una protección frente al CIN del 100 % a los 9 años. Se ha demostrado el paso transplacentario de anticuerpos, lo que sugiere una posible protección neonatal, especialmente relevante en el caso de papilomatosis laríngea.

#### 1.9.1.2. *Seguridad de la vacuna:*

En los ensayos clínicos publicados (153, 154) las diferentes estructuras farmacológicas de las vacunas de VLP, de proteína L1, han obtenido unos resultados muy satisfactorios en cuanto tolerancia y seguridad. Los efectos adversos más frecuentes han sido los de aparición en el lugar de la inyección de dolor, eritema y edema en general de intensidad creciente con la dosis de la vacuna.



Los primeros ensayos publicados con la vacuna nonavalente para VPH 16, con diferentes dosis y adyuvantes, mostraron un buen perfil de seguridad con efectos locales, pero no significativos (155). Los efectos adversos se suelen resolver de forma espontánea en 48-72 horas. La seguridad de las vacunas bivalente (156) y tetravalente (157) en adultos han sido muy favorables.

#### 1.9.1.3. *Principios de las vacunas L1 de VPH.*

Una respuesta inmunitaria eficaz contra las infecciones genitales por VPH caracterizada por el desarrollo de una intensa inmunidad local mediada por células, que conduce a la regresión de la lesión y la protección contra infección futura por el mismo genotipo de VPH. La inmunidad humoral se genera en la mayoría, pero no en todos los individuos infectados (158) y se dirige contra el(los) epitópe(s) conformacional(es) presentes(s) de la proteína principal L1 de la envoltura o cápside situada en la superficie exterior de la partícula viral integra. Se considera que este anticuerpo es neutralizador del virus, ya que los anticuerpos monoclonales y séricos post-infección pueden prevenir la infección por el VPH en varios modelos in vitro e in vivo. Los niveles séricos de anticuerpos neutralizantes en las infecciones naturales por el VPH, incluso títulos máximos alcanzados justo después de la seroconversión son bajos. ( 159)

Posiblemente esta baja respuesta constituye un reflejo de un ciclo infeccioso exclusivamente intraepitelial de los papilomavirus y de la ausencia de viremia. Además, la proteína L1 se expresa durante la infección productiva por el papiloma virus y las partículas virales se ensamblan en las células superficiales del epitelio, en ausencia de histolisis e inflamación lejos de la mayoría

de las células presentadoras de antígenos y de los macrófagos circulantes. Como consecuencia de este fenómeno las partículas virales y las proteínas de la cápside se encuentran en cantidades escasas en los ganglios linfáticos de drenaje y en el bazo, localizaciones clásicas del inicio de la respuesta de anticuerpos.

A pesar de los bajos niveles de anticuerpos, al menos en los modelos animales, los individuos seropositivos están protegidos posiblemente durante toda su vida contra futuras exposiciones al virus. Esto hace pensar que las vacunas generan anticuerpos neutralizantes a las proteínas de la cápside o a la IMC dirigida a proteínas estructurales o no estructurales. Las pacientes con inmunodeficiencia de anticuerpos, no son más susceptibles a la reinfección por VPH cutáneos que los sujetos sanos, lo que orientaría a que el anticuerpo puede ser suficiente para la protección pero no necesario. Sin embargo, los estudios preliminares sobre el virus del papiloma del conejo de Shope indicaron que la inmunización sistemática con extractos infecciosos bajo condiciones que no permitiera la inducción de lesiones visibles si indujo anticuerpos neutralizantes y podría proteger contra la exposición a CRPV (160), lo cual sugiere que las vacunas que generan anticuerpos neutralizante contra las proteínas de la cápside del VPH pueden tener un efecto profiláctico.

Los epítopes neutralizantes inmunodominantes están situados en la proteína principal L1 de la cápside, la cual debe estar en forma terciaria o nativa y ensamblada como multímetro para poder generar anticuerpos neutralizantes. Cuando se expresa de forma recombinante a través de levaduras o vectores virales, la proteína L1 se autoensambla en cápsides vacías o partículas

similares al virus que son casi idénticas a nivel morfológico y antigénico a los viriones nativos.

1.9.1.4. *Mecanismo de protección.*

Actualmente se supone que el mecanismo de protección inducido por VLPS tiene lugar a través de la mediación de anticuerpos séricos, por los elevados títulos de anticuerpos neutralizantes séricos inducidos por estas vacunas. Sin embargo la evidencia a favor de la hipótesis del anticuerpo como mecanismo protector viene dada por observaciones de experimentos de transferencia pasiva reflejados en conejos y perros. (161) (162)

1.9.1.5. *Especificidad de tipo.*

Varios estudios serológicos realizados sobre VLPs han mostrado que los anticuerpos que presentan reacciones cruzadas con múltiples tipos de VLPs del VPH reconocen epítopes comunes de tipos y son, por regla general, lineales y no neutralizantes. La evidencia acumulada pone de manifiesto que los anticuerpos neutralizantes inmunodominadores generados por VLPs de L1 son tipo específicos y no inducen neutralización cruzada (163). Se ha observado que las VLPs altamente homologas, como es el caso de los pares VPHs 6/11 (164), VPHs 31/33, VPHs18/45 (163) y VPHs 16/34 (165), comparten uno o varios epítopes de neutralidad cruzada. Sin embargo estos epítopes de neutralización cruzada parece ser menos inmunogenicas que los epítopes específicos. (166) (167) Se ha descrito un epítope de neutralización lineal y común a varios tipos de VPH, pero se considera que los niveles de anticuerpos generados contra este son demasiado bajos para proceder una protección efectiva. (168)

Dado que no es posible cultivar los VPH en cantidades suficientes mediante cultivo tisular, los ensayos de neutralización han supuesto un reto. Los ensayos de neutralización se basaron inicialmente en el sistema de xenoinjerto de ratón desprotegido, en el que se infecta un fragmento de tejido *in vitro* con el virus y luego se inserta bajo la capsula renal de un ratón muy inmunocomprometido. Este modelo es limitado (169).

La mayoría de los estudios se basan ahora en la generación *in vitro* de pseudoviriones, dado que esta técnica ofrece un rendimiento relativamente alto (170). Estos pseudoviriones son VLP L1/L2 del VPH que pueden agregar ADN de plásmido, en sistema tanto celulares como acelulares.

Como ocurre con el virus auténtico, la infección dependiente de L1 y L2 puede ser neutralizada por anticuerpos anti L1 y Anti L2. El mecanismo de neutralización de anticuerpos mediados por L1 puede ser heterogéneo, aunque existen algunos anticuerpos que en concentraciones elevadas, bloquean la unión a células mediante interferencia estérica con el sitio del receptor del virus o uniéndose a lo largo de la ranura entre los pentámeros, estabilizando así la partícula e impidiendo la entrada del virus (171).

#### 1.9.1.6. *Duración de la protección.*

La duración de la protección es un tema de singular importancia que influirá en la vacunación.

Cuanto tiempo durará la inmunidad y si será necesario poner dosis de recuerdo.

La generación de células B y su respuesta al recuerdo antigénico son factores cruciales para la eficacia a largo plazo de la protección humoral inducida por las vacunas. Hasta el momento hay un desconocimiento sobre las células B de memoria y su generación. La expansión clonal rápida de las células B en el folículo linfático lleva a la formación del centro germinal, donde se produce el fenómeno clave de maduración de la afinidad de receptores de células B de alta afinidad y de este modo, la generación de anticuerpos de alta afinidad. Este acontecimiento es crítico para aquellas vacunas, cuya eficacia depende de la generación de Ig G neutralizante de alta afinidad como es el caso de la vacuna del VPH. En un momento determinado, las células B en maduración salen del centro germinal y entran en el compartimiento de células B de memoria a largo plazo.

Cuando se repite la exposición al antígeno estas células de memoria se expanden rápidamente y se diferencian en células plasmáticas en un proceso controlado por las células Th2 de memoria y las citoquinas que segregan.

Hay dos evidencias que los VLP son ligados por el receptor Toll-like 4 y que señalizan a través de la vía MyD88 (172) (173). La generación de reservas significativas de células B y T de memoria es muy dependiente de la presentación inicial de la célula dendrítica al linfocito T virgen y a los acontecimientos posteriores.

La activación y la señalización TLR son acontecimientos claves en este proceso y contribuyen tanto a la activación de células dendríticas para la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes y su diferenciación por la vía Th2 como a la activación primaria

de células B y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

Los resultados disponibles de los ensayos de vacunas VPH indican que después de la inmunización, los niveles de anticuerpos disminuyen desde los niveles máximos alcanzados hasta niveles de al menos 1 log superior a los niveles detectados en las infecciones detectados en las infecciones naturales y que persiste al menos 48 meses después de la vacuna (174) (175). La realidad es que la exposición post-vacunación al virus tendrá un efecto de recuerdo natural. (176)

#### 1.9.1.7. *Cuando y a quien vacunar.*

Para lograr una profilaxis eficaz mediante la vacunación, se acepta que las vacunas deberán administrarse antes de la exposición al virus. La infección genital por el VPH es de transmisión sexual por lo que para proteger contra el mayor número de infecciones y patologías asociadas al virus.

La inmunización debe producirse antes del inicio de la actividad sexual, lo que implicará que la población diana para la vacunación son las niñas en edad prepuberal y las adolescentes jóvenes.

Se dispone de razones inmunológicas a favor de la inmunización antes de la pubertad, ya que las respuestas de anticuerpos inducidas por estas vacunas son mayores antes de la pubertad que después de ella en ambos sexos. (177)

La inmunización de adolescentes no es fácil dado que generalmente los programas de vacunación tienen dificultad para incluir eficazmente este grupo de edad. Además existen diferencias culturales y sociales entre países y comunidades que podrían afectar la aceptación de la vacuna en chicas adolescentes contra la infección genital por VPH. La vacunación infantil podría ser más aceptable, pero antes de valorar esta situación, sería necesario disponer de datos sobre la seguridad, inmunogenicidad y la duración de la protección de las vacunas en niños pequeños.

Hay que tener en cuenta que pueden producirse posibles beneficios de los niveles elevados de los anticuerpos sérico en individuos expuestos a la infección (178) y los efectos relacionados con la vacunación de mujeres después de la exposición al VPH, deben ser valorados en estudios con un largo seguimiento.

## **1.9.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA.**

### **1.9.2.1. El Cribado mediante citología cérvico-vaginal**

Actualmente se estima que el cribado sistemático puede reducir las tasas de mortalidad por cáncer cérvico-uterino en un 70% o más. En el Reino Unido se estima prevención en al menos 1000 vidas al año en una población de 50 millones de habitantes. (179) (180) También se considera elevado el índice coste-efectividad teniendo en cuenta los resultados conseguidos. La incidencia empieza a subir hacia finales de la década de los años 20, alcanzando el mayor nivel a mediados de los 40, la pérdida de años de vida en cada caso de cáncer de cuello uterino es elevada.

Al incluir en el computo a EE UU, Europa, Australia y la cuenca del Pacífico el número de vidas salvadas llega a cientos de miles.

Los países en vías de desarrollo no se han podido beneficiar de las ventajas del cribado por falta de recursos, lo cual ha producido repercusiones desastrosas para las mujeres de estos países, ya que el 80% de la incidencia y la mortalidad por cáncer de cuello uterino se da en estos países. (181)

El tratamiento de las lesiones preinvasivas identificadas en los programas de cribado también ha permitido conservar la fertilidad. Como consecuencia de ello las mujeres de todo el mundo han llegado a tener altas tasas de confianza en la “prueba de Papanicolau” o citología cervical, y de esta manera cualquier alternativa de sustitución deberá superar la prueba de Papanicolau en términos de efectividad, coste, seguridad y aceptabilidad.

El cáncer de cérvix se desarrolla en la zona de transformación del cuello uterino, esta zona produce una metaplasma fisiológica del epitelio glandular a epitelio escamoso en la pubertad. La infección por VPH es muy común en mujeres jóvenes que hayan iniciado la actividad sexual y cuando persiste, las oncoproteínas virales provocan alteraciones del ciclo celular que dan como resultados la aparición del CIN (182).

En su forma más leve estas lesiones constituyen simples manifestaciones por la infección por VPH. Sin embargo en su forma grave CIN III, el riesgo de progresión a cáncer si no se detecta y no se trata es alto. Afortunadamente la progresión a cáncer puede durar tiempo, lo cual permite detectar las lesiones



por citología. La incidencia máxima de infección por el VPH se produce alrededor de los 20 años, la incidencia/detección máxima de CIN 3 se produce entorno a los 30 años y la incidencia máxima del cáncer de cuello se produce durante la década de los 40 años.

Se estima que si no fuera por la prevención secundaria aproximadamente el 1% de las mujeres que adquieren una infección por el VPH desarrollaría cáncer de cuello uterino. Sin embargo, por cada caso de cáncer se desarrolla un número mucho mayor de lesiones CIN, de los cuales una gran mayoría regresan.

Porcentajes de lesiones premalignas y malignas son de tipo escamoso, aunque un 15% aproximadamente es de tipo glandular. Los tipos de VPH 16 y 18 son los oncotipos dominantes en las lesiones escamosas, pero el tipo 18 es relativamente más importante en las lesiones glandulares. (183)

#### *Consideraciones de salud pública.*

Desde el desarrollo a mediados del siglo XX del cribado citológico del cáncer de cuello uterino, las nuevas técnicas citológicas, como la citología en medio líquido se han implementado para la prevención secundaria del cáncer cervical.

Aunque se ha comunicado que no existe ninguna evidencia directa del impacto del cribado citológico en el cáncer de cuello uterino, como la obtenido en un ensayo clínico aleatorizado, existen numerosos datos epidemiológicos convincentes que permiten inferir el impacto de un cribado citológico implementado con éxito para reducir las tasas de cáncer cervical. (184)

Se han señalado sólidas evidencias (185) respecto al impacto de correlaciones citológicas de las tendencias incidencia / mortalidad en las que se lleva a cabo actividades de cribado organizado.

Estudios epidemiológicos sobre datos de cohortes, también han puesto de manifiesto el impacto del cribado citológico en la reducción en las tasas de cáncer de cuello uterino (186).

Los logros alcanzados por los programas de citología en la reducción de las tasas de cáncer de cuello uterino en países y regiones seleccionados deben yuxtaponerse al incremento progresivo de las tasas globales de incidencia de cáncer cervical y de la mortalidad atribuible al cáncer (187).

Es conveniente tener en cuenta tanto las ventajas y las limitaciones de la citología para el cribado del cáncer de cuello uterino. En poblaciones vacunadas contra el VPH 16 y 18 se anticipa una reducción del valor predictivo positivo del cribado cervical dado que habrá menos lesiones de alto grado en las mujeres con anomalías citológicas. Por lo que resulta lógico desarrollar múltiples modalidades viables para la prevención del cáncer cervical, incluyendo métodos que tengan el potencial de cribado similares o mejores que los que ofrece la citología por sí sola. También deben satisfacer las necesidades de las poblaciones con menos recursos, tales como el bajo coste, la necesidad de menos de tres visitas (citología, Colposcopia y tratamiento) para un ciclo de intervención (cribado) y la necesidad de un número menor de intervenciones a lo largo de la vida debida a mayores garantías negativas de una única intervención.

Resultaría erróneo decir que una modalidad, ya sea el uso del cribado citológico, la inspección visual con ácido acético, la prueba de detección del ADN de VPH, o la vacunación contra el VPH pueda satisfacer las necesidades de todas las poblaciones del mundo. La importancia de que todos y cada uno de los métodos de cribado sean válidos respecto a su eficacia técnica y a su coste efectividad, el cual debe ser asumible por la región particular en la que se utilice. (188)

La ansiedad que conlleva para muchas mujeres la realización de una prueba de cribado cervical está bien documentada. A algunas mujeres el temor a tener o estar afectadas por un cáncer les produce ansiedad o el miedo a tener una enfermedad de transmisión sexual. (189) Este último aspecto ha sido puesto en relieve recientemente en un estudio que ha abordado el impacto de la positividad para el VPH en mujeres que se someten a cribado cervical. (190)

#### 1.9.2.2. Nuevas tecnologías:

La expresión persistente de los oncogenes virales E6 y E7 constituye un proceso necesario para el desarrollo de la carcinogénesis inducida por el VPH. (191)

- I. La detección de *ARNm* de E6/E7 para tipos de alto riesgo puede ser un indicador, de que se ha dado un paso más en progresión hacia el desarrollo de un cáncer. Habría que esperar una un aumento de la especificidad para lesiones de alto grado comparado con la especificidad de la prueba del ADN. Se ha descrito una elevada tasa de detección de transcritos de E6/E7

en tejidos de cáncer de cuello y se ha observado una asociación con la severidad histológica en biopsias cervicales. (192)

## II. *p16*.

La proteína P16<sup>ink4a</sup> es un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina cuya expresión es controlada negativamente por el producto génico del retinoblastoma.

Generalmente la p16 se expresa a un nivel muy bajo en células normales pero se sobre-expresa intensamente en líneas celulares de cáncer de cuello uterino en las que el pRB ha sido inactivado por la oncoproteína E7 de los VPH de alto riesgo. (193)

La sobreexpresión de la p16, que se puede reconocer mediante inmunotinción, puede considerarse un marcador no solo de la infección por el VPH sino también de la expresión activa de genes virales y de la desregulación del ciclo células inducido por los virus. (194)

La inmunotinción para p16 se ha asociado a la neoplasia intraepitelial o invasiva en muestras histológicas del cuello uterino. (195) La tinción de la p16 de muestras de citología en fase líquida muestra una correlación global razonable con su clasificación morfológica. (196)

Las células no displásicas, sobre todo las células metaplásicas, atróficas, y endocervicales pueden mostrar inmunoreactividad para p16, reduciendo por ello la especificidad de la prueba. Para mejorar la especificidad se ha propuesto aplicar un índice nuclear en células positivas para p16. Aplicando este enfoque en muestras obtenidas mediante citología en fase líquida, el 1% de las citologías normales, el 10% de las citologías con LSIL y el 98% de las citológicas se

clasifican como positivas en el índice nuclear, mientras el 12%, 37% y 98% respectivamente se tiñeron para p16. (197)

Se ha propuesto la inmunotinción para p16 como herramienta para el triaje de mujeres con citologías con resultados de bajo grado o dudosos.. En un estudio de 66 muestras de citologías y biopsias de seguimiento con resultados de ASC-US o ASC-H el 60,6% de las muestras fueron teñidas para p16 mostrando una sensibilidad, del 95% para las lesiones de alto grado confirmadas mediante biopsia (198).

La p16 podría resultar especialmente interesante en mujeres con resultados de LSIL en la citología donde el triaje de VPH es menos eficiente. Se observó positividad para la p16 en el 58% de las citologías en fase líquida obtenidas de mujeres afectadas por LSIL mientras que el 85% obtuvo resultados positivos mediante la captura de híbridos. (199)

En 238 mujeres derivadas para Colposcopia efectuadas por LSIL, ASCUS persistentes o con resultados normales después del Lletz , el 27% dio resultados positivos tanto en la prueba de VPH de alto riesgo como a la inmunotinción de p16, incluyendo el 78,5% de los casos con CIN 2 confirmados mediante biopsias (200).

Utilizando la prueba de detección del VPH como prueba de cribado primario, la inmunotinción p16 podría aplicarse en el triaje de mujeres VPH positivas, para diferenciar las que necesitan una derivación directa a colposcopia y aquellas en las que estaría más indicada la repetición de la prueba. Los resultados preliminares de este estudio, enclavados en un ensayo aleatorizado extenso, sugieren una sensibilidad y especificidad superiores para p16 respecto a la citología para lesiones CIN 2 o más en mujeres con resultados positivos para la HC2. De

todas formas es necesario evaluar con mayor detalle la sensibilidad y la especificidad de la prueba de p16 en material citológico.

