



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina

**EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CIN-2 SEGONS
LA p16 I EL Ki-67**

**Tesi Doctoral presentada per
Jordi Genovès Gonzàlez, per a optar al grau de Doctor en
Medicina i Cirurgia**



TESI DOCTORAL

EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CIN-2 SEGONS LA p16 I EL Ki-67

Autor: Jordi Genovès Gonzàlez

Sota la direcció de:

Professora Gemma Mancebo Moreno

Professor Ramón Carreras Collado

Professor Francesc Alameda Quitllet

**Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, i Medicina
Preventiva.**

Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, 2018

DOCTORAT EN PEDIATRIA, OBSTETRÍCIA I GINECOLOGIA

Barcelona, Juliol de 2018

Agraïments

Dedicat a la meva amiga, la meva mentora, la meva professora, a la Dra Gemma Mancebo. Gràcies per adoptar-me des de “R2”, per proposar-me ser un més a la Unitat d’Oncologia, per proposar-me aquest treball i insistir en que jo podia realitzar-lo. Pel teu incansable esforç, i per la teva estima.

Gràcies al Professor Ramón Carreras Collado, Cap de Servei Emèrit del Servei d’Obstetrícia i Ginecologia de l’Hospital del Mar, per dirigir aquesta tesi doctoral, amb el seu suport, constants estímuls fins a l’últim minut.

Gràcies al Professor Francesc Alameda, Cap de Servei Emèrit d’Anatomia Patològica de l’Hospital del Mar, per l’ajuda i disponibilitat des del primer moment que vaig incorporar-me al Servei i a aquest projecte.

A la resta d’adjunts de la unitat d’Oncologia Ginecològica, Esther Miralpeix i Josep Maria Solé, per la vostra col·laboració en aquesta tesi, per compartir moments de complicitat en la realització d’aquest estudi.

A la Dra Nadwa Kanjou, per la teva amistat, per les teves paraules tranquil·litzadores, per saber orientar-me i compartir saviesa, gràcies per tenir-te sempre tan a prop.

A la Dra Margalida Sastre, Dra Elena Ferriols, i la Dra Marta Arigita, per la vostra insistència en que acabés aquesta tesi i tirés el projecte endavant, per la vostra amistat.

A tots els companys del Servei d’Obstetrícia i Ginecologia de l’Hospital del Mar, adjunts, residents, comadrones, infermeres, auxiliars i a tots els companys del PASSIR, per donar suport a la realització de l’estudi.

Al Dr Enric Cayuela, Cap de Servei d’Obstetrícia i Ginecologia de L’Hospital General de l’Hospitalet, gràcies per insistir en que si tenia temps de dinar i dormir, podia fer aquesta tesi, així ha estat! I a la resta de membres del Servei, pel dia a dia, per contribuir a trobar moments per anar avançant en la realització d’aquesta tesi, per escoltar-me i fer el camí més lleuger.

A tots els meus residents, gràcies per la vostra col·laboració i transmetre’m la motivació per a seguir millorant, i deixar que pogués avançar feina els dijous a la tarda.

A en David, el meu estadístic, per buscar els moments que van fer fàcil l’estadística que tanta por em feia.

A la família i a tu estimat, per aguantar els moments de pressió i fer que siguin molt més lleugers.