### III. Otros marcadores de proliferación del ciclo células.

Tomando como base el valor potencial de la p16, para separar las lesiones de alto grado de las células no replicantes, se han estudiado otras proteínas que intervienen en la proliferación celular y en la regulación del ciclo celular. Los marcadores de proliferación *Ki-67* y *PCNA* no parecen ofrecer alternativas prometedoras aunque es necesario realizar una evaluación más amplia de estos marcadores. Los estudios se centran en las proteínas de replicación del ADN *cdc6* y *mcm5* para las que las investigaciones sugieren una buena sensibilidad y especificidad. (201)

Al igual que sucede con la p16, el trabajo inicial se realizó con muestras de biopsias y la aplicación del método a la citología. Estudios recientes confirman que la expresión de estas proteínas es importante para la transformación maligna y que los marcadores pueden ayudar a separar las lesiones de alto grado de las de bajo grado aunque estudios estén en fase iniciales.

### IV. *Análisis de los microarrays.*

Los análisis de microarrays de expresión genómica o de hibridación genómica comparada que se han desarrollado recientemente pueden suponer un avance significativo en la identificación de biomarcadores.

Se han realizado varios análisis de microarrays de expresión en carcinomas cervicales que han permitido identificar varios genes que se sobre expresan o infra-expresan en el cáncer

cervical. En los genes que se expresan de forma diferenciada en muestras normales y en carcinomas, se incluyen genes de proliferación, genes que codifican moléculas de adhesión, proteínas de matriz y metaloproteínas de matriz. Una comparación de los perfiles de expresión de lesiones de alto grado y carcinomas escamosos celulares, determinados con microarrays, ha revelado que el grupo de lesiones CIN de alto grado tiene perfiles de expresión asociados más estrechamente con el cáncer que otras lesiones morfológicamente iguales. Esta circunstancia sugiere que los estudios de perfiles de expresión, pueden identificar marcadores que permitan detectar lesiones las lesiones CIN en fase de progresión y con mayor potencial invasivo (202).

- V. Alternativamente, se pueden llevar a cabo una *hibridación genómica comparada con microarrays* para detectar regiones comunes de ganancias o pérdidas cromosómicas a partir de las cuales se podrán inferir marcadores candidatos. Un reciente estudio sobre carcinomas escamosos y adenocarcinomas de cuello uterino en el que utilizó microarrays reveló que las ganancias 1q2-31, 3q12-28, y 20q11-13 y las pérdidas de 11q22-25 y 13q14-21 son bastante comunes (203). El mapa fino del cromosoma 20q mediante amplificación con sondas dependientes de múltiples y diversos puntos de anclaje mostró incrementos en el número de copias para varios genes en 20q11-q12. Habrá que valorar si los biomarcadores celulares identificados permitirían estratificar mejor el riesgo en mujeres con VPH de alto riesgo.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1.** Conocer los factores que favorecen la recurrencia de las lesiones de alto grado en el cuello del útero después de la extirpación completa y presentar márgenes libres.

**2.2.** Valorar el estado cervical previo al tratamiento así como la colposcopia con la imagen de la recurrencia.

## **3. HIPÓTESIS**

**3.1. PARA EL PRIMER OBJETIVO SE ESTABLECEN LAS SIGUIENTES HIPÓTESIS**

**3.1.1.** Si existen factores externos en la recurrencia, establecer cuales de ellos favorecen la recurrencia en mayor o menor grado.

**3.1.2.** Si la recurrencia está relacionada con el tiempo, cuando se inician las alteraciones celulares y como evoluciona.

**3.1.3.** Si el número de virus y el árbol filogenético al que pertenecen favorecen la progresión más rápida o lenta de lesión



### **3.2. PARA EL SEGUNDO OBJETIVO SE ESTABLECEN LAS SIGUIENTES HIPÓTESIS**

- 3.2.1.** Si el tamaño de la lesión primitiva (colposcópica) está relacionada con la observada en la recurrencia.
- 3.2.2.** Si las imágenes colposcópicas víricas observadas previas al tratamiento se corresponden con la recurrencia
- 3.2.3.** Si la imagen colposcópica observada en la recurrencia se localiza en la misma zona previa al tratamiento y si es terminológicamente la misma u otra.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se realiza un estudio observacional, retrospectivo en el que todas las pacientes incluidas, presentaban recurrencias de lesiones cervicales (neoplasias cervicales intraepiteliales) después de ser tratadas mediante Lletz-Leep y/o Laser.

La selección de la muestra procede del Servicio de Ginecología del Complejo Hospitalario de Salamanca. Las pacientes fueron remitidas para tratamiento y control de lesiones cervicales L-SIL o H-SIL, se identificación el virus del papiloma y procesos asociados vagino-vulvares en el periodo comprendido entre 2003-

2013. Las pacientes proceden del área sanitaria de Salamanca o remitidas de provincias limítrofes para el tratamiento Laser.

La población estudiada se analiza través del tiempo. El seguimiento se realiza en condiciones basales y a los 6 y 12 meses.

En los plazos determinados se registran los datos mediante la aplicación de protocolos, exámenes clínicos (citología, colposcopia, genómica HPV, biopsia), seguimientos de registros especiales y rutinarios, que en nuestro estudio se hacen a través de cita programada en la consulta de ginecología especializada en Patología del Tracto Genital Inferior.

La mayor utilidad de estos estudios radica, en la prueba de hipótesis sobre la causa de las enfermedades y su recurrencia, permitiendo además evaluar múltiples variables, con la finalidad de estimar el riesgo, que representa cada una de ellas en la génesis de la enfermedad y su evolución, contribuyendo a medir la incidencia y el riesgo relativo de desarrollar determinadas complicaciones, aunque en nuestro caso se trata de comprobar principalmente cómo se comporta las lesiones cervicales tras realizar el tratamiento de las mismas.

#### **4.2. CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Para el cálculo del tamaño de la muestra hay que tener en cuenta los siguientes elementos.

- El error alfa, que indica la probabilidad de que los hallazgos de interés pudieran ser justificados por variaciones explicables por el azar.

- El error beta, que determina la probabilidad de no detectar un hallazgo como importante y atribuirlo al azar.
- Diferencia clínicamente significativa. Para cualquier estadígrafo, al realizar cualquier investigación, se deberá definir el valor que el clínico considere importante: La diferencia sea de proporciones o promedios, así como razón de ventaja o riesgo relativo, comparados con la unidad, índice de kappa o coeficiente de correlación comparados con cero etc.
- Hipótesis uni o bilateral. En los estudios clínicos, corresponde a plantear una hipótesis bilateral.
- Posible pérdida de casos dentro del estudio. Es importante tener presente la necesidad de evitar hasta donde sea posible la pérdida de casos puesto que si esta alcanza una gran magnitud el estudio puede quedar invalidado.

Salvo que se indique expresamente otra cosa, el nivel de significación empleado en el análisis es  $\alpha = 0,05$  (nivel de confianza  $(1-\alpha) = 95\%$ ).

Así pues, en los parámetros de la hipótesis se rechaza la nula ( $H_0$ ) si el error de tipo I ( $\alpha$ ) es menor de 0,05. Se admite como estadísticamente significativo un valor de la p igual o inferior a 0,05.

Los intervalos confianza (IC) que acompañan al cálculo de los ODDS RATIO (OR) se estiman igualmente al 95 % de nivel de confianza, conforme a lo que es habitual en este tipo de estudios.

El análisis estadístico se realiza con un paquete estadístico SPSS versión 18 implementado para PC.

Teniendo en cuenta el tamaño de la muestra, la fidelidad de los datos, la ausencia de sesgo muestral, las pruebas de asociación e independencia se llevan a cabo mediante pruebas asintóticas.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se ha tenido en cuenta la incidencia y prevalencia de la enfermedad de base en España, la Infección por HPV y como población de referencia la población de la provincia de Salamanca.

NIVEL DE CONFIANZA.....	0,95
POBLACIÓN DE REFRENCIA.....	180.402
ESTIMACION DE LA POBLACIÓN.....	3,2
PRECISION DE ESTIMACIÓN PARA EL NIVEL DE CONFIANZA....	0,01
TAMAÑO MINIMO DE LA MUESTRA.....	112

Así aceptando el riesgo alfa de 0,95 para una precisión de +/- 0,1 unidades en un contraste bilateral para una prueba estimada de 3,2 se precisa una muestra aleatoria poblacional de 92 pacientes. Se ha estimado una tasa de reposición del 1% finalmente se incluyeron 180 pacientes que cumplían los criterios de inclusión en el estudio. Se descartaron 11 paciente con parámetros incompletos del total de la base de datos.

### **4.3. OBTENCION Y CARACTERISITICAS GENERALES DE LA MUESTRA**

La muestra se extrajo del registro clínico (base de datos) disponible en el Servicio de Obstetricia y Ginecología (Patología del Tracto Genital Inferior). La información se obtuvo a partir de historias clínicas de dicho Servicio y de las bases de datos de los Servicios de Anatomía Patológica y Microbiología de dicho complejo asistencial .

#### **4.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LA MUESTRA.**

- Pacientes con neoplasia cervical intraepitelial que ha sido tratados mediante LLETZ más laser
- Mujeres con edad superior a los 19 años
- Activas sexualmente.
- No diagnosticadas de neoplasias graves asociadas.
- Pacientes con determinación: citológica, colposcópica, HPV, biopsia.

#### **4.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

- Edad inferior a 19 años.
- Gestantes
- Histerectomizadas,
- Paciente VIH
- No fueron incluidas en las muestras las pacientes con historia clínica confusa o con datos incompletos.

El principio de intención de tratar es una forma de analizar los resultados, que considera a todos los individuos, incluidos en el estudio de acuerdo, al grupo al cual fueron asignados originariamente aunque no haya cumplido con el protocolo. Permitiendo mantener hasta el final del estudio el objetivo: el balance de los factores pronósticos conocidos y desconocidos disminuyendo la probabilidad de sesgar los resultados.

Este tipo de estudios se ve dificultado, cuando no todas las pacientes incluidas en la muestra se adhieren al tratamiento asignado, no acudiendo a las consultas o rechazando el tratamiento.

Las consideradas transeúntes que no llegaron a cumplir el periodo de seguimiento no fueron incluidas en el estudio.

#### **4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO.**

- Edad, paridad, residencia, trabajo, hábitos, anticoncepción.
- Citología, colposcopia, HPV, biopsia.
- Tamaño de la lesión, localización márgenes después del tratamiento y los mismos controles a los 6 y 12 meses.

#### **4.5. PROCEDIMIENTO Y TECNICA.**

##### **4.5.1. PROCEDIMIENTO.**

Las pacientes incluidas en el estudio tenían diagnóstico de L-SIL o H-SIL, resultados obtenidos mediante citología triplete toma cérvico-vaginal que se fijó en medio líquido. Se realizó toma independiente de HPV, mediante hisopo de la unión del epitelio

escamo columnar para ser procesada en el laboratorio de microbiología.

Las paciente con neoplasia cervical intraepitelial, fueron sometidas a estudio colposcópico completo, estableciendo el correspondiente mapa colposcópico y la correspondiente biopsia siguiendo la técnica de “ver y tratar” mediante LLETZ-LEEP. En los casos de lesiones de alto grado se realizó conización mediante asa de LLETZ aplicando el tratamiento con Laser CO2, con la finalidad de ampliar los márgenes de seguridad tanto en exocérvix como en el endocérvix con la finalidad de evitar las recurrencias.

Los datos obtenidos en estos procedimientos, junto con los procedentes de la historia clínica, fueron incluidos en un protocolo de recogida de datos y así poder realizar el correspondiente estudio estadístico.

#### **4.5.2. TÉCNICAS.**

- **CITOLOGÍA CERVICAL.** Es una técnica de exploración del cuello uterino, de singular importancia en el diagnóstico de las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino.

Previa visualización del cérvix con espéculo, se recoge mediante espátula de Ayre, células de vagina y exocérvix y muestra de endocérvix con cepillo Citobrush.

Tras la fijación en medio líquido se tiñeron por el método de Papanicolau.

- **COLPOSCOPIA.**

La colposcopia es una técnica de diagnóstico, que permite la observación del cérvix, la vagina y la vulva con una visión iluminada y aumentada. Permite identificar ciertos cambios no visibles por inspección visual directa y permite tomar muestras para biopsia (dirigida), de cualquier área sospechosa, siendo de gran ayuda para el diagnóstico de las lesiones intraepiteliales cuya capacidad de progresión hacia el cáncer es conocida.

Se trata de un método bien establecido utilizado para la evaluación histológica de pacientes con citologías anormales.

Las pacientes con alteraciones citológicas, se les realizó estudio colposcópico con colposcopio Olympus de luz fría .

Tras la visión del cérvix sin preparar, se aplicó suero fisiológico para limpiar el cérvix de secreciones y visualizar los vasos. Se realizó posterior pincelado con ácido acético al 5% y aplicándose después una solución yodo-yodurada de Lugol (2g yodo cristalino, 4 g yoduro potásico y 100 ml agua destilada) en cérvix y vagina

- **BIOPSIA.**

La biopsia de cérvix se realizó en quirófano y mediante anestesia local.

Para los tratamientos con equipamiento eléctrico, (LLETZ) se aplica una potencia entre 50-70 vatios para el corte y entre 150-175 vatios para la coagulación. El tamaño de las asas utilizadas fueron, para biopsias de 15mm x5mm.



Para las conizaciones de 20mm x 12mm y para las biopsias endocervicales de 10mm x 7mm.

El tamaño de la muestra de cérvix entre 3mm y 3cm quedando todas ellas encuadradas como tratamiento escisional.

La pieza es fijada en formaldehído al 10% , por un periodo de tiempo que oscila entre 4-10 horas, dependiendo del tamaño del tejido. Tras el tallado de la pieza se selecciona la zona a estudiar, introducida en una cápsula de plástico e identificada de forma numérica, introduciéndose en un procesador automático de tejidos Leica 1050 , donde es deshidratado y posteriormente, incluido en parafina líquida. Se secciona la pieza en láminas de 3 micras de grosor mediante micrótomos. Posteriormente se realiza tinción automática con hematoxilina-eosina procediéndose seguidamente a montaje automática.

- **TRATAMIENTO CON LASER.**

La utilización del tratamiento con laser, tiene la finalidad de destruir los bordes de la lesión y ampliar los márgenes de seguridad y profundizar en el endocérvix, para ampliar la zona extirpada.

Se establecerá una pauta de anestesia local primero tópica y luego inyectada en 4 puntos en el cérvix con bupivacaina. Los productos que se utilizan para la hemostasia serán polvo de fibrina, solución monssel, y pegamento adherente.

- **DETERMINACION DEL HPV.**

La muestra recogida con torunda y depositada en un medio de transporte para ser enviada al laboratorio. Se ha utilizado el sistema diagnóstico CLART HPV2 que permite la detección simultánea de 35 genotipos de HPV. Todas las sondas están triplicadas para cada tipo de HPV y los controles, de forma que se evitan alteraciones locales sobre los puntos que pudieran afectar a los resultados finales.

#### **4.6. ANALISIS ESTADISTICO.**

##### **4.6.1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA.**

El análisis estadístico incluye datos descriptivos. Los valores cuantitativos se representan mediante la media y la desviación estándar. Por su parte las variables absolutas se han descrito mediante frecuencias absolutas y relativas.

Se lleva a cabo un análisis descriptivo con el fin de caracterizar las pacientes, edad, paridad hábitos anticoncepción.

##### **4.6.2. CONTRASTE DE HIPOTESIS**

La relación de alteraciones citológicas, biopsia y colposcópicas con el tipo de VPH.

La respuesta al tratamiento queda cuantificada por la progresión o regresión de las lesiones tratadas.

Las recurrencias de las lesiones tratadas determinan el estado clínico y los factores que las favorecen.

Cuando los contrastes de hipótesis arrojan diferencias estadísticamente significativas se procede a reevaluar la asociación y estimar tanto la fuerza de asociación, como el valor predictivo de los marcadores o variables independientes respecto a la condición objeto de estudio.

La fuerza de la asociación se evalúa mediante un análisis bivariante simple de CHI cuadrado y la estimación ODDS RATIO (OR). Esta razón nos dará una medida de la fuerza de asociación entre el factor de riesgo y la condición:

- El factor de riesgo o exposición lo constituye, el presentar un valor de la variable independiente (tipos de HPV y lesión que la paciente presenta al inicio).
- La condición será la evolución de las lesiones cervicales según los tratamientos realizados.

Se tomará en consideración la siguiente escala, a la hora de valorar la importancia de la fuerza de la asociación medida por la OR:

- OR > 10, asociación muy fuerte
- OR entre 5 y 10, asociación fuerte.
- OR entre 2 y 5 asociación moderada.
- OR >1<2 asociación débil.

#### 4.6.3. DESARROLLO DEL ANALISIS ESTADISTICO.

En primer lugar realizamos un estudio descriptivo, de las distintas variables en cada grupo considerado. Habiéndose determinado para cada uno de ellos los siguientes estadísticos descriptivos.

- 1.- Frecuencia Absoluta
- 2.- Porcentaje (%)
- 3.- X<sup>2</sup>

El uso de métodos no paramétricos concretamente el de Kruskal-Wallis, queda justificado en algunas ocasiones, por el reducido número de datos del grupo, junto a las diferencias de la dispersión de las diferentes variables en los mismos y la no normalidad de los datos y como hemos dicho, más útiles como estadísticos descriptivos, pueden resultar en ese caso la mediana (como medida de centralización alternativa a la media), los valores mínimo y máximo (cuya diferencia llamada rango constituye también una medida de variabilidad).

Los test realizados se considerarán significativos para valores  $p < 0,05$ , muy significativos si  $p < 0,01$  y altamente significativos si  $p < 0,001$ . El resto de las comparaciones se han realizado con la T de Student para muestras independientes y el test de chi cuadrado.

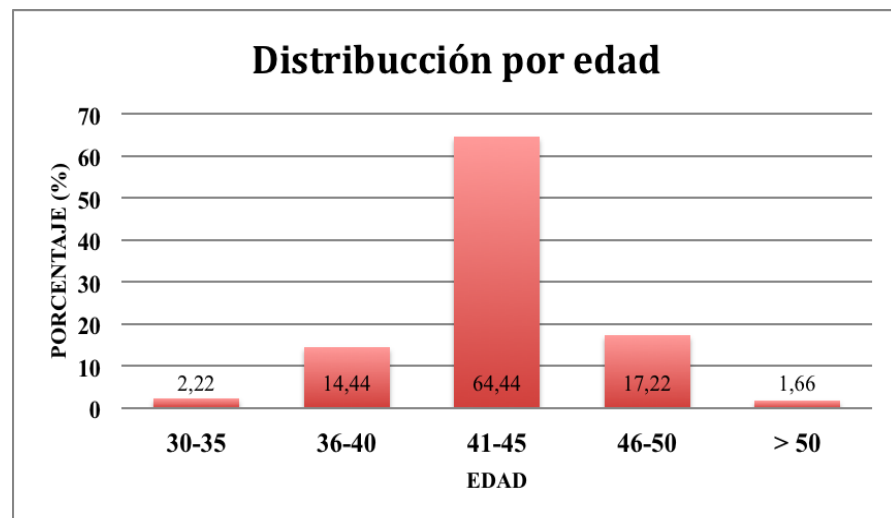
## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERÍSTICAS AL INICIO DEL ESTUDIO

#### 5.1.1. Distribución por edad

EDAD	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
30-35	4	2,22
36-40	26	14,44
41-45	116	64,44
46-50	31	17,22
>50	3	1,66
TOTAL 180		X <sup>2</sup> = 21,9 P < 0.05

Tabla I. Distribución por edad



Gráfica 1. Distribución por edad

La distribución de las pacientes por intervalos de edad de 5 años reveló que el grupo de edad más frecuente es la comprendida entre los 41 y 45 años. Agrupando casi el 65% de las mujeres estudiadas, se convierte el grupo de edad donde más frecuentemente han recidivado las lesiones. Casi la totalidad de las pacientes están comprendidas entre 36 y 50 años.

5.1.2. Distribución por paridad

PARIDAD	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
Nulíparas	22	12,22
1 Parto	64	35,55
2 Parto	43	23,88
3 Parto	36	20
4 Parto	15	8,33

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 76,34 P < 0,005

Tabla II. Paridad

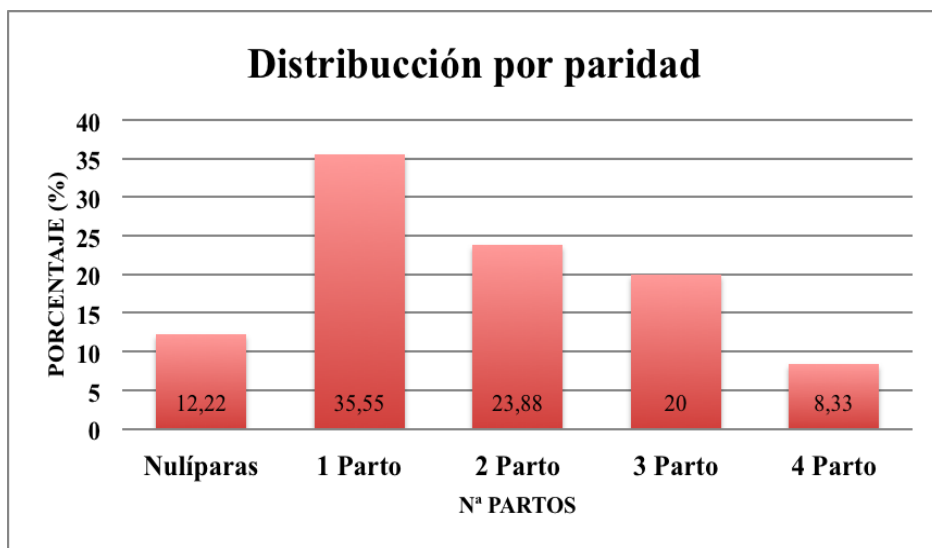


Gráfico 2. Distribución por paridad

La mayoría de las mujeres tienen partos, llegando a casi el 80% las mujeres con 1-3 partos. Más de la mitad de las pacientes tienen entre 1 y 2 partos, representando las nulíparas sólo el 12%.

5.1.3. Distribución por la actividad laboral

TRABAJO	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
Casa	38	21,11
Paro	41	22,77
Funcionaria	35	19,44
Autónoma	66	36,66
TOTAL = 180		$\chi^2 = 62,65$ P < 0.05

Tabla III. Actividad laboral

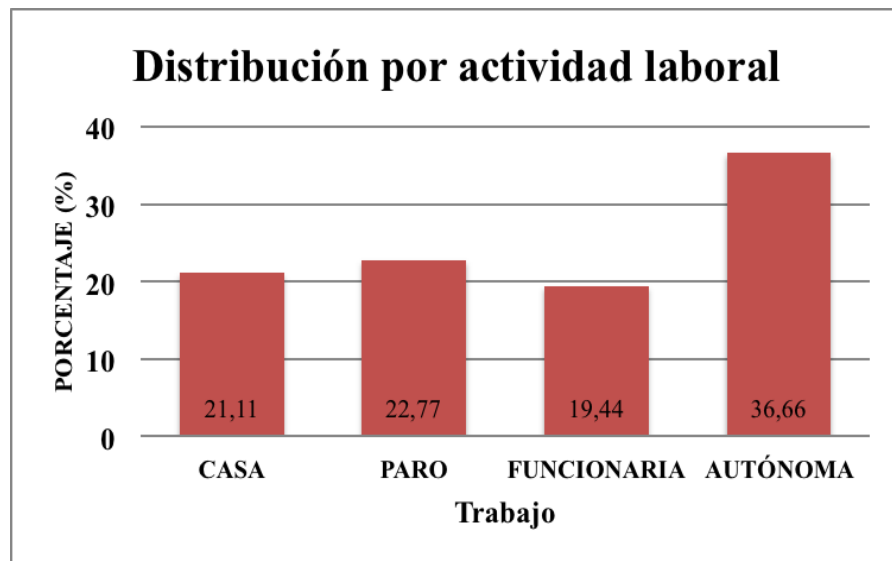


Gráfico 3. Distribución por Trabajo

No tienen actividad laboral de casi la mitad de las pacientes, bien por trabajar en el hogar, bien por situación de paro. El mayor porcentaje corresponde a mujeres con actividad laboral autónoma

5.1.4. Distribución según el lugar de residencia

RESIDENCIA	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE(%)
Ciudad	97	53,88
Rural	93	46,11

TOTAL = 180 PNS

Tabla IV. Lugar de residencia de las pacientes

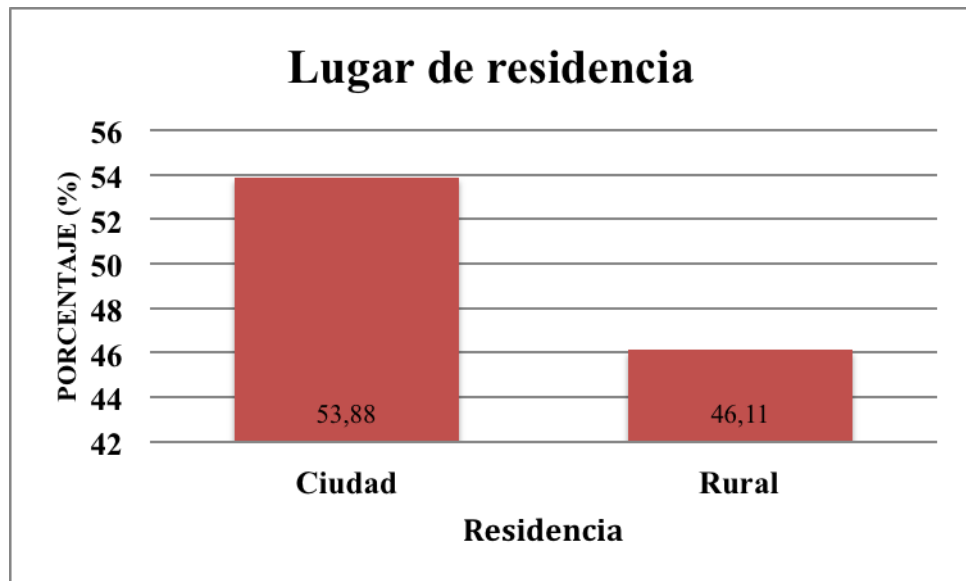


Gráfico 4. Lugar de residencia

No hubo diferencias entre las pacientes según el lugar de residencia ,distribuyéndose casi a la mitad en medio rural y medio urbano.



5.1.5. Hábitos de las mujeres

HÁBITOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
HÁBITOS	12	6,66
NO	41	22,77
EXFUMADORA	125	69,44
FUMADORA	2	1,11
OTROS	8,33	15
TOTAL = 180		$\chi^2 = 18,41$ p < 0,01

Tabla V. Hábitos

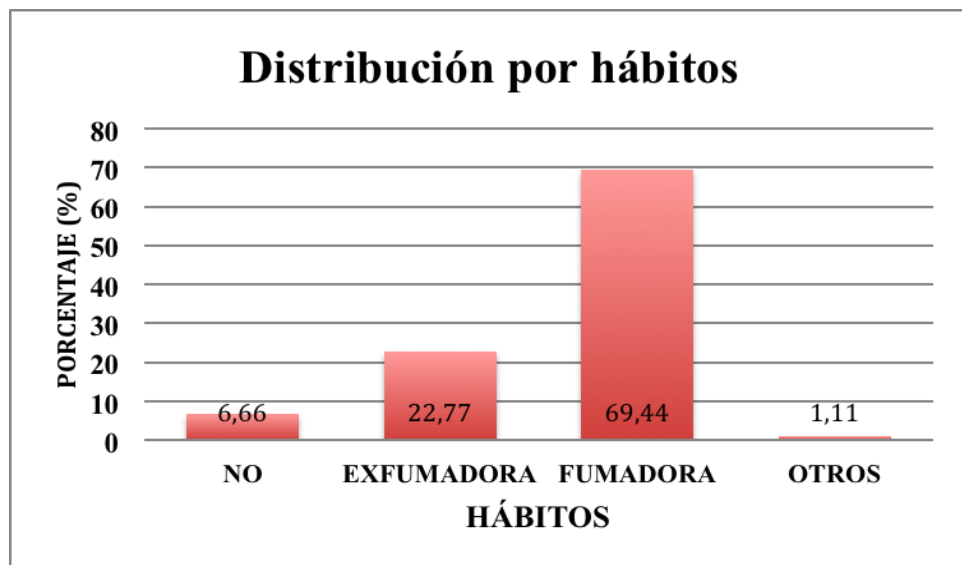


Gráfico 5. Distribución por Hábitos

Casi la totalidad de las mujeres presentan hábitos, siendo el tabáquico predominante. El 70% de las mujeres son fumadoras, y mas del 20% exfumadoras, convirtiendose el hábito tabáquico la adición mas frecuente.

5.1.6. Métodos de anticoncepción utilizados

ANTICONCEPCIÓN	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
NO	11	6,11
HORMONAL	119	66,11
DIU	15	8,33
BARRERA	36	20
TOTAL = 180		$\chi^2 = 16,12 \quad p < 0,01$

Tabla VI. Métodos anticonceptivos

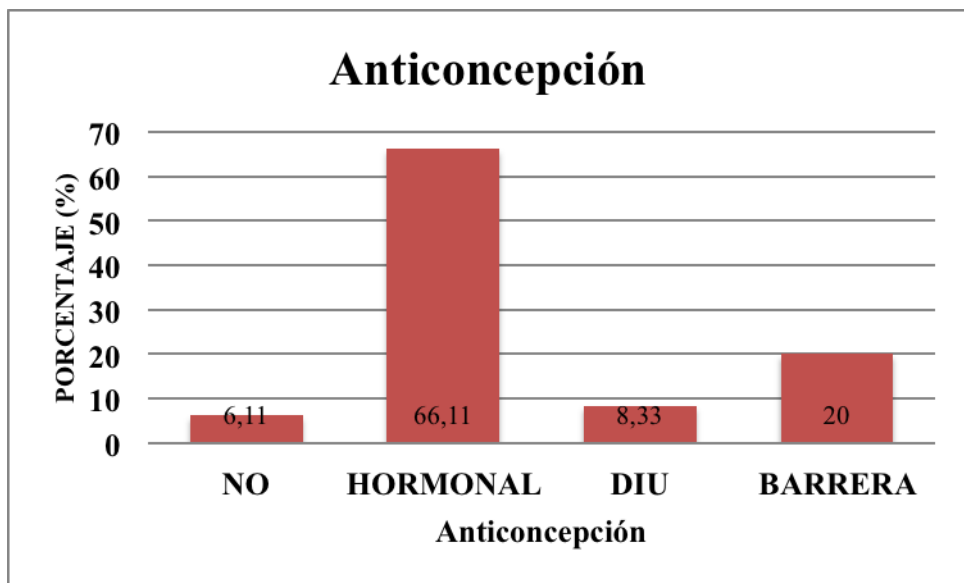


Gráfico 6. Métodos anticonceptivos

Casi el 95% de las mujeres utilizaban un método de anticoncepción. Los anticonceptivos hormonales es el mas utilizado, representando el método en el 66% de las mujeres. El método de barrera sólo supone el 20%

5.1.7. Resultados de la citología

CITOLOGÍA	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
L-SIL	11	6,11
H-SIL	169	93,88

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 21,54 p < 0,001

Tabla VII. Resultados de la citología inicial

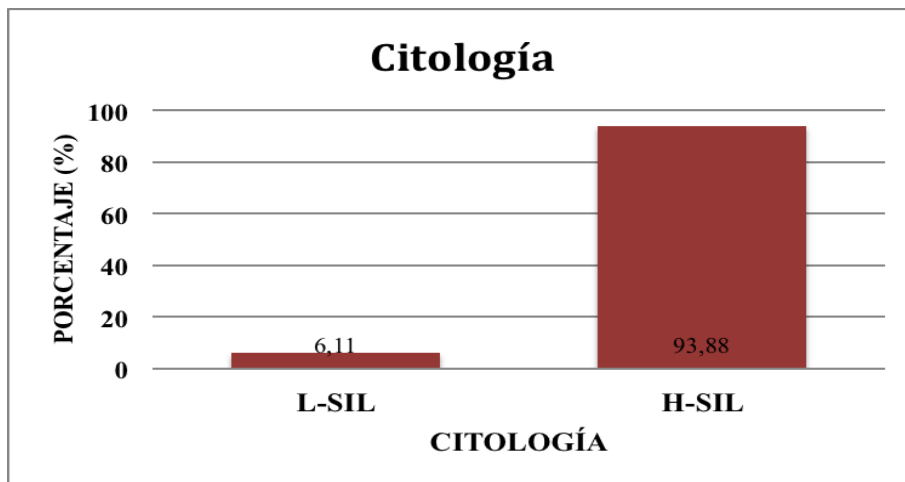


Gráfico 7. Citología

La lesión citológica predominante es el H-SIL, representando el 94% de las pacientes. La citología L-SIL que motivó del tratamiento es debida a la persistencia de la lesión o la asociación de otros factores de riesgo, que aconsejaron un tratamiento de exéresis.

5.1.8. Imagen colposcópica de los vasos

COLPOSCOPIA VASOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
TIPO I	12	6,66
TIPO II	139	77,22
TIPO III	28	15,55
TIPO IV	1	0,55

TOTAL = 180

$\chi^2 = 18,923$   $p < 0,001$

Tabla VIII. Imagen inicial colposcópica de los vasos

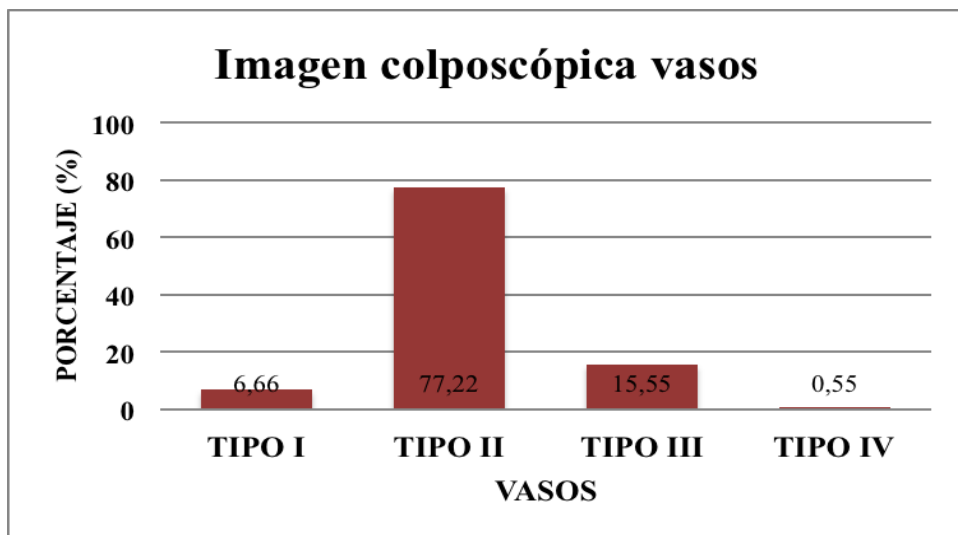


Gráfico 8. Vasos cervicales. Imagen colposcópica

La mayoría de las alteraciones vasculares corresponden a alteraciones Tipo II, con un 77%. En la clasificación de Mateu-Aragonés (1981) los vasos TIPO II, corresponden a un patrón vascular aumentado, con una imagen vascular de Colpitis. Los TIPO III ectásico en un 15% con vasos dilatados, pero de distribución normal.

5.1.9. Imagen colposcópica

COLPOSCOPIA	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
ACETO +	98	54,44
MOSAICO	53	29,44
PUNTEADO	20	11,11
ZT	6	3,33
ZTA	3	1,66
TOTAL = 180		$\chi^2 = 19,23 \quad p < 0,05$

Tabla IX. Imagen inicial colposcópica

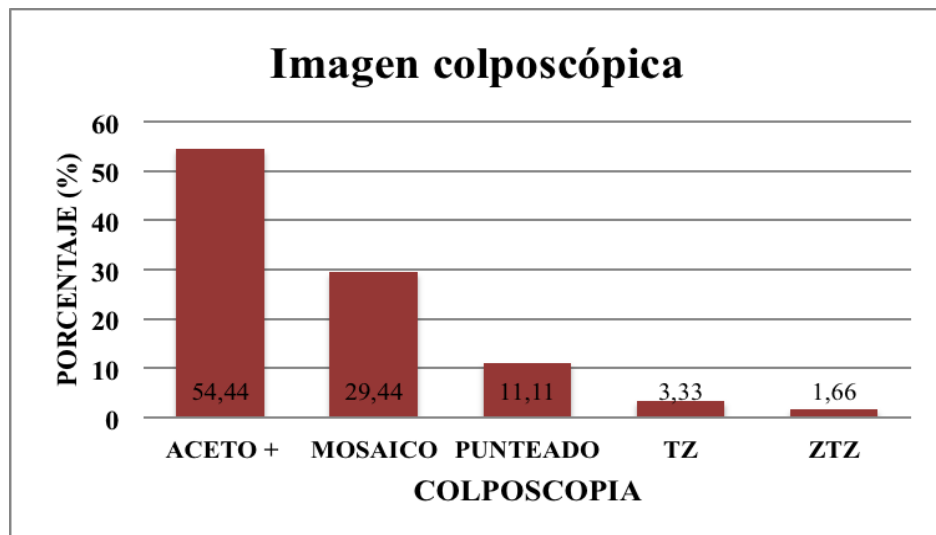


Gráfico 9. Imagen colposcópica inicial

La clasificación de las imágenes colposcópicas se ajustan a la Clasificación de Barcelona 1992. Las categorías diagnósticas corresponden a Epitelio Acetoblancos, Mosaico, Punteado, la presencia de Zona de Transformación Típica y Zona de Transformación Atípica. Mas de la mitad de las pacientes presentaron un epitelio acetoblancos, siendo el 30% un patrón de mosaico y en menos frecuencia (11%) punteado.

5.1.10. Resultado anatómo-patológico del tratamiento cervical

ANATOMÍA PATOLÓGICA	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
CIN I	11	6,11
CIN II	36	20
CIN III	133	73,88

TOTAL = 180

$\chi^2 = 23,122$   $p < 0,01$

Tabla X. Anatomía Patológica de la lesión inicial

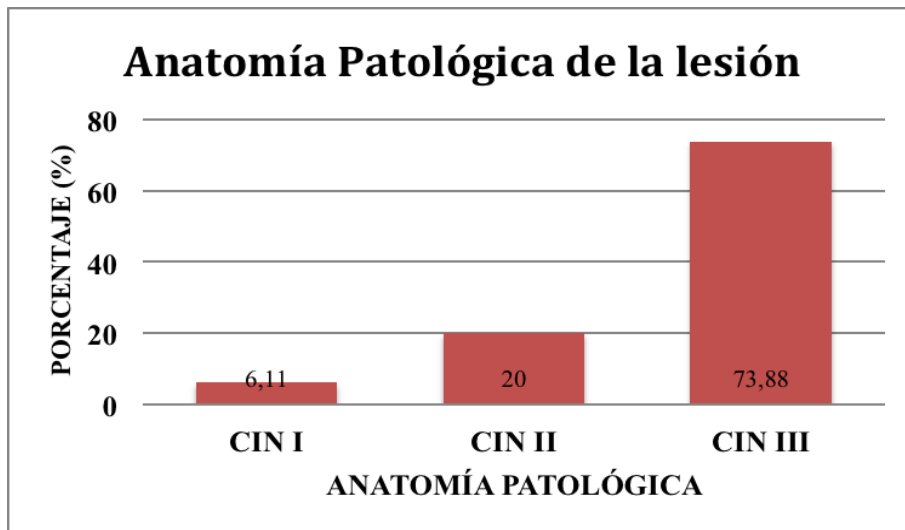


Gráfico 10. Resultados histológicos cervicales

El Estudio anatomopatológico refleja la presencia de lesiones de alto grado en la mayoría de las pacientes, sumando CIN II y CIN III en mas del 90% de los resultados. El tratamiento escisional va dirigido a pacientes con sospecha de lesiones de alto grado.