1.	INTRODUCCIÓ	12
1.1.	<i>CÀNCER DE CÈRVIX. EPIDEMIOLOGIA.....</i>	13
1.2.	<i>LESIONS PRECURSORES DE CàNCER DE COLL UTERÍ</i>	17
1.3.	<i>DIAGNÒSTICS CITOLÒGICS.....</i>	20
1.3.1.	L-SIL	21
1.3.2.	H-SIL.....	22
1.3.3.	ASC-US / ASC-H.....	22
1.4.	<i>DIAGNÒSTICS HISTOLÒGICS.....</i>	24
1.5.	<i>HISTÒRIA NATURAL DE LES DISPLÀSIES CERVICALS.....</i>	27
1.6.	<i>VIRUS DEL PAPILOMA HUMÀ (VPH)</i>	30
1.6.1.	ESTRUCTURA I GENOTIPS.....	30
1.6.2.	HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PER VPH	33
1.6.3.	COFACTORS IMPLICATS EN LA CARCINOGENÈSI DEL VPH	36
1.6.3.1.	EDAT.....	36
1.6.3.2.	TABAC	39
1.6.3.3.	CONDUCTA SEXUAL	40
1.6.3.4.	PARITAT.....	41
1.6.3.5.	ANTICONCEPCIÓ HORMONAL.....	41
1.6.3.6.	IMMUNITAT	42
1.6.4.	GENOTIPS DEL VPH I LA SEVA RELACIÓ AMB CIN I CCU	42
1.6.5.	DETECCIÓ I GENOTIPAT DE VPH	49
1.6.5.1.	MÈTODES D'AMPLIFICACIÓ DE LA SENYAL	50
1.7.	<i>MÈTODES DE CRIBRATGE.....</i>	54
1.8.	<i>MANEIG DE LES DISPLÀSIES CERVICALS.....</i>	59
1.8.1.	ATÍPIA DE CÈL·LULES ESCAMOSES DE SIGNIFICAT INCERT.....	59
1.8.2.	ATÍPIA DE CÈL·LULES ESCAMOSES QUE NO POT DESCARTAR LESIÓ ALT GRAU..	61
1.8.3.	LESIÓ INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE BAIX GRAU.....	62
1.8.4.	LESIÓ INTRAEPITELIAL D'ALT GRAU (H-SIL)	63
1.9.	<i>COLPOSCÒPIA I BIÒPSIA DIRIGIDA.....</i>	65
1.10.	<i>MANEIG DE LES LESIONS BIÒPSIADES</i>	69
1.10.1.	MANEIG DE LA DISPLÀSIA MODERADA (CIN-2).....	69
1.10.2.	OBSERVACIÓ SENSE TRACTAMENT	71
1.10.3.	TRACTAMENTS EXCISIONALS	72
1.10.4.	TRACTAMENTS DESTRUCTIUS	73
1.10.5.	TRACTAMENT SENSE BIÒPSIA: VEURE I TRACTAR.....	73
1.10.6.	HISTERECTOMIA	73
1.11.	<i>CONSEQÜÈNCIES OBSTÈTRIQUES TRACTAMENT EXCISIONAL.....</i>	75
1.12.	<i>COM SELECCIONAR PACIENTS CANDIDATES A OBSERVACIÓ.....</i>	78
1.13.	<i>BIOMARCADORS</i>	80
1.13.1.	P16INK4a	80
1.13.2.	PROTEINA KI-67	83
1.13.3.	P16INK4a + KI-67	85
1.14.	<i>CONSIDERACIONS.....</i>	87
2.	HIPÒTESI	88

3.	OBJECTIUS.....	90
4.	MATERIALS I MÈTODES.....	92
	4.1 POBLACIÓ A ESTUDI.....	93
	4.2. RECLUTAMENT I SEGUIMENT DE LES PACIENTS.....	95
	4.3.VARIABLES	97
	4.4.DEFINICIONS.....	98
	4.5.RECOLLIDA CITOLOGIA I DETECCIÓ DEL VPH.....	100
	4.6.PROCESSAT DE MOSTRES.....	101
	4.7.ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	102
	4.8.FASES DE L'ESTUDI.....	103
	4.9.IMPLICACIONS ÈTIQUES.....	104
5.	RESULTATS	105
	5.1.CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ A ESTUDI.....	106
	5.2.ANÀLISI DE LES VARIABLES EPIDEMIOLOGIQUES	107
	5.3.ANÀLISI DE LES CARACTERISTIQUES DE LES LESIONS CIN-2 AL DIAGNÒSTIC ..	108
5.3.1.	CARACTERÍSTIQUES DE LA COLPOSCÒPIA AL DIAGNÒSTIC.....	108
5.3.2.	CARACTERÍSTIQUES A-P DE LES LESIONS CIN-2 AL DIAGNÒSTIC	109
	5.3.2.1. CITOLOGIA PRÈVIA.....	109
	5.3.2.2. GENOTIPAT DEL VPH.....	110
	5.3.2.3. EXPRESSIÓ DE LA p16.....	111
	5.3.2.4. EXPRESSIÓ DEL Ki-67.....	112
	5.4. EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CIN-2.....	113
5.4.1.	VARIABLES EPIDEMIOLOGIQUES I EVOLUCIÓ DE CIN-2	114
5.4.2.	CORRELACIÓ DE LES TROBALLE COLPOSCÒPIQUES AMB L'EVOLUCIÓ DEL CIN-2	116
5.4.3.	VARIABLES ANATOMO-PATOLÒGIQUES I EVOLUCIÓ DEL CIN-2.	117
	5.4.3.1. ANÀLISI DEL TIPUS DE CITOLOGIA DIAGNÒSTICA O PRÈVIA	117
	5.4.3.2. ANÀLISI DEL GENOTIP DEL VPH	119
	5.4.3.3. ANÀLISI DEL VALOR PREDICTIU DE L'EXPRESSIÓ DE p16	121
	5.4.3.4. ANÀLISI DEL VALOR PREDICTIU DE L'EXPRESSIÓ DEL Ki-67	123
6.	DISCUSIÓ.....	128
	6.1. POBLACIÓ D'ESTUDI.....	130
	6.2. L'EVOLUCIÓ DEL CIN-2.....	131
6.2.1.	FACTORS SOCIO-EPIDEMIOLOGIQUES	133
	6.3.FACTORS CLÍNICS. COPOSCÒPIA.	136
	6.4.FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS.....	136
6.4.1.	PREVALENÇA DE P16	138
6.4.2.	PREVALENÇA DE LA Ki-67	141
6.4.3.	CITOLOGIA PRÈVIA	144
6.4.4.	INFECCIÓ PER VPH.....	145
	6.5.LIMITACIONS DE L'ESTUDI	148
7.	CONCLUSIONS	151
8.	BIBLIOGRAFIA.....	153