5.1.11. Localización de la lesión

LOCALIZACIÓN	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
LABIO ANTERIOR	82	45,55
LABIO POSTERIOR	12	6,66
PERIORIFICAL	86	47,77
TOTAL = 180		PNS

Tabla XI. Localización inicial de la lesión

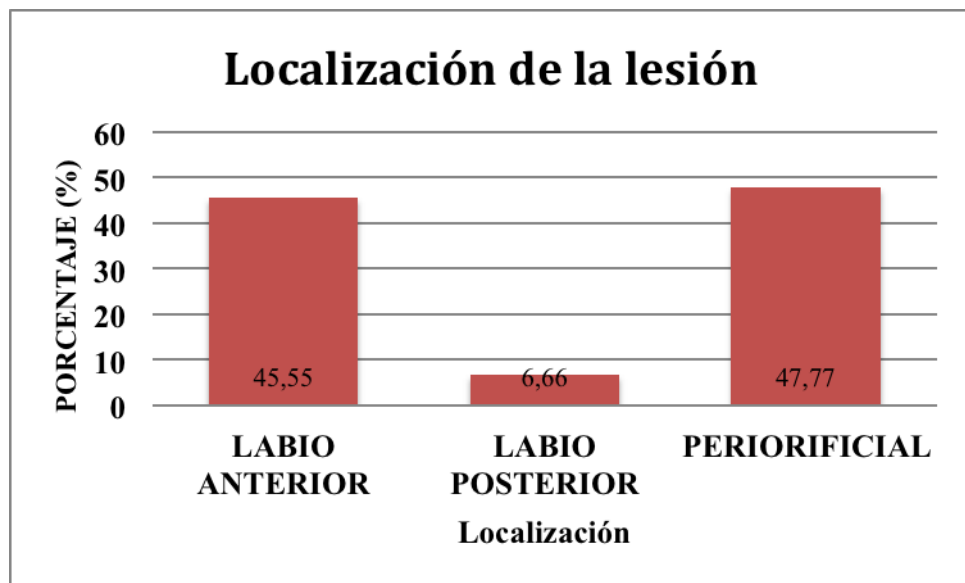


Gráfico 11. Localización de la Lesión

La localización más frecuente es la periorifical con casi la mitad de la pacientes. Pero el pocentaje está casi igualado a la localización en labio anterior. No se obseva localización prerente de las lesiones iniciales

5.1.12. Tamaño de la lesión

TAMAÑO	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
LESIÓN 1/3	119	66,11
LESIÓN 2/3	59	32,77
TS	2	1,11
TOTAL = 180		$\chi^2 = 96,43$ P < 0,05

Tabla XII. Tamaño inicial de la lesión

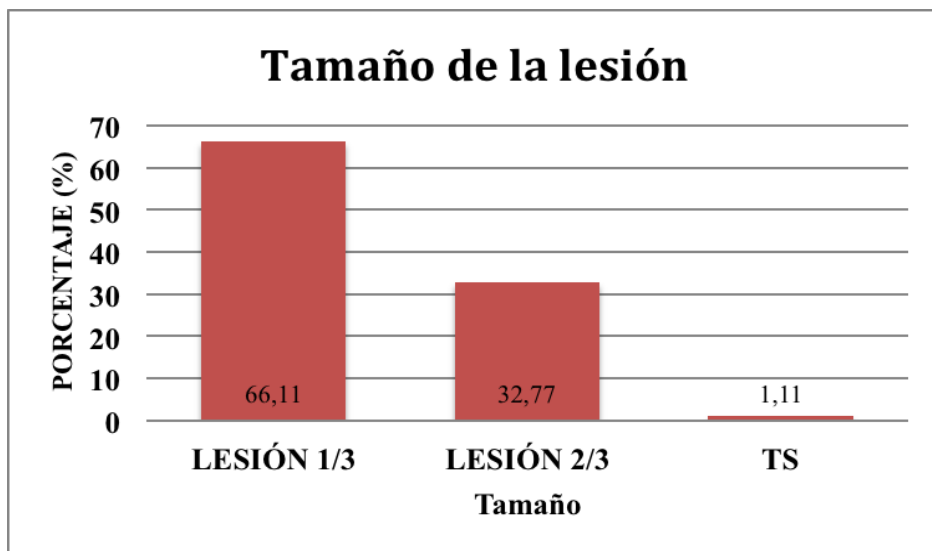


Gráfico 12. Tamaño de la lesión

El tamaño inicial de las lesiones en el 66% afecta a menos de la mitad de la superficie cervical, siendo el 32% afectaciones extensas en más de los 2/3 de la superficie



5.1.13. Tratamiento realizado

TRATAMIENTO	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
LLETZ	17	9,44
LASER	4	2,22
LLETZ-LASER	158	88,33
TOTAL = 180		p < 0,01

Tabla XIII. Tratamiento realizado

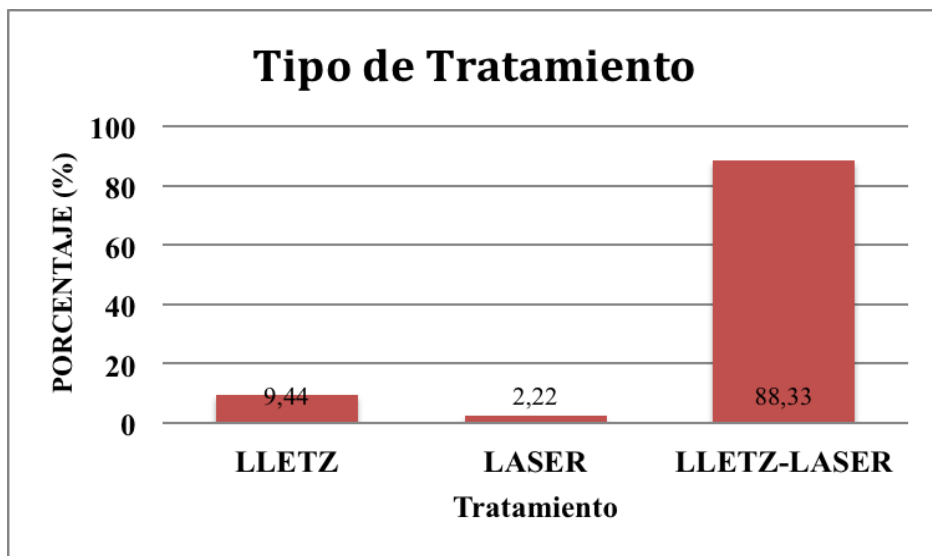


Gráfico 13. Tipo de Tratamiento

El tratamiento realizado es casi mayoritariamente Lletz para la extirpación de la lesión, seguida de Laser en el lecho de la exéresis. Esto permite garantizar márgenes libres y realizar la hemostasia adecuada.

5.1.14. Márgenes de la resección

MÁRGENES	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
< 4	7	3,88
4 a 5	89	49,44
5 a 6	84	46,66

TOTAL = 180 PNS

Tabla XIV. Tamaño de los márgenes de resección

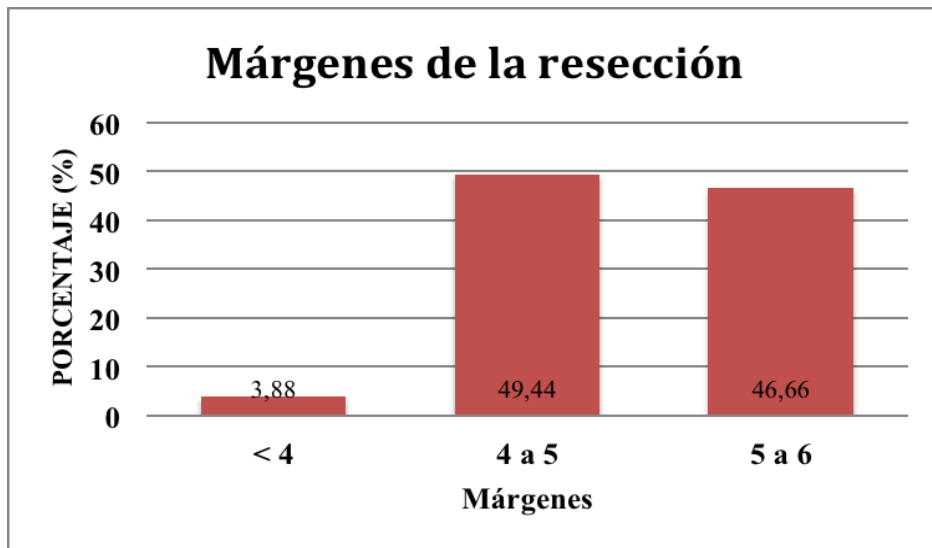


Gráfico 14. Márgenes de la resección

La mayoría de las resecciones tienen márgenes suficientes para garantizar la extirpación completa. Se garantizan márgenes en casi la mitad de los casos de 5 a 6 mm, gracias a la ampliación Laser que se aplica.

5.1.15. Penetración de la lesión en endocérvix

ENDOCÉRVIX	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
NO	142	78,88
SI	38	21,11

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 32,234 p < 0,001

Tabla XV. Penetración de la lesión inicial en endocérvix

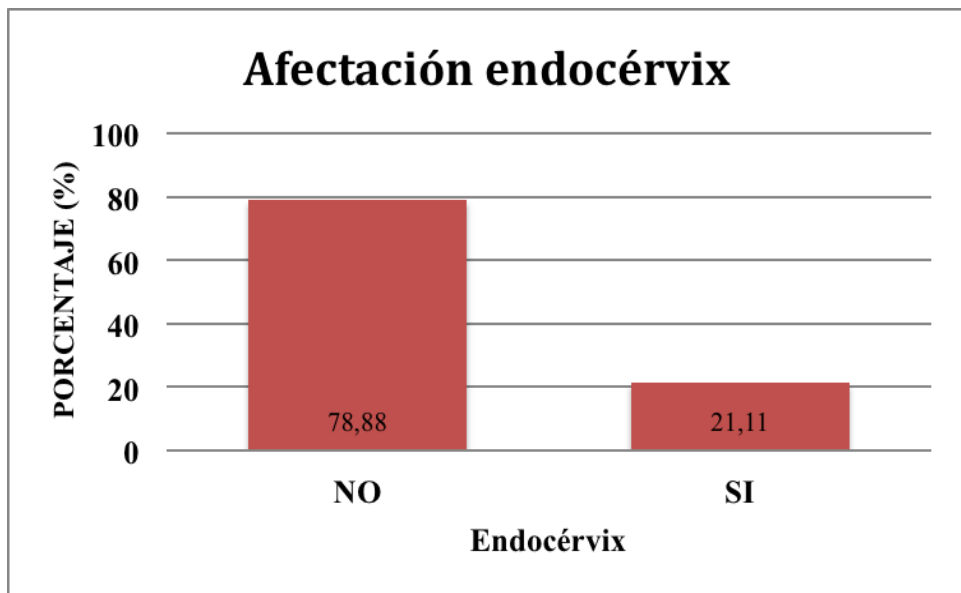


Gráfico 15. Afectación del endocérvix

La situación mas habitual es que no se afecte el endocérvix en la lesión inicial, esto se evidencia en un 78% de las pacientes. Las lesiones afectan fundamentalmente al exocérvix y una proporción del 21% penetran en endocérvix.

## 5.2. RESULTADOS A LOS 6 MESES

### 5.2.1. Citología

CITOLOGÍA 6 MESES	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
NEGATIVA	171	95
L-SIL	7	3,88
H-SIL	7	1,11

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 27,34   p < 0,001

Tabla XVI. Citología a los 6 meses

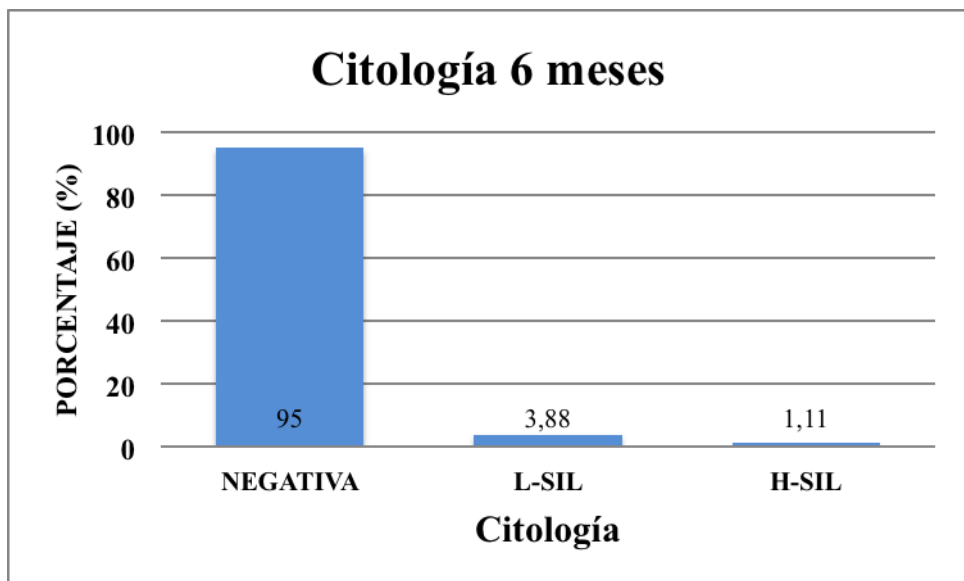


Gráfico 16. Citología a los 6 meses

La citología a los 6 meses Negativa en el 95% de las pacientes, habiéndose cumplido el objetivo de eliminación de la lesión. Esto descarta la situación de persistencia de la lesión en estas pacientes.

5.2.2. Imagen Colposcópica vascular a los 6 meses

VASOS 6 MESES	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
TIPO I	36	20
TIPO II	126	70
TIPO III	18	10
TIPO IV	0	0

TOTAL = 180

$\chi^2 = 19,23$   $p < 0,001$

Tabla XVII. Patrón vascular colposcópico a los 6 meses

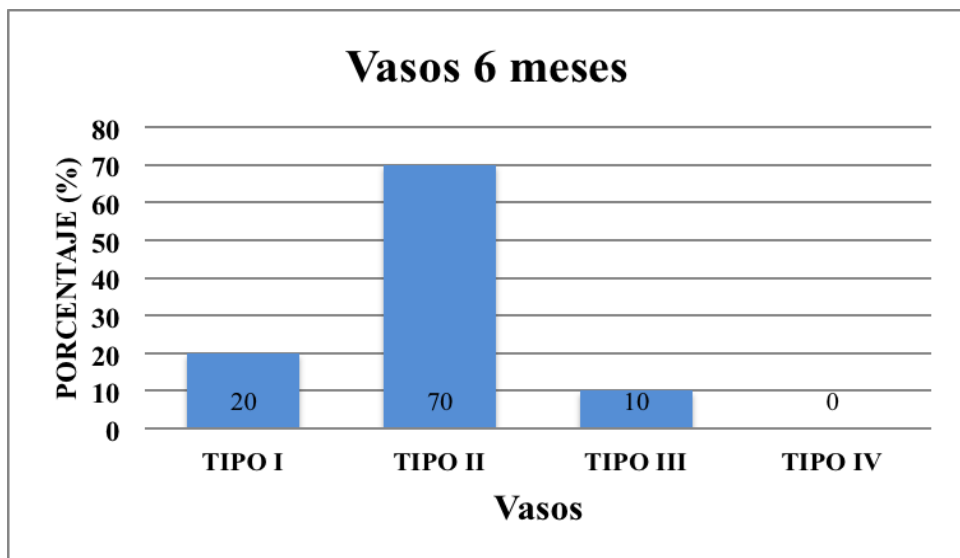


Gráfico 17. Valoración colposcópica vascular a los 6 meses

A los 6 meses sigue predominando la imagen vasculat Tipo II con el 70% de las pacientes. En la clasificación de Mateu-Aragónés (1981) los vasos TIPO II, corresponden a un patrón vascular aumentado, con una imagen vascular de Colpitis. Los TIPO I normal en un 20% con vasos de características normales, red capilar fina arboriforme

5.2.3. Hallazgos colposcópicos a los 6 meses

<b>COLPOSCOPIA 6 MESES</b>	<b>FRECUENCIA ABSOLUTA</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
<b>COLPITIS</b>	149	82,77
<b>MOSAICO</b>	13	7,22
<b>ACETO +</b>	6	3,33
<b>PUNTEADO</b>	1	0,55
<b>ZT</b>	11	6,11
TOTAL = 180		X <sup>2</sup> = 21,9      p < 0,001

Tabla XVIII. Colposcopia a los 6 meses

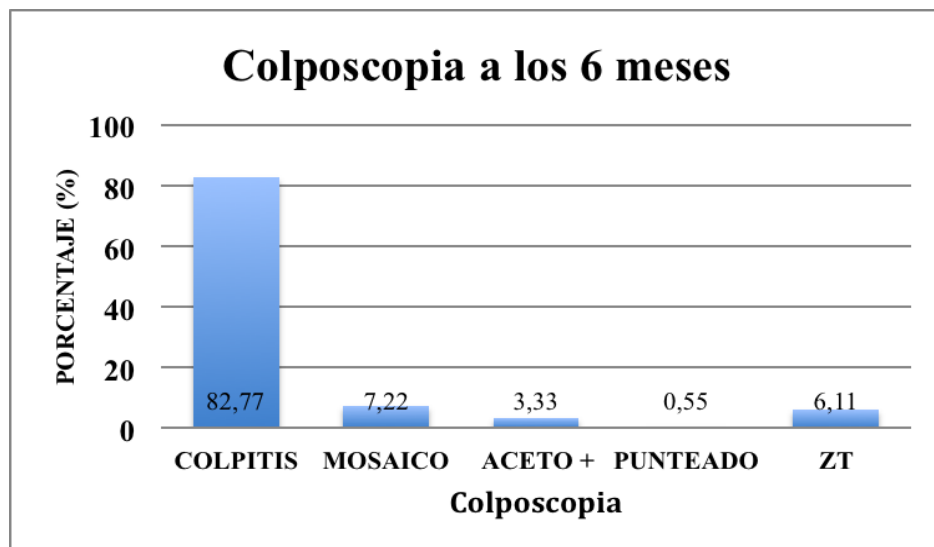


Gráfico 18. Hallazgos colposcópicos a los 6 meses

Ajustandose a la Clasificación de Barcelona 1992 a los 6 meses la imagen mayoritariamente observada es la colpitis vírica que se observa en el 82%. Mosaico y epitelio acetoblanco es mínimo.

5.2.4. Tamaño de la lesión a los 6 meses

TAMAÑO LESIÓN 6 MESES	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
< 3	7	77,77
3 a 5	2	22,22

TOTAL = 9

Todos de localización periorificial

Tabla XIX. Tamaño de la lesión a los 6 meses

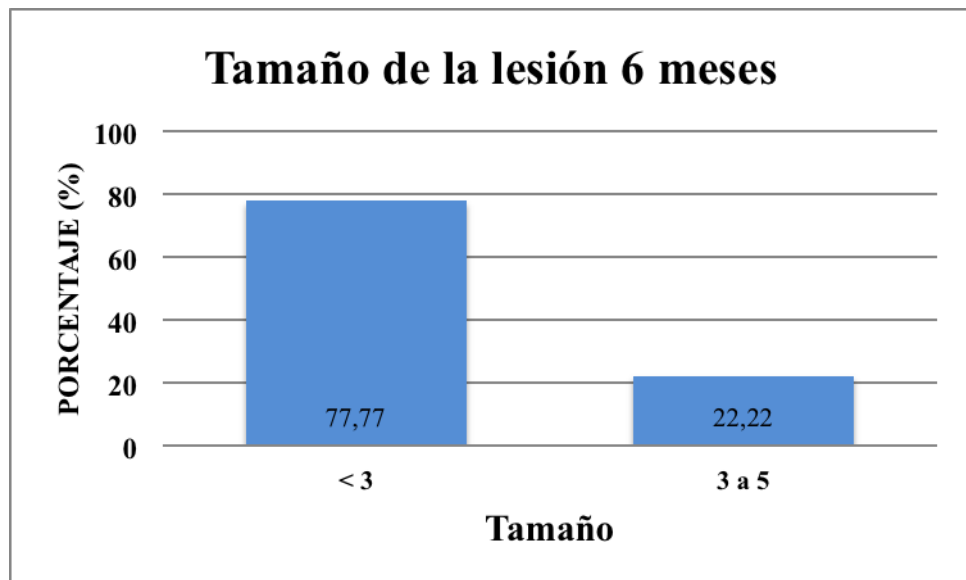


Gráfico 19. Tamaño de la lesión a los 6 meses

Sólo se identificaron 9 pacientes de las 180 del estudio que presentaban lesión a los 6 meses, siendo todas las lesiones residuales de localización periorificial y de tamaño < a 3 mm en el 77%.

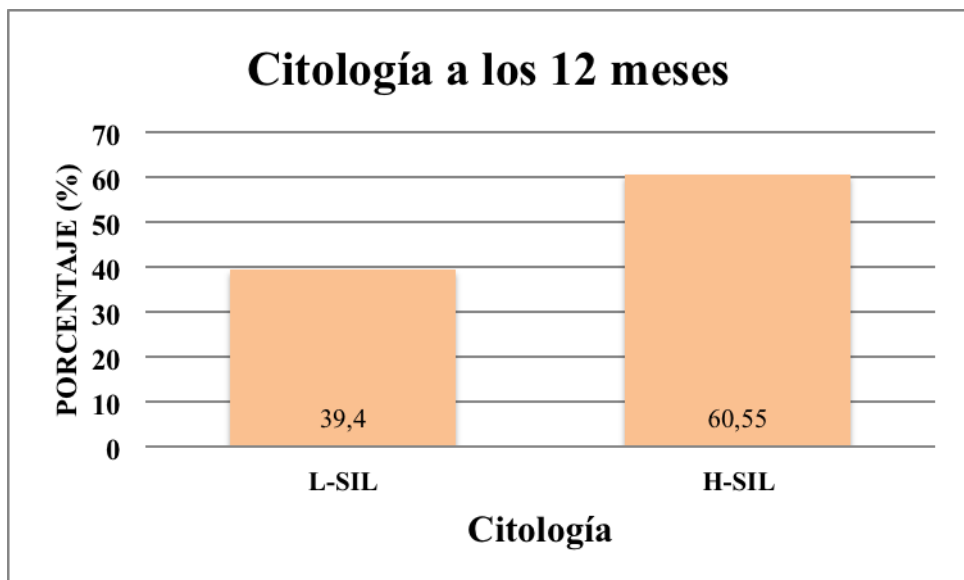
### 5.3. RESULTADOS A LOS 12 MESES

#### 5.3.1. Resultados de la citología a los 12 meses

CITOLOGÍA 12 MESES	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
L-SIL	71	39,4
H-SIL	109	60,55

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 27,3    p < 0,05

Tabla XX. Resultados citología a los 12 meses



Gráfica 20. Citología a los 12 meses

En la evaluación citológica a los 12 meses del tratamiento detectó en un 60% de las pacientes recidivadas una lesión de alto grado (H-SIL). Lesiones de bajo grado (L-SIL) se observaron en casi el 40% de las mujeres.

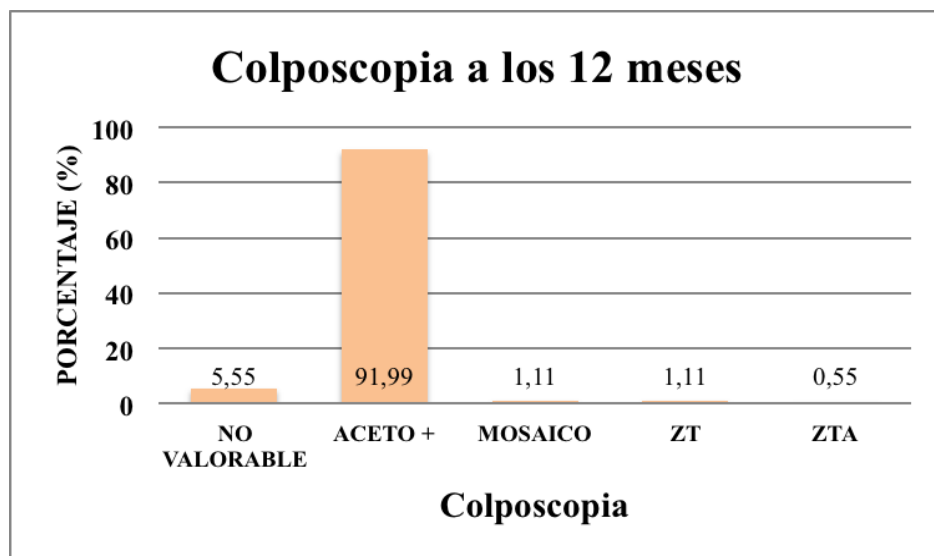


5.3.2. Valoración colposcópica a los 12 meses

<b>COLPOSCOPIA 12 MESES</b>	<b>FRECUENCIA ABSOLUTA</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
<b>NO VALORABLE</b>	10	5,55
<b>ACETO +</b>	165	91,99
<b>MOSAICO</b>	2	1,11
<b>ZT</b>	2	1,11
<b>ZTA</b>	1	0,55

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 37,6 p < 0,001

Tabla XXI. Colposcopia a los 12 meses



Gráfica 21. Colposcopia a los 12 meses

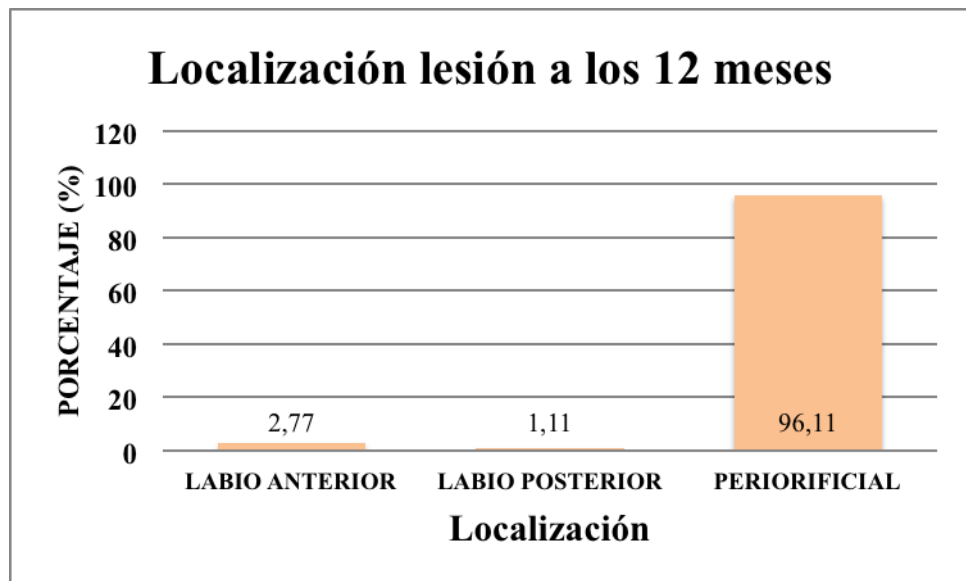
Se utilizó la Clasificación de Barcelona 1992 para definir las lesiones colposcópicas de las pacientes a los 12 meses. Las lesiones acetoblancas se evidencian en el 90% de las mujeres. La colposcopia fue no valorable en el 5,55%. El resto en proporciones poco significativas.

5.3.3. Localización de la lesión a los 12 meses del tratamiento

<b>LOCALIZACIÓN LESIÓN 12 MESES</b>	<b>FRECUENCIA ABSOLUTA</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
<b>LABIO ANTERIOR</b>	5	2,77
<b>LABIO POSTERIOR</b>	2	1,11
<b>PERIORIFICAL</b>	173	96,11

TOTAL = 180 X<sup>2</sup> = 21,23    p < 0,001

Tabla XXII. Localización de las lesiones a los 12 meses



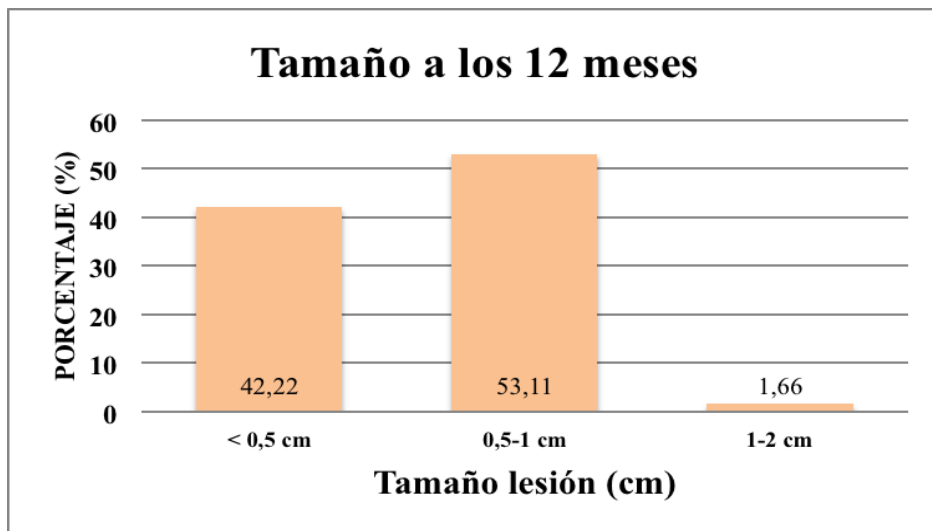
Gráfica 22. Localización de la lesión a los 12 meses

Cuando se analiza la localización de la lesión a los 12 meses se encuentra que esta se halla casi exclusivamente a nivel periorifical, con el 96%. Siendo las otras dos localizaciones excepcionales.

5.3.4. Tamaño de la lesión a los 12 meses

TAMAÑO 12 MESES	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
< 0,5 cm	76	42,22
0,5-1 cm	101	53,11
1-2 cm	3	1,66
TOTAL = 180		$\chi^2 = 45,23$ p < 0,05

Tabla XXIII. Tamaño de la lesión a los 12 meses



Gráfica 23. Tamaño de la Lesión a los 12 meses

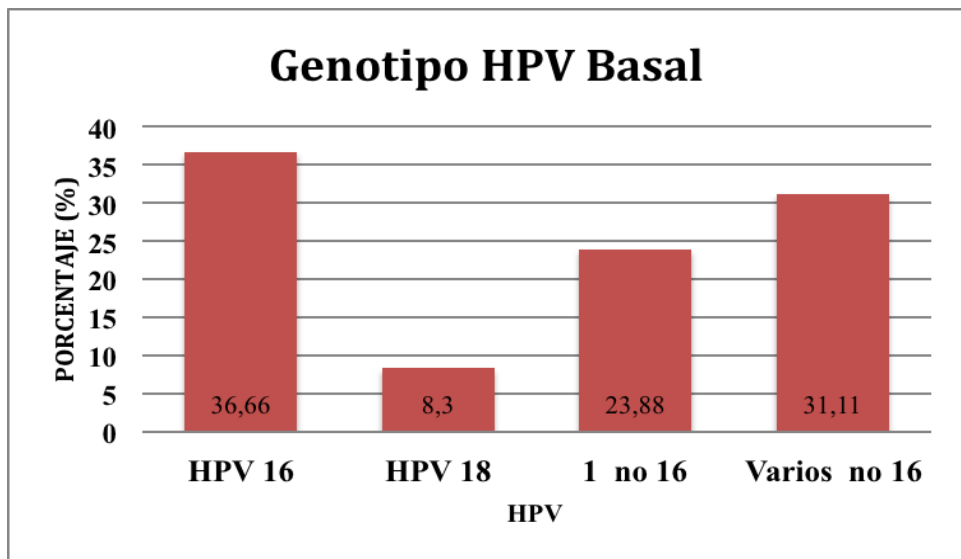
A los 12 meses predominan las lesiones de pequeño tamaño, siendo casi en su totalidad inferiores a 1 cm. El 50% de las lesiones se encuentran entre 0,5 y 1 cm. La valoración del tamaño se realiza en la visión colposcópica.

#### 5.4. ESTUDIO GENOTIPO VIRAL

##### 5.4.1. Genotipo viral HPV al inicio del estudio

VIRUS	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
HPV 16	66	36,66
HPV 18	15	8,3
1 no 16	43	23,88
Varios no 16	56	31,11
TOTAL = 180		PNS

Tabla XXIV. Genotipos VPH inicio



Gráfica 24. Genotipado viral basal

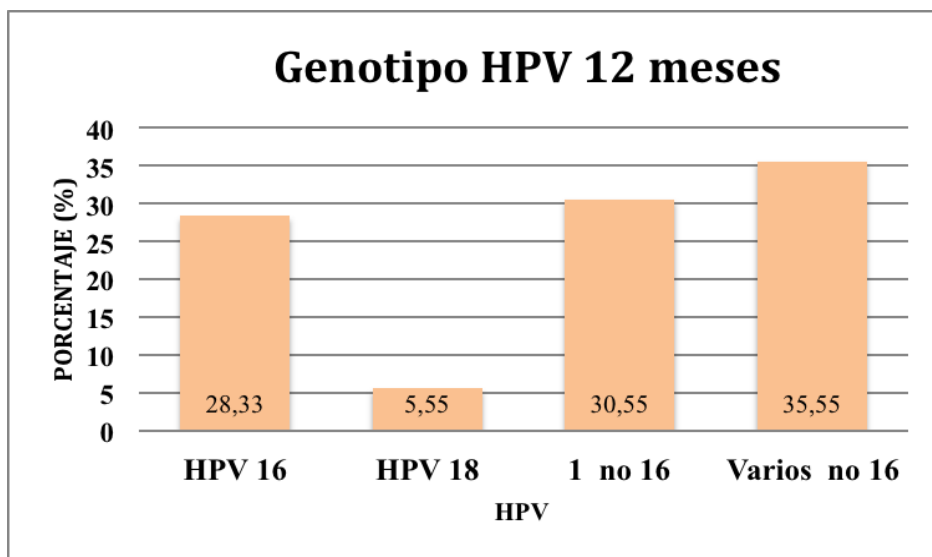
El genotipo más frecuente es el HPV 16 con el 36%. El HPV 18 es poco prevalente en nuestro estudio. La asociación de varios serotipos no 16 tienen alta prevalencia en el 31%.

5.4.2. Genotipo viral a los 12 meses

VIRUS	FRECUENCIA ABSOLUTA	PORCENTAJE (%)
HPV 16	51	28,33
HPV 18	10	5,55
1 no 16	55	30,55
Varios no 16	64	35,55

TOTAL = 180 PNS

Tabla XXV. Genotipos HPV a los 12 meses



Gráfica 25. Genotipos Virales HPV a los 12 meses

El genotipo único mas frecuente es el HPV 16 con el 28% del total. La asociación de varios genotipos no 16 es el modelo más prevalente, con el 35%. En nuestro estudio el HPV 18 tuvo poca representación, con sólo el 5%.

## 5.5. ESTUDIO MULTIVARIANTE

Una vez descritas las variables de estudio al inicio, a los 6 meses y a los 12 meses, se procede a estudiar la importancia de estos factores como indicadores predisponentes o protectores de recurrencia de las lesiones a los 12 meses.

Se analizaron a los 12 meses las 180 pacientes del estudio que presentaban en ese momento lesión cervical, aunque en el estudio inicial tras el tratamiento no tenían lesiones objetivables. La extirpación había sido completa con márgenes libres.

### 5.5.1. Análisis multivariante del genotipo viral

VARIABLES	OR	95% CI	VALOR p
HPV 16	3,22	0,78-29,33	p < 0,05
HPV 18	1,2	0,99-6,3	0,844
1 HPV no 16	3,1	1,22-6,25	0,164
Varios HPV no 16	175	19,54-423,10	p < 0,05

Tabla XXVI. Análisis multivariante del genotipo HPV

Se encuentra como factor de riesgo, con carácter significativo, para la presencia de lesión a los 12 meses, la existencia de infección por virus papiloma genotipo HPV 16.

Igualmente resulta significativo para la previsión de lesiones a los 12 meses, la presencia de infecciones multivirales, aunque no participe en HPV 16.

La presencia de HPV 18 u otro serotipo único diferente al 16 no resultó estadísticamente significativo como factor de recurrencia.

#### 5.5.2.. Análisis multivariante. Características de la población

<b>VARIABLES</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>EDAD</b>	37,67	23,56-230,1	p < 0,05
<b>RESIDENCIA</b>	23,12	12,2-22,11	0,122
<b>TRABAJO</b>	12,15	0,14-6,00	1,02
<b>ANTICONCEPTIVOS</b>	196	23,10-978,0	p < 0,05
<b>TABACO</b>	234,82	19,21-1012	p < 0,05
<b>VPH</b>	293	15,03-534	p < 0,05

Tabla XXVII. Análisis multivariante de los datos descriptivos

Se ha analizado los cofactores dependiente de las mujeres para determinar que factores pueden influir en la recurrencia a los 12 meses de las lesiones cervicales, no encontrándose diferencia significativa según el lugar de residencia rural o urbana, ni la situación laboral de la mujer.

Resultó significativo, y por lo tanto interviene como factor de riesgo de recurrencia, la edad de la mujer, el uso de anticonceptivos orales, el hábito tabáquico y la positividad para el virus del papiloma.

Serían factores de riesgo: mujer de mediana edad, tomadora de anticonceptivos, fumadora y portadora persistente del virus del HPV.

### 5.5.3. Análisis multivariante de la modalidad del tratamiento

Hoy en día los tratamientos conservadores como modalidad de tratamiento de las lesiones cervicales se consideran de elección. Los tratameintos escisionales están

indicados en las lesiones de alto grado, de mayor o menor cuantía dependiendo de la gravedad y magnitud de la lesión.

Se ha analizado si el tipo de tratamiento realizado en las pacientes puede favorecer la recurencia o actuar como factor protector de la misma.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>LLETZ</b>	144	22,31-210	p < 0,05
<b>LASER</b>	201	36,22-378	p < 0,05
<b>LLETZ-LASER</b>	5,22	0,45-14,11	0,584

Tabla XXVIII. Análisis multivariante del tratamiento escisional

Las mujeres tratadas exclusivamente con Lletz o con Laser tienen un riesgo significativamente estadístico de recidiva de la lesión cervical.



Mientras que en las mujeres en las que se combinaron ambos tratamientos, escisional con asa seguido de Laser en el lecho de excision presentaron menor riesgo de recidiva. Permitió también ampliar los márgenes de resección. Se considera este tratamiento de elección ya que actúa como factor protector de recurrencia.

#### 5.5.4. Análisis multivariante localización de la lesión

Se ha analizado si determinadas localizaciones de la lesión pueden contribuir a favorecer la recurrencia de las mismas.

Se han dividido en tres localizaciones: en labio anterior de cuello, en labio posterior y a nivel periorificial, analizando su contribución en

<b>LOCALIZACIÓN LESIÓN</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>LABIO ANTERIOR</b>	3,21	0,25-2,17	0,953
<b>LABIO POSTERIOR</b>	1,2	0,86-8,03	0,976
<b>PERIORIFICAL</b>	62	16,89-294,10	p < 0,05

términos de recurrencia.

Tabla XXIX. Tabla de recurrencia de las lesiones según su localización

La localización en labio anterior de cuello o posterior no influyeron en la recurrencia de las lesiones.

La localización periorifical se relacionó de modo estadísticamente significativo con la recurrencia de las lesiones. Cuando estas aparecen es mas frecuente encontrarlas también a nivel periorifical.

#### 5.5.5. Análisis multivariante según el tamaño de la lesión

En la lesiones inicialmente tratadas predominan las lesiones de menor tamaño (1/3). Analizamos la contribucción del tamaño de la lesión inicial en la recidiva posterior.

<b>TAMAÑO LESIÓN</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>LESIÓN 1/3</b>	1,48	0,54-1,78	0,867
<b>LESIÓN 2/3</b>	1,2	0,39-2,17	0,324
<b>LESIÓN TOTAL</b>	1,98	1,22-3,85	0,292

Tabla XXX. Análisis multivariante del tamaño de la lesión

El tamaño de la lesión inicial no se considera estadísticamente significativo para la recurrencia de las lesiones. El tamaño de las lesiones no influye en la recurrencia.

5.5.6. Análisis multivariante de las características colposcópicas de la lesión

Se realizó colposcopia a todas la pacientes en la primera visita, previo al tratamiento. Se analizó la capacidad de predecir recidivas de cada

uno de los hallazgos colposcópicos. La imagen mas frecuente fue la lesión acetoblanca.