9. ANNEXES..... 188

ABREVIATURES

ACO: Anticonceptius Orals

ADN/DNA: Àcid Desoxiribonucleic

AEPCC: Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia

AGC: Atípia de Cèl·lules Glandulars

AGUS: Atípia de Cèl·lules Glandulars de Significat Incert

AHO: Anticonceptius Hormonals Orals

AIS: Adenocarcinoma endocervical in situ

ALTS: Estudio per al triatge de les lesions ASC-US LSIL (ASC-US LSIL Triage Study)

ARN/RNA: Àcid Ribonucleic

ASC-H: cèl·lules escamoses atípiques suggestivas de lesió d'alto grau (Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL).

ASC-US Atípia de Cèl·lules Escamoses de Significat incert (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)

ASSCP: Societat Americana de Patologia Cervical y Colposcòpia (American Society for Colposcopy and Cervical Patology)

ATHENA: Adreesing The Need for advanced HPV Diagnosis

BX: biopsia

CC: citología convencional.

CIN: neoplàsia intraepitelial cervical (cervical intraepithelial neoplasia)

CIN1: neoplàsia intraepitelial cervical grau 1

CIN1+: neoplàsia intraepitelial cervical grau 1 o superior

CIN2: neoplàsia intraepitelial cervical grau 2

CIN2+: neoplàsia intraepitelial cervical grau 2 o superior

CIN3: neoplàsia intraepitelial cervical grau 3

CIN3+: neoplàsia intraepitelial cervical grau 3 o superior

CIS: Carcinoma In Situ

CLEAR: Clinical Evaluation of APTIMA mRNA

CO2: diòxid de carboni

CUU: Càncer de cèrvix o de coll uterí

DIU: Dispositivo Intrauterino

E6: gen d'expressió temprana número 6 del virus del papiloma humà

E7: gen d'expressió temprana número 7 del virus del papiloma humà

EFC: European Federation Of Colposcopy

FDA: Agència de drogues i aliments (Food and Drug Administration)

HC2: captura d'Híbridos 2 (Hybrid Capture 2)

HPV: Virus del Papiloma Humà

HPV-AR: virus del papiloma humaà d'alt risc.

HR-HPV: virus del papiloma humà d'alt risc (High-risk human papillomavirus)

HSIL: lesió intraepitelial d'alt grau (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

IC: Intèrval de Confiança

IFCPC: federació internacional de patologia cervical y colposcòpia. (International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy)

IMAS: Institut Municipal de Assistència Sanitària de Barcelona

Ki-67: proteïna Ki-67

L1: gen d'expressió tardana número 1 del virus del papiloma humà

L2: gen d'expressió taranaa número 2 del virus del papiloma humà

LAST: Lower anogenital squamous terminology

LEEP: large loop electro-excision procedure

LLETZ: large loop excision of transformation zone

LR-HPV: virus del papiloma humà de baix risc (low-risk human papillomavirus)

LSIL: lesió intraepitelial escamosa de baix grau (Low-Grade Squamous intraepithelial Lesion)

m-RNA: àcid ribonucleic missatger (message Ribonucleic Acid)