<b>COLPOSCOPIA</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>ACETO POSITIVO</b>	2,62	1,13-2,25	0,304
<b>MOSAICO</b>	0,91	0,35-3,12	0,232
<b>PUNTEADO</b>	2,98	1,29-4,12	0,327
<b>ZT</b>	0,74	1,14-2,39	0,538
<b>ZTA</b>	1,02	0,91-3,98	0,159

Tabla XXXI. Análisis multivariante de la colposcopia

Se clasificaron los hallazgos colposcópicos, según la zona de transformación típica, atípica, la presencia de epitelio acetoblanco o imágenes de mosaico y punteado. Se analizó si alguna de esas imágenes podía determinar mayor riesgo de recidiva. No se encontraron diferencias significativas en términos de recidiva de cualquiera de la imágenes. Nos sirve para determinar la gravedad de la lesión, dirigir el tratamiento, no como factor predictor de revidiva.

### 5.5.7. Análisis multivariante de las características vasculares

Las alteraciones vasculares, son un marcador de gravedad de las lesiones y pueden estar asociadas a la presencia de procesos invasivos cervicales.

La valoración vascular se realiza en el tiempo de la colposcopia mediante al utilización del filtro verde.

La alteración vascular mas frecuente encontrada fueron los vasos tipo II (Mateu-Aragones, 1981).

<b>VASOS</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>TIPO I</b>	0,65	0,77-11,99	0,161
<b>TIPO II</b>	91,2	25,3-95,23	p < 0,05
<b>TIPO III</b>	5,78	1,93-4,22	0,304
<b>TIPO IV</b>	0,69	0,52-2,81	0,611

Tabla XXXII. Análisis de la imagen colposcópica de los vasos

Las alteraciones vasculares nos informarán sobre la gravedad de las lesiones y la presencia de Vasos Tipo II se convierte en un factor estadísticamente significativo de riesgo de recurrencia de las lesiones. Patrón vascular aumentado con normal red con imagen vascular de colpitis.

5.5.8. Análisis multivariante de los márgenes de resección

<b>MÁRGENES</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>VALOR p</b>
<b>&lt; 4</b>	2,89	0,31-3,12	0,296
<b>4 a 5</b>	1,73	1,19-4,38	0,121
<b>6 a 7</b>	2,6	1,35-3,79	0,618

Tabla XXXIII. Márgenes de resección

El tamaño de los márgenes de resección no fueron factores estadísticamente significativos de riesgo de recidiva. Si la resección completa de la lesión son el margen negativo, no el tamaño de dicho margen.

## 6. DISCUSIÓN

El cáncer de cérvix se puede prevenir mediante los controles de citología, Colposcopia y biopsia. Los tratamientos conservadores del CIN 2 y CIN 3 mediante LLETZ en la mayoría los casos, Laser o conización estandar, constituyen el tratamiento adecuado para estos procesos. (204) (205)

El riesgo de recurrencia de estas lesiones después del tratamiento de extirpación completa de la lesión, con márgenes libres o con destrucción complementaria con Laser, llevaría a la resolución completa del proceso, pero los controles posteriores postratamiento determina que pueden aparecer recurrencias, en porcentajes que se han descrito y oscilan en un rango del 5 al 35% (206). Esta circunstancia hace que exista una marcada incertidumbre sobre cuales son las causas o factores que pueden dar lugar a la aparición de estas recurrencias.

No existen muchos estudios amplios que valoren estas circunstancias, que pudieran aportar las causas que favorecen las recurrencias. La Universidad de Cracovia realiza un estudio de 115 mujeres tratadas con el procedimiento de LEEP por presentar Lesiones intraepiteliales de alto grado. (205) En los casos de recurrencia, analizan la lesión y la enfermedad residual de la displasia intraepitelial. En un periodo de seguimiento durante 5 años, realizando citología y Colposcopia cada 3 meses, durante los 2 primeros años y durante 6 meses en los 3 siguientes, los casos de recurrencia el diagnostico se realiza dentro de los 6 primeros meses. Llegan a la conclusión de que cuando existen lesiones cervicales

que penetran en el endocérvix, el porcentaje de enfermedad residual y recurrencias es mayor que cuando las lesiones están localizadas solo en el exocérvix. Los márgenes libres se consideran un factor importante en el pronóstico. La mayoría de las recidivas se diagnóstica dentro del primer año después del procedimiento inicial y no depende de la participación de los márgenes, circunstancia que se ha comprobado en el grupo de pacientes estudiado por nosotros. Se sabe que en caso de tejido residual postratamiento, si se controlan citológica y colposcopicamente, en los siguientes controles puede haber desaparecido espontáneamente la lesión.

Se han analizado varios factores asociados, con la finalidad de valorar la posibilidad de favorecer la recurrencia y así ZIVADINOVIC (206) valora un parámetro a estudiar: la edad de las pacientes tratadas por neoplasias intraepiteliales cervicales. El número de mujeres jóvenes ha ido en aumento, por lo que considera la edad muy importante para definir a las pacientes con alto riesgo de recaída. En las mujeres jóvenes, es estadísticamente significativo el número de recurrencias en lesiones de bajo grado, mujeres menores de 29 años. Sin embargo, el número de cigarrillos que consumían no mostro diferencias significativas. Estableciendo la conclusión de que la persistencia del VPH, el tabaquismo asociado a la infección por VPH y la edad más avanzada se demostró que tienen significación estadística para la recurrencia. La paridad, el uso de anticonceptivos orales o la infección de clamidias y el tabaquismo como factores etiológicos independientes no se asociaron con la recaída del CIN. Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos en nuestro estudio, ya que un porcentaje de las pacientes del grupo estudiado eran fumadoras en más del 50 %, al igual que ocurría con la edad ya que la gran mayoría se encontraban el grupo integrante de los 40 años.

La persistencia del VPH después del tratamiento, se considera como un factor primordial para la aparición de recurrencia, pues se ha establecido la relación entre la persistencia del VPH y la aparición del CIN 2 o más. (205)

Se ha considerado que la persistencia del VPH es necesaria (207) para la aparición de recurrencias, pero se considera más importante y con más riesgo de recurrencia cuando la persistencia del VPH es el 16 y a pesar de que el cono realizado tenga los márgenes libres. En las pacientes valoradas por nosotros también hemos podido comprobar por un lado la persistencia frecuente del VPH 16 y por otra parte la asociación de varios genotipos en las pacientes que presentaron recurrencias.

Aunque las estrategias eficaces para la prevención del cáncer del cuello uterino existen (208), esta enfermedad sigue siendo un serio problema de salud en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. Hoy en día el papel del virus del papiloma como factor causal, de la aparición del cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras esta bien establecida y los programas de prevención contra el cáncer cervical, se basa en detección de la neoplasia cervical intraepitelial ( CIN). El VPH y los mecanismos de evasión inmunológico, que inhibe la detección del virus por el huésped, puede resultar en una infección crónica persistente e irrevocable que comprometen a las defensas del pacientes. La conización es la técnica quirúrgica más utilizada para el tratamiento del CIN de alto grado, ya que hace posible excluir que exista neoplasia invasora, evaluar los márgenes de resección y de preservar la fertilidad. Sin embargo, varios factores han sido considerados como indicadores de enfermedad residual. Se considera como elemento significativo la persistencia del VPH y sobre todo el genotipo 16, asociado a la edad y otros factores como el tabaco y los anticonceptivos como factores de recurrencia. Estas circunstancias, ya



han sido consideradas más arriba, y pueden considerarse como factores primordiales de la recurrencia postratamiento.

También se ha valorado (209) el genotipo del VPH en la enfermedad residual / recurrencia y la variedad del genotipo del VPH antes de realizar la conización, con la finalidad de observar si las recurrencias se producen ante una determinado genotipo de VPH, así mismo si la presencia de un solo genotipo o la presencia de varios genotipos favorecen la posibilidad de que aparezcan recurrencias. Para valorar esta situación es fundamental que la extirpación del cono realizado con LLETZ tenga los márgenes libres. Encuentran que el 91,1% antes del tratamiento presentaban VPH de alto riesgo y el 27,0% presentaban infección múltiple. El VPH 16 es más prevalente con el 28,9%, seguido por el VPH 52 con 20,0%, el VPH 33 con 19,1%, el VPH 18 con el 18,1% y el VPH 58. El 26,3% en el control de 2 años presentaron recurrencias. Concluye en su estudio que la presencia del VPH previa a la realización de la conización de los genotipos 16, 18, 33 y 45, así como los genotipos múltiples, se asocia con imágenes residuales o persistente después de la conización con LLETZ.

Jeong (210) establece que la monitorización de las pacientes mediante citología y determinación de VPH a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses, después del tratamiento de lesiones intraepiteliales de alto grado de cuello, es muy eficaz para establecer las recurrencias después del tratamiento. Observó un 17,9% de recidivas en un periodo de 24 meses, considerando las pacientes tratadas y seguidas con estas técnicas, están perfectamente controladas y en el caso de producirse recurrencias se pueden detectar con rapidez.

AERSSENS (211) establece criterios similares a los citados anteriormente para controlar la posible de recurrencias. Realiza los controles a las 6 semanas, seis meses un año y 2 años, mediante citología, Colposcopia, presencia o ausencia de VPH y en ocasiones también haciendo correlación con la histología. Encuentra 9% de pacientes que desarrolla enfermedad residual / recurrencia comenzando la aparición de recurrencias a los 6 semanas. Establece además que la determinación de VPH incrementa la sensibilidad en los 6 primeros meses.

Se han estudiado (212) las alteraciones de varios biomarcadores relacionados con el VPH a los 6 meses después del tratamiento y como estos, se relacionan con diversos factores de riesgo y las características individuales y su posible relación en la predicción de fracaso del tratamiento que se realizó. El control se realizó con citología en fase líquida, genotipo de VPH, secuencia de ácido nucleico basada en amplificación, citometría de flujo y p16 inmunotinción. En un grupo de 190 pacientes todos los marcadores fueron significativamente superiores en las tasas de negatividad después del tratamiento en comparación a los previos al tratamiento. El análisis multivariante demostró que el uso del preservativo después del tratamiento reduce significativamente las tasas de VPH de alto riesgo en comparación con el no uso. La sensibilidad y especificidad para todos los de alto riesgo, en las pruebas de ADN del VPH fueron 0,5/0,62 respectivamente. Los valores correspondientes para el análisis de DNA para el tipo de 16 o 18 eran 0,5/0,92, por NASBA 0,5/0,94, para la citometría de flujo de 0,5/0,85 y p16 0,25/0,93. Estos datos sugieren, que el tratamiento del CIN reduce la positividad para todos los marcadores biológicos relacionados con el VPH y el uso de preservativo reduce las tasas de positividad del VPH. Se requieren más casos de fracasos del tratamiento, con la finalidad de precisar si las distintas combinaciones de biomarcadores relacionados con el VPH,

podría mejorar la precisión de seguimiento, posiblemente en la forma de un sistema de puntuación que podría permitir adaptar la vigilancia post-tratamiento.

Se ha establecido (213) que los porcentajes de recurrencia en un grupo de pacientes evaluadas por su grupo y controladas por Colposcopia y con biopsias, según la situación clínica, detecta un 17,7% de recurrencias en pacientes con márgenes positivos. Realizan los controles de VPH a los 6-12 meses después de realizar en tratamiento con LLETZ. Se recomienda hacer los controles con citología y determinación de VPH. Se considera que los márgenes positivos es un factor de riesgo importante que favorece el desarrollo de recurrencias. Controlando un grupo de 94 pacientes portadoras de CIN 2-3, y tratadas mediante conización con LLETZ, se encuentra un 29% de pacientes tenían los márgenes comprometidos con persistencia del VPH. Así mismo, a los dos factores citados anteriormente, considera factores que favorecen la recurrencia el tabaco y la edad, factores que ya han sido citados y parece que existe unanimidad como elementos que favorecen la recurrencia (214).

Así mismo se ha establecido (215) que extirpación incompleta del cono mediante Lletz se asocia a un incremento de recurrencias, que oscila entre el 7 - 85%, pudiendo evolucionar en ocasiones a procesos invasivo. Puede ocurrir en ocasiones que cuando los márgenes están libres de enfermedad pueden aparecer recurrencias (216), por lo que considera conveniente realizar controles post-tratamiento para detectar la aparición de nuevas lesiones. El porcentaje de recurrencias que encuentra en su estudio es del 9,5%. Como se puede ver, el porcentaje de recurrencia según los distintos autores es muy variable. En el estudio de LINDEQUE (217) los porcentajes alcanzan el 15%, mientras que otro estudio (218) determinan 10,2% en pacientes con HSIL controlando a las pacientes

durante 17 meses. Pero volvemos a manifestar la oscilación tan marcada de los porcentajes comunicados (219). Uno de los factores que determinan la gran variabilidad de datos es el derivado del tratamiento, ya que la conización realizada mediante Lletz puede dar lugar a que la pieza de conización este artefactada por la corriente eléctrica del asa, todo ello depende de la intensidad con la que se utilice el LLETZ y las coagulaciones que se pudieran realizar para cohibir el sangrado de en el proceso quirúrgico.

Se ha investigado (220) la duración del intervalo desde el tratamiento con LLETZ hasta que aparece la recurrencia de las lesiones CIN 2 o 3. La recurrencia aparecen en el 36,4% de las pacientes con márgenes quirúrgicos positivos. Y en el 9,4% de las pacientes con márgenes negativos. Después del tratamiento la recurrencia aparece entre los 2 y 9 meses, cuando la presencia del VPH es positiva y márgenes positivos, y entre los 16 y 36 meses ante la presencia del VPH positivo y los márgenes quirúrgicos negativos. Este autor señala que la recurrencia en el grupo por el estudiado apareció a los 3 meses de realizar el tratamiento y solo el 45 % de las pacientes completaron un año sin que se les detectara recurrencias. Así mismo, manifiesta que las recurrencias aparecen en los 2 primeros años después de realizado el tratamiento.

Para STRANDER (221) las conclusiones son similares a las citadas anteriormente, señalando que las pacientes con márgenes libres puede desarrollar un recurrencia en los dos años siguientes, después de realizar el tratamiento y que el 76% puede presentar recidivas con lesiones de alto grado o lesiones invasoras.

Casi todos los estudios hacen referencia al tratamiento de las lesiones de alto grado pero hay pocos estudios que hagan referencia a la

aparición de lesiones de bajo grado. Así, si se tiene en cuenta (222) el riesgo de que aparezcan lesiones de alto grado CIN2 en mujeres con historia previa al tratamiento por neoplasia intraepitelial de cérvix, presentan riesgo de recurrencia después del tratamiento y de presentar CIN 2 o más detectando con frecuencia mediante citología y colposcopia con ASCUS o LSIL.

A pesar de los estudios descriptivos señalados en ninguno se estable cual puede ser la causa que favorezca la recurrencia de las lesiones con bordes libres. BIERKENS (223) refiere que las lesiones el cuello del útero, cáncer y lesiones precursoras, son el resultado de una infección permanente con virus del alto grado del papiloma humano. Los tipos y la acumulación de alteraciones genéticas del paciente, daría lugar a aberraciones cromosómicas. Los estudios epidemiológicos han demostrado riesgos variables de CIN2 o 3 y cáncer entre los diferentes tipos de HR-VPH. Los estudios de perfiles genómicos revelan una heterogeneidad significativa en los cromosomas, con aberraciones detectadas morfológicamente indistinguibles de CIN2-3, y sugerente de la variación del riesgo de cáncer. Lógicamente la presencia aberraciones cromosómicas producidas por la integración del virus en las células del huésped se debe considerar como un factor indiscutible de recurrencia, siempre que las alteraciones celulares persistan después del tratamiento.

La metilación aberrante (224) pudiera considerarse como un marcador útil de la aparición de la enfermedad recurrente. Aunque los estudios de los perfiles de los factores de riesgo que se han llevado a cabo para identificar marcadores biológicos, con la finalidad de predecir la historia natural de la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado, no han determinado suficientemente para apoyar el uso clínico de rutina de cualquier biomarcador. La utilización de estos marcadores, factores que

favorecerían las recurrencias, no serían de utilidad en estos momentos. Por lo tanto, el estudio del promotor de la mutación aberrante, que está implicado en el desarrollo y progresión del CIN III, con la finalidad de identificar marcadores asociados con el comportamiento biológico más agresivo, que podría ser utilizado, para reconocer a las mujeres que están en mayor riesgo de recurrencias. Se ha encontrado al menos en 1 de los ocho genes estudiados por hipermetilación en todas las muestras. Sin embargo, la recaída en el CIN se observó solo en los casos con hipermetilación de 3 o más de los 8 genes estudiados, lo que sugiere que la metilación aberrante puede jugar un papel y puede servir como un marcador útil en la recurrencia del CIN. Se ha señalado (225) que para que se produzca la persistencia de las lesiones de alto grado en el cuello uterino es necesaria una continua expresión del oncogén E7 del papilomavirus.

Con relación al tratamiento hay varios autores que señalan que el tratamiento con Laser CO<sub>2</sub> después de realizar la conización con LLETZ, reduce considerablemente los porcentajes de recurrencias.

La escisión electroquirúrgica de la zona de transformación (226) se ha asociado con relativas tasas de fracaso en el tratamiento. Realizando un estudio comparativo entre dos grupos de pacientes, en las que un grupo fueron tratadas con LLETZ seguido con vaporización con Laser CO<sub>2</sub> la base y las paredes del cráter y otro grupo en las que se realizó solo tratamiento con LLETZ. Los resultados fueron citología anormal recurrente 10,2% vs 5,5% y enfermedad residual histológica 21,4% vs 0%. Por lo que señala que la adición de la vaporización con Laser después del tratamiento con LLETZ puede mejorar el resultado de las mujeres con márgenes positivos e incluso las que tienen bordes negativos ya que amplían la zona de seguridad.

Para SARIAN (227) que no amplía el tratamiento con Laser, señala que la persistencia del VPH después del tratamiento con LLetz se asocia con lesiones residuales de riesgo y enfermedad recurrente y establece que el virus del papiloma persistente después del LLetz, asociado con el consumo de tabaco y con la edad y con las características de los márgenes, se pueden considerar factores de riesgo para la aparición de recurrencias.

En un grupo de pacientes en las que se estima la tasa de persistencia del VPH de alto riesgo (228), en la población tratada con Laser CO<sub>2</sub>, realizando conización en la neoplasias cervicales intraepiteliales de alto grado. Señalan que la tasa de eliminación del VPH después del tratamiento fue del 78,8% y establece como signos favorecedores de las recurrencias la participación de los márgenes y la persistencia del VPH, señalando que aunque el Laser CO<sub>2</sub> es capaz de alcanzar una baja tasa de recurrencia tras el tratamiento de las lesiones de alto grado, la conización no elimina por completo la infección por el VPH del cuello uterino, presentando un caso de persistencia de casa cinco pacientes tratados. Para este autor la persistencia en si misma representa un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad recurrente y constituye la base para introducir la prueba de VPH, incluso en el seguimiento de las pacientes tratadas con conización por Laser CO<sub>2</sub> de las lesiones de alto grado. En la pacientes estudiadas por nosotros realizando tratamiento combinado mediante LLetz y Laser CO<sub>2</sub> disminuye de forma marcada los porcentajes de recurrencias ya que con el Laser se amplían las zonas de seguridad en el exocérnix y en el endocérnix.

El riesgo de recurrencia después del tratamiento por escisión del CIN de alto grado puede aparecer en el tiempo. (229) No está claro cuantas citologías negativas se necesitan después del tratamiento y los resultados

del co-test para garantizar la seguridad adecuada frente a CIN 2 o más antes de volver a repetir las pruebas a intervalos prolongados. Establecen que en el estudio por el realizado a los 5 años la recurrencia de CIN 2 después de dos co-test negativos es de 1,5%, señalando que las mujeres con antecedentes de AGC-H / ASC-H / HSIL tienen un riesgo considerable de presentar recurrencias, aunque hay que tener en cuenta que para que se produzca se tiene que tener en cuenta los factores de riesgo de la paciente y sus características personales.

En contra de los que se ha citado más arriba (230), la detección de la transcripción E6/E7 mRNA no parece adecuado en corto plazo de seguimiento para detectar CIN2 de enfermedad residual después de la conización.