NPCM: Negatiu Per a Cèl·lules Malignes

OMS: Organització Mundial de la Salut

p16: proteïna p16

p53: proteïna 53

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

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

pRb: proteïna del Retinoblastoma

RR: Risc Relatiu

SCC: Càncer de cèl·lules escamoses (squamous cell cancer)

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica

SEC: Sociedad Española de Citología

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

SIL: lesions intraepitelials

UEC: unió escamo-cilíndrica

VIH/HIV: Virus de la immunodeficiència humana

VPH: virus del papiloma humà

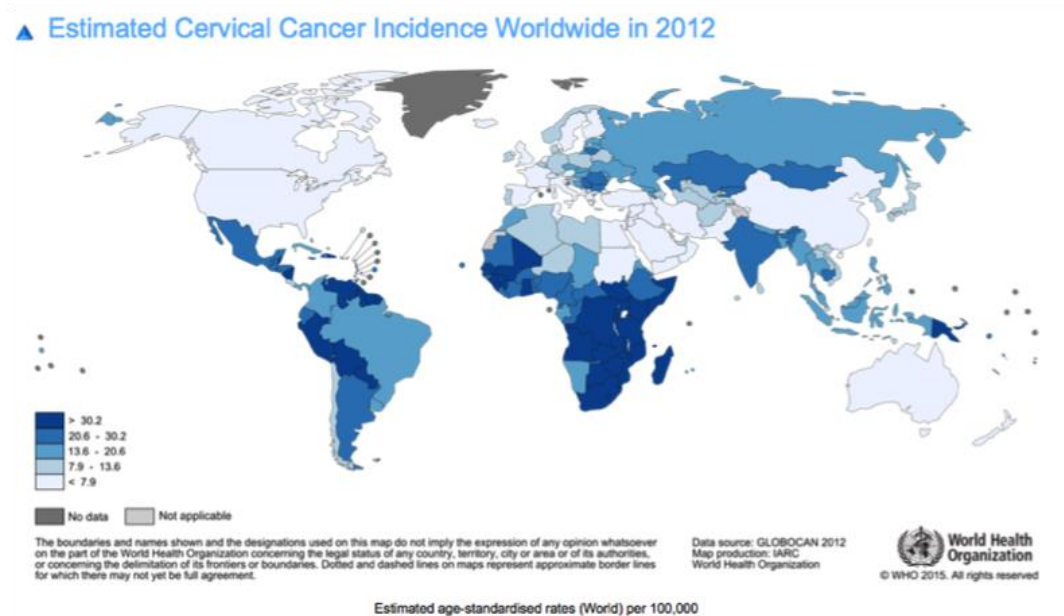
VPP : valor predictiu positiu

ZT: zona de transformació

1. INTRODUCCIÓ

1.1. CÀNCER DE CÈRVIX. EPIDEMIOLOGIA

A nivell mundial, la neoplàsia o càncer de cèrvix uterí (CCU) ocupa el 3er lloc dels càncers que afecten a les dones (1). El percentatge d'afectades varia molt segons els països, fins i tot arribant a ésser el càncer més prevalent en 39 de 184 països, principalment a Centre-Amèrica i Sud-Amèrica (2). La incidència anual del càncer inasor de cèrvix és de 500000 casos, sent la majoria en països en vies de desenvolupament, on probablement tenen importància factors com ètnia, VIH, i la falta de programes de cribratge (Gràfic 1).

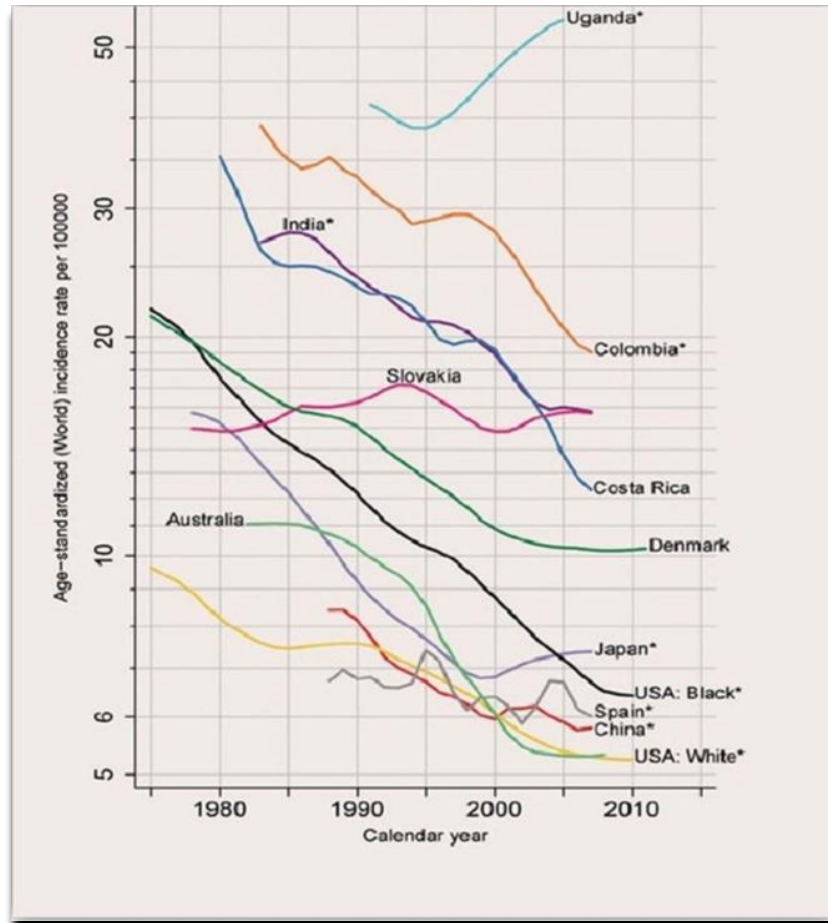


Gràfic 1. Incidència i mortalitat de CCU mundial. CANTERTODAY. <http://gco.iarc.fr>

Per contra, els països occidentals i mediterranis i Austràlia i Nova Zelanda, són on es troben les menors taxes de càncer inasor de cèrvix. A Europa va haver-hi un total de 58373 nous casos de CCU durant el 2012 (últimes dades oficials de la OMS), dels quals 24385 van morir.(3) En particular a Espanya, el càncer de cèrvix ocupa l'onzè lloc entre les neoplàsies més prevalents, tot i que en dones en edat fèrtil (entre 15 i 45 anys) és la primera causa de càncer inasor.

L'explicació d'aquesta baixa incidència en aquests territoris és degut a la posada en marxa de sistemes de cribratge de diferents tipus que detecten lesions precursors i

tumors en estadis precoços, augmentant la supervivència al 92% als 5 anys. . Aquesta reducció en la incidència ha anat acompanyada d'una reducció del 80% en la mortalitat per càncer de cèrvix entre les dones d'aquestes àrees geogràfiques (Gràfic 2).(4)



Gràfic 2. Incidència mundial de CCU en els anys. *CANCERTODAY*. <http://gco.iarc.fr>

El càncer de cèrvix té una història natural ben definida. Per a la seva aparició és indispensable tot i que no suficient, una infecció persistent pel Virus del Papiloma Humà o VPH, a nivell cervical.

El virus del papil·loma humà (VPH) és la causa necessària de la neoplàsia de cèrvix. La infecció persistent del VPH causa lesions precursors que de no ser resoltes evolucionaran a un càncer de cèrvix.

El VPH s'inclou dins una gran família de virus, els papillomaviridae, caracteritzats per una càpside proteica que protegeix un ADN circular de doble cadena, que tenen un especial trofisme pels epitelis, i alguns en concret per a l'epiteli anogenital. Un subgrup

de virus produeixen lesions benignes com els condilomes acuminats, però un altre subgrup de la família té capacitat oncogènica i són capaços de provocar lesions que acaben desenvolupant un càncer cervical. D'aquests virus amb més capacitat oncogènica en destaquen el 16 i el 18, els més prevalents i infectius, que causen el 70% dels CCU (5). Aquestes lesions precursors anomenades lesions intraepitelials cervicals apareixen a partir de l'epiteli escamós cervical, i contenen cèl·lules amb diferents graus de displàsia sense capacitat invasora. Segons el seu poder oncogènic aniran avançant amb el pas dels anys cap a un CCU, o bé regressant gràcies a la immunitat de la pacient cap a la curació.