Se ha evaluado (231) la regresión y la progresión de las lesiones de bajo grado histológico en mujeres menores de 35 años con HPV positivo, señalando que la citología es un estándar para la detección de las lesiones de bajo grado y añade que el test de VPH no es importante para la detección de lesiones de bajo grado, pero que si sería conveniente para la predicción del riesgo de progresión de las lesiones, pero la positividad de VPH de alto riesgo en lesiones de bajo grado no puede indicar el tratamiento quirúrgico en mujeres menores de 35 años.

No se han encontrado estudios que valoren la posibilidad de recurrencias según las características del tamaño de las lesiones y su localización. No disponemos en la bibliografía artículos para comparar nuestros resultados, pero hemos visto que las recurrencias se originan habitualmente en la zona periorificial del cérvix donde habitualmente se localizan los VPH.



Después de la conización, con LLETZ y el tratamiento con Laser CO<sub>2</sub> se producen fenómenos reparativos, metaplásicos, que evolucionan en grados progresivos de maduración y diferenciación a partir de células de capas profundas y de reserva hasta conseguir la restitución estructural anatómica y funcional del cuello uterino. (232) Si las células que producen la reepitelización tienen el HPV sería motivo más que suficiente para que se iniciara el proceso de alteración celular. Para confirmar estos resultados habría que completarlos con estudios moleculares.

Recientemente se ha señalado (233) que los márgenes positivos en CIN 2-3 en la histología parece definir a una población de mayor riesgo de recurrencia de alto grado aunque la impresión colposcópica sea de bajo grado.

## 7. CONCLUSIONES

1. La recurrencia de las lesiones de alto grado del cuello uterino después del tratamiento se producen por factores generales y locales que favorecen la reactivación del epitelio del cuello uterino donde se encuentra localizado el Virus del Papiloma.
2. La edad a partir de los 40 años se considera factor de riesgo de singular interés, ya que con el aumento de la edad disminuye la respuesta inmune.
3. El hábito tabáquico favorece la persistencia y progresión de las lesiones, por alteración de la respuesta inmune local, por lo que las pacientes fumadoras tienen mayor riesgo de recurrencias después del tratamiento.
4. Los anticonceptivos hormonales puede considerarse un factor de riesgo para que se reproduzcan las lesiones del cuello uterino después del tratamiento.

5. La presencia del VPH 16 y la asociación de distintos genotipos de alto grado se puede considerar como factor que condiciona la recurrencia de las lesiones de alto grado del cérvix uterino.
  
6. La localización y el tamaño de las lesiones del cuello uterino, ocasionadas por el VPH, no se consideran factores que puedan condicionar la recurrencia de las lesiones después del tratamiento.
  
7. La recidiva de las lesiones de alto grado del cuello uterino se produce en la zona periorificial, como consecuencia de la persistencia de los virus en las células de las capas profundas y favorecidas por la maduración y diferenciación celular que se produce como consecuencia del tratamiento realizado.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Incidence/mortality data: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0.
2. Press release 223; Diciembre 2013. IARC.
3. Ciuffo G. Innesso positivo con filtrado di verrucae volgare- Ital Mai Venerol 1907;48:12-15.
4. M'Fadyean J, Hobday F. Note on the experimental "transmission warts in the dog. J Comp Pathol Ther 1898;11:341-344.
5. Zur Hausen H, Meinhof W, Sccheiber W, Bornkamm Gw. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. Nuclei acid hibridation with complementary RNA of human wart virus. Int J cancer 1974;13:650-656.
6. Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer 1976;36:794.
7. Zur Hausen. Human Papillomaviruses and their posible role in squamous cell carcinomas Curr Top Microbiol Inmunol 1977;78:1-30.
8. Orth G, Jablonka S, Jarzabek-Chorzalaka M. Et al. Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. Cancer Res 1979;39:1074-82.
9. Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Zun HH. A new type of papillomavirus DNA its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer EMBO J 1984;3:1151-1157.

10. Durst M, Gissmann I, Ikenberg H, Richhart RM, Zur HH. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-3815.
11. Cram CP, Ikenberg H, Richhart RM, Gissmann L. Human Papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* 1984;310:880-883.
12. WHO/IARC. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva: WHO/IARC, 2007.
13. Rodríguez Bravo T. Caracterización de la neoplasia cervical intraepitelial inducida por el virus del papiloma humano en pacientes seropositivas a virus de la inmunodeficiencia humana. Pag. 55. Universidad de Salamanca. Marzo de 2013.
14. Bosch FX, Maños MM, Muñoz N, Sherman M, Cansen AM, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer a worldwide perspective. *International biological study on cervical cancer. Study Group J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
15. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther* 2002;7:219-237.
16. Chesson HW, Blandford JM, Gift TL, Tao G, Irwin KL. The estimated direct medical cost sexually transmitted diseases among American Youth 2000. *Peersp Sex Reprod Health* 2004;36:9-11.
17. Kuo HM, Fujise K. Human papillomavirus and cardiovascular disease among U.S. Women in the National Health and Nutrition examination Survey. 2003 to 2006. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2001-2006.
18. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32; Suppl 1:S5-15.

19. Lowy DR, Howley PM. Fields virology In Knipe MD, Howley PM Edit Papillomaviruses Philadelphia USA Lippincott Wilansand Wilkins. 2001:253-268.
20. Zun Hausen H Infections causing human cancer. Ist ed Wein heim Wiley-VCH;2006.
21. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur HH. Clasification of papillomaviruses. Virology 2004;324:17-27.
22. Muñoz N, Castellsague X, Berrington A, Gissmann L. El VPH en la etiología del cancer humano. Vaccine 2006;24:S3/1-S3/10.
23. Monger K, Baldwin A, Edwards KM, Haykava H. Et al. Mechanisms of human papillomavirus induced oncogenesis. J Virol 2004;78:11451-11460.
24. Cary A. Moody, Laimonis A. Laimins. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Natures reviews Cancer. Vol 10. August 2010:550-60.
25. IARC MONOGRAPHS on the evaluation of carcinogenic risks to Humans. BIOLOGICAL AGENTS. Volumen 100B. A review of human carcinogens. International Agency for Reseach on Cancer. Lyon, France 2012
26. Fraizer IH. Nature Rev Immunol. 2004;4:46-54.
27. Nomenclatures of papillomavirus. 14th International Papillomavirus Conference in Quebec, julio 1995.
28. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature evolution and taxonomy of human papilomaviruses. J Clin Virol 2005;32 supl 1:S1-S2.
29. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invaseive cervical cancer worlwide: a metaanaliysis. Br J Cancer 2003; 88:63-73.

30. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA. Et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-19.
31. Vázquez-Ortiz G, García JA, Ciudad CJ, Noe V, Penuelas S, Lopez-Romero R. et al. Differentially expressed genes between high-risk human papillomavirus types in human cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:484-491.
32. Arbin M, Buntinx F, Van RM, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytology triage of women with equivocal Pap smears, a metaanalysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:280-293.
33. Aral SO, Colmes KK. Social and behavioral determinants of epidemiology of STGs: Industrialized and developing countries. EN Holmes KK, Mardl PA, Sparling PF et al. Ed Sexual transmitted disease. NY McGraw-Hill. 1999:39-79.
34. UICC HPV and Cervical Cancer Curriculum Chapter 4. Immunoprevention of HPV infections Prof. Margaret Stanley PhD CURRICULUM VPH y Cáncer Cervical UICC.
35. Immunobiology of Papillomavirus. Stanley Margaret A. Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond. 2006;311-316.
36. Bayas JM et als. Infección natural y vacunas frente al virus del papiloma humano: papel de los anticuerpos en la protección a largo plazo. *Prog Obstet Ginecol* 2009;52(5):281-93.
37. Crosbie E, Einstein M, Franceschi S, Kitchener H. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013;382:889-99)
38. Salomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-9.

39. Partridge JM, Kouutsky LA Genital human papillomavirus infection. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:21-31.ç
40. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jai N, Hanson EN et al. Regression of low-grade squamous intraepithelial lesion in young women. *Lancet* 2004 364:1678-1683.
41. Nobbenhuis MA, Hermerhorst TJ, van der Brule AL, Rozendaal L, Voorhorst FJ. Et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001;358:1782-1783.
42. Abma J, Martinez G, Mosher W, Dawson B. Teenagers in the EE.UU. sexual activity, contraceptive use, and childbearing 2002. *Healthl Stat* 2004;23:1-87.
43. Ostor AG. Natural History of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int Gynecol Pathol.* 1993;12:186-192.
44. Sudenga SL, Shrestha S. *International Journal of Infectious Diseases* 17 (2013) e216-e220.
45. Burchell A, Franco E. Epidemiology of oncogenic and HPV types and the evidence for differences in their sexual transmissibility In: Monson J. Editor *Emerging issues on hpv infections From Science to practice.* Paris Karger 2006 Pag 20-33.
46. Copper DA, Gold J, Macean P, Donovan B, Finlayson R. Et al. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1985;1:537-540.
47. Ho GY, Bierman R, Bierman R, Beardsley L, Chang CL, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women *N Engl J Med* 1998;338:423-428.
48. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Vyer H, Abrahamowicz M et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections



- in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;20:699-707.
49. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, Xi LF, Chernesky S, O'Reilly S. Et al. Early natural history of incident type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:699-707.
  50. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research* 2009;143:195-208.
  51. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adan DE, Lee SK. Et al. Development and duration of human papillomavirus lesion after initial infection. *J Infect Dis* 2005;191:731-738.
  52. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S. Et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types effects viral evolution. *Virology*. 2005;337:76-84.
  53. Haedicke J, Iftner T. Human papillomaviruses and cancer. *Radioterapy and Oncology* 108 (2013):397-402.
  54. Schiffman M, Kjaer SK, Chap 2. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia *JNCI Monographs* 2003;31:14-19.
  55. International Agency for Research on cancer *Handbooks of cancer Prevention Vol 9. Cervix Cancer Screening*. Lyon IARC 2004.
  56. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Vill L. Avances recientes en la historia natural del VPH y el cancer anogenital. *Vaccine* 2006;24:S3/43-S353.
  57. McIntyre-Selman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade among oncogenic human papillomavirus DNA positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005;14:1165-1170.

58. Tolstrup J, Munk C, Thomsen BL, Svare E, van der Brule AJC, Gronbaek M. Et al. The role of smoking and alcohol intake in the development of HSIL among high HPV positive Women. *Obst Gynecol Scandinavica* 2006;85:1114-1119.
59. 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;31:20-28.
60. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89:191-199.
61. Coglianò V, Baa R, Straif K, Grosse Y, Secretan B. Carcinogenicity of human Papillomaviruses. *Lancet Oncol* 2005;6:204-210.
62. Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR. Et al. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002;95:2145-2151.
63. Richardson H, Abrahaowicz M, Telliman PP, Kellsall G, du BR, Ferency A et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university student. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005;14:1149-1159.
64. Shew ML, Fontenberry JD, Tu W, Juliar BE, Bateiger BE, Qadadri B. Et al. Association of condom use, sexual behaviours and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatric Adolesc Med* 2006;160:151-156.
65. Siling I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hansson BG. Et al. Chlamydia Trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Inter J Cancer* 2005;116:115.

66. Konya J, Diller J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res.* 2001;82:205-238.
67. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chag CJ, Burk RD. Natural history of cervico-vaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-428.
68. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME. Et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: from a population based study in Costa Rica. *Br J Cancer* 2001;84:1219-1226.
69. Hogewoning CL, Bleeker MC, van der Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J. Et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer* 2003;107:811-816.
70. Burchell AN, Winer RL, De Sanjose S, Franco EL. Chapter 6, Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006;24: S52-S61.
71. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smits JS. Et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: The IARC Multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1093-1101.
72. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 2004;111:431-439.
73. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S. Et al. Evidence for Chlamydia Trachomatis as a human papillomavirus co-factor in the etiology on invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines *J Infect Dis* 2002;185:324-331.
74. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes Simplex Virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the

- etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1604-1613.
75. Gillet E, Meys J, Verstraelen H, Verhelst R et al. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, october 2012, vol 7 Iss.10.e45201.
  76. Riiack G, Fiander A. The effect of lifestyle factors on gynecological cancer. *Best Practice & Research Clinical Obst & Gynecol.* 2006;20:227-251.
  77. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus J, Klaes R, Diesch C, Melsheimer P. Et al. Type dependant integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesion. *Cancer Res* 2008;68:307-313.
  78. Wang SS, Hildesheim A, Chapter 5. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progresion. *J Natl Cancer Inst Monog* 2003;31:35-40.
  79. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE, The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 2004;364 :249-256.
  80. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birenbaut P et al. Increased risk for cervical disease progresión of French women infected With the human papillomavirus Type 16 variant. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15:820-822.
  81. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type specific associations of human papillomavirus load with risk develop cervical carcinoma in situ. *Int J cancer* 2004;112:854-858.
  82. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllessten U. High Viral Loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 2005;92:891-894.

83. Ordi J, Puig-Tintore LM, Torné A, Sanz S, Esteve R, Rogamosa C, et al. Contribution of high risk human papillomavirus testing to the management of premaligna lesions of the uterine cervix. *Med Clin* 2003;121:441-445.
84. Parkin DM, Whelan S, Ferlay J, Storm M. Cancer incidence in five continents Vol I-VIII. Lyon IARC Cancer base N 7, 2005.
85. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E. Et al. Physical state and expresión of HPV DNA in benign and dysplastic cervical Tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*. 2004;92:873-880.
86. IARC Technical reports N3 Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Press 2004.
87. Muñoz N, Castellsague X, Barrington A, Gissman L. El HPV en la etiología del cáncer humano. *Vaccine* 2006;24: S3/1-S3/10.
88. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking. Collaborative reanalysis of individual data on 13541 women with carcinoma of the cervix and 23017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies *Int J Cancer*. 2006;118:1481-1495.
89. Franco E, San José s, Broker t, Stanley M, Chevarie-Davis M, Isidean S, Schiffman M. Human Papillomavirus and Cancer Prevention: Gaps in Knowledge and Prospects for Reseach, Policy and Advocary. *Vaccine* 30S. 2012.F175-F182.
90. Ciesielska U, Nowinska K, Podhorska-Okolow M, Dzieg P. The role of human paillomavirus in the malignant Transformation of cervix epithelial cells and the importance of vaccination against this virus. *Adv Clin Exp Med* 2012;21:235-244.
91. Pelefsky JM, Holly EA, Capter 6, Immunosupresion and co-infection with . *J Natl Cancer Inst Monog* 2003;31:41-46.

92. Oliveira S, Ribeiro J, Sousa H, Pinto D, Baldaque I, Medeiros R. Genetic Polymorphisms and cervical cancer development: ATM G5557A and p53bp1 C1236G. *Oncol Rep* 2012 april;1182-1192.
93. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Globocan 2008. Int J Cancer* 2010;127:2893-2897.
94. Denny L. Cervical cancer: prevention and treatment. *Disc Med.* 2012;14:125-131.
95. Denny L, Arnoolu R, Cervical cancer in Africa. *Cancer epidem Biomark. Prev.* 2012;21:1434-1438.
96. Garland SM, Bhatla N, Ngan HY. Cervical cancer burden and prevention strategies Asia Oceania perspective. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:1423-1433.
97. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in Europa. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2012;21:1423-1433.
98. Aral SO, Holmes KK. Social and behavioral determinants of epidemiology of STDs: industrialized and developing countries. In Holmes KK, Mardh PA Sparling PF et al. Editors *Sexually transmitted diseases.* NY McGraw-Hill. 1999: 39-76.
99. Anderson RM, Transmission dynamics of sexually transmitted infections: In Holmes KK, Mardh P A, Sparling PF et al. Editors *Sexually transmitted diseases.* NY McGraw-Hill, 1999: 25-37.
100. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijder PJ, Vaccarella S. Et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the international Agency for Reserch on cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366(9490):991-998.

101. Nicolosi A, Laumann EO, Glasser DB, Moreira Jr ED, Paik A, Gingell C. Sexual behaviour and sexual dysfunctions after age 40: the global study of sexual attitudes and behaviours. *Urology* 2004; 64:991-997.
102. de Sanjosé S. La investigación sobre la infección por virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino en España. In de Sanjosé S, García A, editors *El virus del papiloma y Cáncer: epidemiología y prevención* EMISA Madrid 2006. p 141-146.
103. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van der Brule AJ, Rondaron M, et al. Incident duration, and determinant of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004;190:2077-2087.i.
104. Gondos A, Chokunonga E, Brenner H, Parkin DM, Sriankila R, Borok MZ, et al. Cancer survival in a southern African urban population *J Int* 2004;112:860-864.
105. Sadleir L, Saftlas A. Cervical Surgery and preterm birth. *J Perinat Med.* 2007;35:5-9.
106. Moscicki AB. HPV Infection in adolescents *Dis Markes* 2007;23:229-234.
107. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytology and histologic interpretation: realistic estimates from the ASCUS LSIL Triage Study. *JAMA* 2001;285:1500-1505.
108. Collins SL, Mazloomzadeh S, Winter H, Rollason TP, Biomfield P, Yung LS et al. Proximity of first intercourse menarche and risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study. *Int J Cancer* 2005;114:498-500.
109. 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 in ALTS report *Am J Clin Pathol* 2007;127:805-818.

110. Robertson AJ, Anderson JM, Beck JS, Burnett RA, Howatson SR, Lee FD et al Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1989; 42:231-238.
111. Parkin DM, The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Inter J Cancer* 2006;118:3030-3044.
112. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Editors Cancer incidence in five continents Vol VIII Lyon IARC Scientific Publication No 155 IARC 2002.
113. Ridege JA, Glisson B, Lango MN, Head and Neck Tumors IN: Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins W, editors Cancer management A multidisciplinary Approach Medical Surgical & Radiation Oncology 11 th ed 2008, pag 92.
114. Greenblatt RJ, Human papillomavirus: Diseases diagnosis and a possible vaccine. *Clinical Microbiology Newaleter* 2005;27:139-145.
115. Glisson ML, Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J clin Oncol* 2006;24:5623-5625.
116. Frisch M, Smith E, Grulich A, Johansen C, Cancer In a population-based cohort of men and women in registered homosexual partnerships. *Amer J of Epidemiol* 2003;157:966-972.
117. Feller L, Khmmisa RA, Wood NH, Marne wick JC, Meyeereov R, Lemmer J. HPV associated oral warts. *SADJ*. 2011;66:8285.
118. Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infec Dis* 2013;13: 39.
119. Gross G, Ikenberg H, Gissmann L, Hagedorn M. Papillomavirus infection of the anogenital region correlation between histology



- clinical picture and virus type. Proposal of a new nomenclature. *J Invest Dermatol* 1985;85:147-142.
120. Lacey CJ. Therapy for genital papillomavirus related disease. *J Clin Virol* 2005;32:S82-S90.
121. Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. Disease caused by human papillomavirus. *J Dtsch Dermatol Gest* 2009;7:453-466.
122. García Iglesias A, García S, Gauro M, Rodriguez T. et al. Eficacia y efectos adversos del tratamiento con Imiquimod en la mujeres con condilomas vulvo-perineales. *Elect J Biomed*. 2010; 7: 34-41.
123. Sinal SH, Woods CR, Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Sem Pediat Infect Dis* 2005;16:306-316.
124. Armstrong LR, Derkay CS, Reeves. Initial results from the initial registry for juvenile –onset recurrent respiratory papillomatosis RRP Task Force. *Arch Otolaryng Head Neck Surg* 1995;125:743-748.
125. Derkay CS. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report . *Arch Otolarin Head Neck Surg* 1995;121:1386-1391.
126. Shah KV, Unger ER, Derkay CS, Steinberg BM. Recurrent respiratory papillomatosis: bright prospects for vaccine based prevention. *Papillomavirus Rep* 2005;16:333-338.
127. Kin SCH, Messing S, Shah K, Luque AE. Effect of highly active antiretroviral Therapy and menopause on risk of progression on cervical dysplasia in human immune deficiency virus negative (HIV-) infected women. *Infec Diseas in Obst and Gynecol*. 2013: [Htt//dx.doi.org/10.1155/2013/78471](http://dx.doi.org/10.1155/2013/78471).
128. Konopnicki D, de Wit S, Clumeck N. HPV and VIH coinfection, *Future Virology* 2013, 8:903-915.