La història natural de la infecció del VPH comença amb les primeres relacions sexuals, on el VPH infecta l'epiteli però la majoria de vegades de manera transitòria i desapercebuda. A partir dels 30 anys, disminueixen les infeccions de novo per VPH, però augmenta la incidència d'infeccions de VPH persistents, i en conseqüència de les lesions premalignes del coll uterí. Es a partir d'aquest moment on s'han dissenyat programes de cribatge per a la detecció d'aquestes infeccions persistents i per tant de risc de desenvolupar un CCU.

En el nostre medi tenim dos mètodes per a poder cribar persones en situació de risc de CCU. El més antic està basat en la realització d'una citologia cervicovaginal que ha demostrat ser eficaç en la disminució de la incidència de CCU. La citologia cervicovaginal, analitza anomalies morfològiques cel·lulars de les cèl·lules descamades de l'epiteli cervico-vaginal gràcies a la tinció de Papanicolau.

Durant l'última dècada s'ha introduït en el mètode de cribatge diferents tècniques per a la detecció de VPH amb capacitat oncogènica o d'alt risc en els frotis cel·lulars per a fer les citologies, augmentant la sensibilitat de la tècnica. A més a més, gràcies a la introducció del medi líquid podem afegir altres tècniques a la citologia, tal i com la determinació del VPH, però també altres tincions com la Tinció Dual per a p16 i Ki-67.

El cribatge a Espanya d'aquestes lesions premalignes és realitza amb la citologia que es pot realitzar sobre un medi sòlid o laminilla o amb un medi líquid com la citologia líquida. Aquest medi a més a més ens permet detectar el VPH i el seu tipus. Aquestes tècniques de detecció de VPH han demostrat en diversos estudis tenir una major sensibilitat per a la detecció de lesions premalignes, tot i tenir una menor especificitat. S'utilitzen en el cribatge a partir dels 35 anys, i en el control posterior a tractament de les lesions premalignes.

El cribratge per a carcinoma de cèrvix a Espanya varia en funció de cada comunitat autònoma, però en general és oportunista i amb resultat subòptim, ja que el 60% dels CCU es desenvolupen en dones amb un mal cribratge. Segons l'Associació de patologia cervical i colposcòpia (AEPCC) amb aquesta cobertura del cribratge en totes les dones sexualment actives a Espanya, s'estima que un total de 438358 tindran citologies anormals, entre les quals es trobaran 2511 carcinomes invasors de cèrvix cada any.

Es recomana l'inici del cribratge a partir dels 25 anys d'edat, havent-la de repetir a l'any següent, i si són normals, a partir d'aleshores es realitzarà cada 3 anys si no hi ha cap mena de factor de risc i la noia té parella estable. En cas de no tenir parella i tenir relacions sexuals esporàdiques, es recomana una citologia anual (6) A partir dels 35 anys, es pot seguir amb citologia cada 3 anys, o bé amb citologia més detecció de VPH cada 5 anys, fins als 65 anys.

1.2. LESIONS PRECURSORES DE CÀNCER DE COLL UTERÍ

El càncer de cèrvix sempre ve precedit per lesions premalignes anomenades neoplàsia intraepitelial cervical o CIN. Aquestes lesions tenen un lent creixement que pot durar varis anys, i es caracteritzen per diferents graus d'alteracions cel·lulars en el que s'anomena displàsia. La displàsia es defineix com a l'anormalitat en l'estructura de la cèl·lula degut a l'alteració del seu procés de formació i maduració com a resultat de canvis a nivell del seu ADN, i que provoca una alteració en les seves funcions.

El 1927 Papanicolau va publicar un estudi on descrivia la troballa de cèl·lules canceroses en extensions de fluids cervicals. L'any 1949 el mateix Papanicolau va introduir els conceptes de discariosi en la citologia, i de displàsia en la histologia. De seguida Reagan va postular que la majoria d'aquestes lesions eren transitòries, ja fos cap a la curació o cap al desenvolupament d'un càncer invasor cervical, i ja va introduir 3 nivells de displàsia: lleu, moderada, severa.(7,8)

El 1967 Richart va proposar un canvi de nomenclatura amb la introducció del terme Neoplàsia Intraepitelial Cervical (CIN) i les va graduar en 3 categories : CIN-1, CIN-2 i CIN-3, sent la de menor displàsia el CIN-1 i la de major el CIN-3.

Posteriorment es va voler ajuntar en un model binari de nomenclatura que facilités l'aplicació a la clínica, i el 1989 es va publicar el Sistema Bethesda. Aquest sistema agrupava les lesions més lleus, alteracions per infecció del VPH i CIN-1, en Baix Grau (de l'anglès Low SIL, L-SIL); i les lesions de CIN-2 i CIN-3 en lesions d'Alt Grau (High SIL, H-SIL) en funció de la seva capacitat de progressió i nivell d'alteració cel·lular. Aquesta classificació es va actualitzar l'any 2002. Taula 1.(9)

DISPLÀSIA (Reagan)		LLEU	MODERADA	SEVERA	CIS
CIN (Richart)	HPV	CIN-1	CIN-2	CIN-3	
SIL (Bethesda)	SIL BAIX GRAU L-SIL		SIL ALT GRAU H-SIL		

Taula 1. Evolució de la classificació de les lesions premalignes de cèrvix.

1. Negatiu per a lesió intraepitelial o malignitat

No existeix evidència de neoplàsia

2. Cèl·lules epitelials anormals

2.1. Cèl·lules escamoses

2.1.1. Cèl·lules escamoses atípiques (ASC)(atypical scamous cells)

- De significat indeterminat (ASC-US) (atypical scamous cells of undetermined significance)
- No poden excloure lesió escamosa intraepitelial d'alt grau (ASC-H) (atypical scamous cells cannot exclude HSIL)

2.1.2. Lesió intraepitelial escamosa de baix grau (LSIL)(inclou displàsia lleu/infecció VPH/CIN-1)

2.1.3. Lesió intraepitelial escamosa de alt grau (HSIL)(inclou displàsia moderada i severa/CIN-2 i CIN-3/Carcinoma in situ)

2.1.4. Amb característiques sospitoses d'invasió

2.1.5. Carcinoma escamós: negatiu per a lesió intraepitelial o malignitat

2.2. Cèl·lules glandulars

2.2.1. Cèl·lules glandulars atípiques (AGC): endocervicals, endometrials o glandulars sense especificar origen.

2.2.2. Cèl·lules glandulars atípiques possiblement neoplàsiques

2.2.3. Adenocarcinoma endocervical in situ (AIS)

2.2.4. Adenocarcinoma endocervical, endometrial, extrauterí, o sense especificar.

Taula 2. Sistema de classificació de la citologies cervical Bethesda 2001.

La divisió en 2 categories principals a la Classificació de Bethesda, volia evidenciar que hi ha un grup de lesions amb una alta tendència a la curació espontània i que tenen molt baix risc d'evolució a CCU (infecció per VPH i displàsia lleu, el grup L-SIL) i un altra grup que és de tamany menor (displàsies moderades i severes, i carcinoma in situ, agrupades al H-SIL) i que tenen un major risc d'evolució en CCU.

També es va introduir el concepte d'atípia escamosa o glandular de significat incert (ASC-US/AG-US) per a totes aquelles cèl·lules que no eren classificables dins categoria de baix o alt risc, i podies representar cèl·lules displàsiques o bé inflamatòries.

La classificació de Bethesda es va modificar varies vegades, fins a la definitiva del 2002. Taula 2. (10)

L'any 2012 es va crear el consens per a terminologia de lesions intraepiteliales causades pel VPH segons la seva localització, atès que la seva morfologia és molt similar independentment del lloc on es trobi. La terminologia LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) fa servir també la mateixa terminologia per a lesions de baix grau (L-SIL) i per a les d'alt grau (H-SIL) en les citologia. Per al resultat histopatològic, complementa el terme neoplàsia intraepitelial amb la lletra de l'epiteli on es troba la lesió (en el nostre cas Cervical: CIN)(11).