129. Singhal S, Baker RD, Kaun SS, Geltoned D, Alkhami RH, A rare case of esophageal papilloma due to human papillomavirus with uncomment presentation of dysphagia in 2 year old child. *Clin Pediatric Nov 4*. Pil: 000992815614357.
130. Tay SK. Genital oncogenic human papillomavirus infection: a short review on the mode of transmission. *Ann Acad Med Singapore 1995;24;598-501*.
131. Burchell AN, Winer RL Franco EL: Chapter 6, Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection *Vaccine 2006;24:S3/52-S3/61*.
132. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F. et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: resultants at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J of the National Cancer Inst 2006;98:765-774*.
133. Garrett LA, Mcann CH. Abnormal Citology: Management of atypical squamous cells. Low-grade intraepithelial neoplasia, and high-grade intraepithelial neoplasia. *Clin Obst Gynecol 2013;56:25-34*.
134. Verdoodt F, Szarewski A, Halfon P, Cuscheiri K, Arbyn M. Triage of women with minor abnormal cervical cytology. Meta-analysis of the accuracy of an assay targeting messenger ribonucleic acid of high-risk human papillomavirus types. *Cancer Cytopathol 2013;121:675-685*.
135. Puig-Tintore LM, Alba A, Boch FX, Castellsague X, Coll C, Cortes X, et al La infección por papillomavirus. Documento de consenso de la SEGO, SEC, y AEPCC. Documentos de Consenso de la SEGO 2006. Madrid Meditex-Sanex.
136. Guía de Cribado del cáncer de cuello uterino en España, 2014. AEPCC.

137. Documento Técnico del programa de Prevención y detección Precoz del cáncer de cuello uterino en Castilla y León.
138. Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekosssis T, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, et al The up to date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: the Cochrane colposcopy & cervical cytopathology collaborative group approach *Cancer Treat Rev* 2006;32:516-523.
139. Schantz A, Thormann I, Cryosurgery for dysplasia of the uterine ectocervix. A randomized study of the efficacy of the single and double freeze techniques. *Acta Obst Gynecol Scand* 1984;63:417-420.
140. Perrotta M, Manhitelli CE, Velasco AF, Tauscher P, Lopez G, Paremteu MS. Use of CO2 laser vaporization for the treatment of high grade intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis* 2013;17:23-27.
141. Quiao L, Li B, Long M, Wang X, Wang A, Zahang G. Accuracy of visual inspection with acetic acid and with lugol's iodine for cervical cancer screening: meta-analysis. *J Obst Gynaecol Res* 2015;doi 10.1111/jog12732.
142. Monk A, Pushkin SF, Nelson AL, Gunning JE, Conservative management of options for patients with dysplasia involving endocervical margins of cervical cone biopsy specimens *Amer J Obst Gynecol* 1996;174:1695-1700.
143. Papoutsis D, Panikkar J, Gornall A, Blundell S. Does the number of tissue fragments removed from the cervix with excisional treatment for CIN pathology affect the completeness of excision and cytology recurrence at follow-up An observational cohort study. *J Obstet Gynecol* 2015;12:1-6.
144. García Ramos AM, García Ramos ES, Dos Reis HL, de Rezende RB. Quality evaluation of cone biopsy specimens obtained by large

- loop excision of the transformation zone. *J Clin Med Res* 2015;7:220-224.
145. Papoutsis D, Panikkar J, Underwood M, Blundell S, Sahu B, Blackmore J, Reed N. Endocervical crypt involvement by CIN 2-3 a predictor of cytology recurrence after excisional cervical treatment. *J Low Genit Tract Dis.* 2015;19:311-318.
  146. Schwarz TM, Kolben T, Gallwas J, Crispin A, Dannecker C. Comparison of two surgical methods for the treatment of CIN: Classical LLETZ versus isolated resection of the colposcopic apparent lesion study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015;16:225-231.
  147. Crane JMC. Pregnancy outcome after loop electrosurgical excision procedure. A systematic review. *Obst Gynecol* 2003;102:1058-1062.
  148. Ferency A, Choukroun D, Falcone T, Franco E. The effect of cervical loop electrosurgical excision on subsequent pregnancy outcome; North American experience. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:146-1250.
  149. Samson SLA, Bentley JR, Fahey TJ, Mckay DJ, Gill GH. The effect of Loop electrosurgical excision procedure on future pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2005;105:325-332.
  150. Gentry DJ, Baggish MS, Brady K, Walsh PM, Hungler MS. The effects of Loop excision of the transformation zone on cervical length: implications for pregnancy. *Amer J Obst Gynecol* 2000;182:516-520.
  151. Lopez-Yarto M, Astudillo F, Sas A, Cararach M, Suris JC, Labastida R. Embarazo post conización cervical: En Cortes J, Labasstida R. editores *Proceedings of thr XI International Congress of cervical Pathology and Colposcopy Barcelona 2002* pag 243-244.
  152. Brown DR, Fife KH, Wheeler CM, Koutsky LA, Lupinacci LM, Raikar R et al Early assessment of the efficacy of a human

- papillomavirus type 16 L1 virus-like particle vaccine. *Vaccine* 2004;22:2936-2942.
153. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schindl A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 - 18 in young women: a randomized controlled trial. *Lancet* 2004;364:1757-1765.
  154. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR. Et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine in Young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicenter Phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005;6:271-278.
  155. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscichi AB, Romanoski B, Roteli-Martins CM et al. Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus type 16 and 18 follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 2006;367:1247-1255.
  156. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Wiley DJ. Et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002;347:1645-1651.
  157. Mao C, Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Wiley DJ, et al. Efficacy of human papillomavirus 16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obst Gynecol* 2006;107:18-27.
  158. Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 1999;9:423-430.
  159. Wilkström A, van Doornum GJ, Kirnbauer R, Quint WG, Dillner J. Prospective study on the development of antibodies against human papillomavirus type 6 among patients with condyloma acuminata or new asymptomatic infection. *J Med Virol* 1995;46:368-374.

160. Shope RE. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. *J Exp Med* 1997;65:607-624.
161. Breiburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonenmacher B, Trindesmasquet C, Orth G. et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995;69:3959-3963.
162. Ghim S, Newsome J, Bell J, Sundberg JP, Schlegel R, Jenson AB. Spontaneously regressing oral papillomavirus induced systemic antidodies that neutralize canine oral papillomavirus. *Exp Mol Pathol* 2000;68: 147-151.
163. Giroglou T, Sapp M, Lane C, Fligge C, Christensen ND, Streeck RE. et al. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* 2001;19:1783-1793.
164. Orozco JJ, Carter JJ, Koutsky LA, Galloway DA. Humoral immune response recognizes a complex set of epitopes on human papillomavirus type 6-11 capsomers *J Virol* 2005; 79:9503-9514.
165. Fleury MJ, Touze A, Alvarez E, Capentier G, Clavel V, Vautherot JF. Et al. Identification of type specific and cross reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Arch Virol* 2006; 54: 356-361.
166. Huygen F, Verschueren K, McCabe C, Stegmann JU, Zima J, Mahaux O, Van Holle L. et al. Investigating reports of complex regional pain syndrome: An analysis of HPV 16/18, adjuvanted vaccine post-licensure data. *E Bio Medicine*. 2015;6:1114-121.
167. Bonanni P, Ferro A, Guerra R, Lannazzo S, Odone A, Pompa MG. Et al. Vaccine coverage in Italy and assessment of the 2012-2014 National immunization prevention plan. *Epidem Prev* 2015;39:146-158.

168. Handler NS, Handler MZ, Majewski S, Schwartz RA. Human papillomavirus vaccine trials and tribulations: vaccine efficacy. *J Am Acad Dermatol* 2015;73:759-767.
169. White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. In vitro infection and type restricted antibody mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* 1998;72:959-964.
170. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Met Mol Med* 2005;119:445-462.
171. Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP. Novel structural features of bovine papillomavirus papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9. Å resolution. *Nat Struct Biol* 1997; 4:413:413-420.
172. Yan M, Peng J, Jabbar IA, Liu X, Filgueira L, Frazer IH, et al. Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 an NF kappaB mediated signalling moderated by TGF-beta. *Inmunol Cell Biol* 2005;83:83-91.
173. Yang R, Murillo FM, Delannoy MJ, Blosser RL, Yutzy WH, Uematsu S. et al. Lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces IG class switch recombination via TLR4-MyD88. *J Immunol* 2005;174:7912-7919.
174. Harper DM EL, Wheeler CM, Moscichi AB, Romanoswki B, Roteli CM et al. Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particles vaccine against human papillomavirus types 16 and 18 follow-up from a randomized controlled trial. *Lancet* 2006;367:1247-1255.
175. Mao Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Wiley DJ et al. Efficacy of human papillomavirus 16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2006;107:18-27.

176. afGeijerstam V, Kibur M, Wang Z, Koskela P, Pukkala E, Schiller J et al. Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. *Infect Dis* 1998;177:1710-1714.
177. See//www.cdc.gov/nip/ACIP/mgt-slides-feb06.html/hpv.
178. IARC HPV Working Group. Primary end-points for prophylactic HPV vaccine trials. Lyon International agency for research on cancer 2014. PMID 25468561.
179. Quinn M, Babb P, Jones J, Allen E. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England evaluation based on routinely collected statistics. *BJM* 1999;318:904-908.
180. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has in the UK. *Lancet* 2004;364:249-256.
181. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *Can J Clin* 2005;55:74-108.
182. Baker E. Reviewing guidelines evaluation for primary HPV screening in women age 25 to 29. *Mlo Med Lab Obst* 2015;47:26-28.
183. Verdoodt F, Jentschke M, Hillemanns P, Racey CS, Snijders PJ, Arbyn M. Reaching women who do not participate in the regular cervical cancer screening programmed by offering self-sampling kits: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur J Cancer* 2015;51:2375-2385.
184. Verdoodt E, Szarewski A, Halfon P, Cuschieri K, Arbyn M. Triage of women with abnormal cervical cytology: meta-analysis of the accuracy of and assay targeting messenger ribonucleic acid of 5 high-risk human papillomavirus types. *Cancer Cytopathol* 2013;121:675-687.
185. Yamada H, Tabe Y, Ishii K, Terao Y, Yamashita Y, Horill T. et al. Clinical performance evaluation of a high-risk human papillomavirus



- genotyping test clinichip HPV using cervical scrape specimens. *Clin Lab* 2015;61:851-855.
186. Reid JL, Wright TC Jr, Stoler MH, Cuzick J, Castle PE, Dockter J. et al. Human papillomavirus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening; baseline and longitudinal results from the Clear study. *Am J Clin Pathol* 2015;144:473-83.
  187. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad, Hickey JD. Et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000;132:810-819.
  188. Yoshino K, Karimoto M, Marzo C, Kaneshiro B, Hiraoka M. Improving the utilization of human papillomavirus and cervical cytology co-testing for cervical cancer screening in an obstetrics and gynecology resident clinic. *Haw J Med Public Health* 2015;74:267-269.
  189. Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahe C. et al. Cost-effectiveness of cervical cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med* 2005;253:2158-2168.
  190. Souter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Inter J Cancer* 2006;118:2048-2055.
  191. Sniders PJ, van der Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity *J Pathol* 2003;201:1-6.
  192. Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio: an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer*. 2004;90:1407-1413.
  193. Becker-Schiebe M, Sperling M, Pinkert U, Hoffmann W. Impact P16 alterations and pretreatment anemia on toxicity in head and neck

- cancer undergoing definitive radiochemotherapy. *Oncol Res Treat* 2015;38:570-576.
194. Motamedi M, Böhmer G, Neumann HH, von Wasielewski R. CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases. *BMC Infect Dis* 2015;15:541-547.
  195. Nevens D, Nuyts S. HPV-positive head and neck tumours, A distinct clinical entity. *B-Ent* 2015;11:81-87.
  196. Clinton LK, Miyazaki K, Ayabe A, Davis J, Tauchi-Nishi P, Shimizu D. The LAST guidelines in clinical practice: implementing recommendations for p16 use. *Am J Clin Pathol* 2015;144:844-849.
  197. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbarch D, Vinokurova S, von Kanel DM. Evaluation of a nuclear score for P26INK4a stained cervical squamous cells in liquid based cytology samples. *Cancer* 2005;105:461-467.
  198. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of P16INK4a in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix *Gynecol Oncol* 2003;91:201-208.
  199. Gou M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD. The predictive value of P16INK4a and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Amer J Clin Pathol* 2004;122:894-901.
  200. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macri L, Florito C, Maletta F, et al. Interpretation of P16INK4a/ki67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus positive women by experts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol* 2015;123:212-218.
  201. Gajanin R, Gajanin Z, Vujkovic Z, Gajanin V, Gojkovic Z, Ljubojevic V. Immunohistochemical expression of p16INK4a in inflammatory preneoplastic and neoplastic cervical lesions. *Med Pregl* 2015;68:85-92.

202. Patel RG, Purvade A, Gatearwar AK, Inghiram G, Meivick A, Gatearwar AK. Et al. Microscale biood hydrogel arrays for cell engineering applications. *Cell Mol Bioeng* 2014;71:394-408.
203. Castillo A, Wang L, Koriyama C, Eizuru Y, Jordan K, Akiba S. A systems biology analysis of the charges in gene expression via silencing of HPV 18 EI expression in Hela cells. *Open Biol* 2014, 4(io) Dii 130119 doi, 10.1098/r506.130119.
204. Nogara PR, Manfroni LA, da Silva MC, Consolaro ME. The see and treat strategy for identifying cytologic high-grade precancerous cervical lesions among low-income Brazilian women. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;118:103-106.
205. Verguts J, Bronselaer G, Donders G, Arbym M, van Eldere J, Drijkoningen M, Poppe W. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia:the role of human papillomavirus testing and age at conisation. *BJOG Inter J Obstet Gynaecol.* 2006;113:1303-1307.
206. Zivadinovic R, Lilic G, Lilic V, Petric A, Filipovic S, Todorovska I. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia with negative cone margins risk factors. *J BUON* 2011;16:498-504.
207. Kyehyun N, Sooho CH, Jeongsig K, Soob J, Bae D. Factor associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *J. Gynecol Oncol.* 2009;20:91-95.
208. Ramos MC, Pizarro H, de Lorenzo BH, Michelin MA, Murta EF. High-grade cervical intraepithelial neoplasia human papillomavirus and factor connected with recurrence following surgical treatment. *Clin Exp obstet Gynecol.* 2008;35:242-247.
209. Wu D, Zheng Y, Chen W, Gou C, Jiang Y, Chen G, Huang Y. Prediction of residual/recurrence disease by HPV genotype after loop excision procedure for high-grade cervical intraepithelial

- neoplasia with negative margins. *Aus N Zel J Obstet Gynaecol* 2011;51:114-118.
210. Jeong NH, Lee NW, Kim HJ, Kim T, Lee KW. High-risk human papillomavirus testing for monitoring patients treated for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J. Obstet Gynecol Res* 2009;35:706-711.
211. Aerssens A, Claeys P, Beerens E, Garcia A, Weyers S, van Renterghem L Praet M. et al. Prediction of recurrence disease by cytology and HPV testing after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Cytopathology* 2009;20:27-35.
212. Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, Kyrgiou M, Tsoumpu M, Valari O, Martin-Hirsch P. et al. Alterations in human papillomavirus related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2011;121:43-48.
213. Alonso I, Torne A, Puig-Tintore LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, Pahisa J, Ordi J. Pre-and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/ recurrence disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006;103:631-636.
214. Sarian LO, Derchain SF, Pitta D, Morais SS, Rabelo SH. Factor associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with large loop excision on the transformation zone (LLETZ). *J Clin Virol* 2004;31:270-274.
215. Baloglu A, Uysal D, Bezircioglu I, Bicer M, Inci A. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade cervical intraepithelial neoplasia lesions. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:69-73.
216. Debarge VH, Collinet P, Vinatier D, Ego A, Dewilde A, Boman F, Leroy JL. Value of human papillomavirus testing after conization by Loop electrosurgical excision for high grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol* 2003;90:587-592.

217. Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. *Best Pract Res Clin Obst Gynecol* 2005;19:545-561.
218. Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjanen KJ. HPV DNA test Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2004;94:181-186.
219. Murta EF, Conti R, Rodovalho J, Barcelos AC, Adad SJ, de Sousa H. Outcome after treatment of high-grade squamous intraepithelial lesions: relation between colposcopically directed biopsy, conization and cervical loop excision. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004;25:587-590.
220. Samkasem A, Thavaramara T, Manusirivithaya S, Tangjigamol S. Tumor persistence in high -grade squamous intraepithelial lesion patients with positive surgical margin post loop electrosurgical excision procedure. *J Med Assoc Thai* 2006;89:934-940.
221. Strander B, Ryd W, Wallin KL, Warleby B, Zheng B, Milson L, Gharizadeh B. et al. Does HPV status 6-12 months after treatment of high grade dysplasia in the uterine cervix predict long term recurrence. *Eur J Cancer* 2007;43:1849-1855.
222. Burks HR, Smith KM, Wentzensen N, Tenney M, Dunn ST, Wang SS. Et al. Risk of CIN2 among women with of previous treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*. 2011;15: 11-14.
223. Bierkens M, Marchitamiento SM, van Wieringen WN, van de Wiel MA, YlstraB, Meijer CJ, Snijeders PJ et al. HPV type related chromosomal profiles in high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *BMC cancer* 2012;12:36-40.
224. Terra AP, Murta EF, Maluf PF, Caballero OL, Brait M, Adad SJ. Aberrant promoter mutation can be useful as a marker of recurrent disease in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Tumori* 2007;93:572-579.

225. Jabbar SF, Abrams L, Glick A, Lambert P. Persistence of high-grade cervical dysplasia and cervical cancer requires the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Cancer Res* 2009; 69:4407-4414.
226. Ber-Am A, Daniel Y, Ron IG, Niv J, Kupferminc MJ, Bornstein J, Lessing JB. Combined colposcopy loop conization and Laser vaporization reduces recurrent abnormal cytology and residual disease in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 2000;78:47-51.
227. Sarian LO, Derchain SF, PittaR, Morais SS, Rabello SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone, *J Clin Virol* 2004;31:270-274.
228. Fallani MG, Penna C, Marchioni M, Bussani C, Pieralli U, Andersson KL, Fambri M. Prognostic significance of high-risk HPV persistence after laser CO2 conization for high grade CIN a prospective clinical study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29:378-382.
229. Katki HA, Schiffman M, Castillo PE, Feterman B, Poitras NE, Lorey T, Cheung LC. Et al. Five year risk of recurrence after treatment of CIN2 CIN 3 on performance of HPV and Papanicolau contesting in posttreatment management. *J Low Genit tract Dis.* 2013;17:S78-84.
230. Tropo S, Jonassen CM, Sioborg KD, Nygard M, Dahi FA, Alfsen GC, Lie AK. Role of high-risk human papillomavirus mRNA testing in the prediction of residual after conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia, *Gynecol Oncol.*2011;123:257-262.
231. Robova H, Rob L, Pluta M, Kacirek J, Slavik V Skapa P, Hamsikova E, Tachezy R. Progression and regression low grade intraepithelial squamous lesions in context of positivity of high risk human papillomavirus. *Ceska Gynecol* 2007;72:347-350.
232. García-Iglesias A, Doyague MJ, Velasco MJ, Lajas JA, Tejerizo L, Lanchares JL. Changes in uterine cervix after therapeutic CO2 Laser. *Citol* 1991;12:181-186.

233. Giannella L, Mfuta K, Gardini G, Rubino T, Fodero C, Prandi S. High-grade CIN on cervical biopsy and predictors of the subsequent cone histology results in women undergoing immediate conization. *Eur J J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2015;186:68-74.

## **9. ANEXOS**

- 9.1. Consentimiento informado Tratamiento**
- 9.2. Hoja informativa tras el tratamiento**
- 9.3. Hoja verificación quirúrgica**
- 9.4 Registro colposcopia**
- 9.5. Programa de la Junta Castilla y León 2013**
- 9.6. Clasificación Colposcópica Barcelona 2012**
- 9.7. Clasificación vasos colposcópicos 1981**