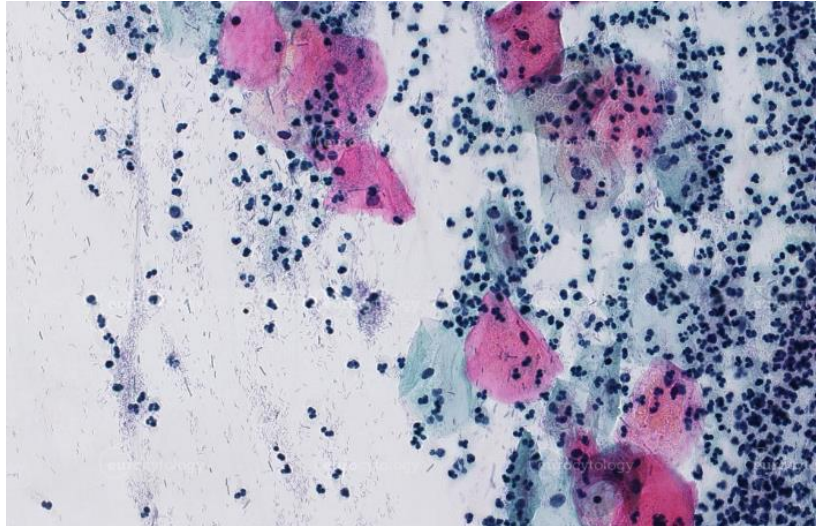
1.3. DIAGNÒSTICS CITOLÒGICS

En el cèrvix uterí hi ha un territori d'intercanvi constant de cèl·lules, l'anomenada zona de transició, on estan en contacte 2 tipus d'epitelis: un epiteli columnar provinent de l'endocèrvix que es confronta amb l'epiteli escamós de l'ectocèrvix i continua amb el de la vagina. Aquest punt exacte d'unió dels epitelis s'anomena «unió escamo-columnar», i és on es produeix el fenomen de metaplàsia escamosa quan l'epiteli columnar es transforma en escamós. Donat que és un lloc de constant recanvi cel·lular, és un punt molt susceptible d'infecció per VPH, i és on trobarem les lesions CIN, i per tant també els CCU.

Aquestes cèl·lules són fàcilment accessibles donat que es poden obtenir a partir de la seva exfoliació mitjançant una espàtula. A partir d'aquí es dipositen en un porta-objectes o bé en un medi líquid per a posteriorment ser tenyides i estudiades microscòpicament.

La presa de la citologia convencional en triple mostra consisteix en recollir epiteli exfoliat de vagina, ectocèrvix i endocèrvix. La tècnica continua fent una extensió del material obtingut a una laminilla, que es fixarà i realitzarà una tinció de Papanicolau per a identificar correctament la morfologia de les cèl·lules. La tinció de Papanicolau es basa en dues parts: la coloració nuclear i la citoplasmàtica. Per a la coloració del nucli cel·lular es necessita l'aplicació d'Hematoxilina de Harris, un colorant alcohòlic acidòfil amb afinitat per a les proteïnes nuclears.

Per a la tinció dels citoplasmes de les diferents cèl·lules que poden haver en un frotis cervico-vaginal, necessitarem 2 colorants, que respondran a les diferents afinitats electrostàtiques de cada tipus de membrana. El primer que s'aplica és el Orange G, un colorant sintètic àcid que tenyeix cèl·lules madures ben diferenciades, amb afinitat per a queratines d'alt pes molecular, provocant una coloració rosada o ataronjada segons el nivell de maduració. Després s'aplica el EA-50, una barreja de colorants formada per: Eosina, Verd llum, i Marró Bismark. La Eosina desplaçarà el Orange G donat que té una major afinitat electrostàtica, però només per a les superficials i intermitges de l'epiteli, i adquiriran coloració acidòfila o eosinòfila (rosa ataronjat). El Verd llum tenyeix citoplasmes de les cèl·lules menys diferenciades immadures, quedant a les capes basals i parabasals amb una coloració blava (basòfiles o cianofil·les). El Marró Bismark té afinitat per a la mucina, i donat que aquesta està present en les cèl·lules endocervicals, adquiriran aquest tipus de coloració.



Imatge 1. Citologia convencional normal amb tinció de Papanicolau. www.eurocytology.eu

A partir del 1996, s'introdueix la citologia de base líquida, a la que els mateixos exfoliats de cèl·lules obtinguts a partir del cèrvix uterí es barregen en el medi líquid. Posteriorment i de manera automatitzada es filtren i sedimenten les cèl·lules per a finalment ser dipositades en una monocapa que serà visualitzada al microscopi. L'avantatge principal a més a més de l'automatització y la rapidesa de la tècnica, és que es pot utilitzar la mateixa mostra per a posteriori realitzar altres tècniques com pot ser la identificació del VPH (12,13).

En funció de les característiques morfològiques i nuclears de les cèl·lules cervicals, s'estableixen diferents diagnòstics citològics directament correlacionats amb la possibilitat de progressió a lesions invasores o de curació. Les característiques que determinen les alteracions citològiques són principalment canvis en la mida del nucli, tipus de cromatina, relació nucli-citoplasma, maduració cel·lular i atípia.

1.3.1. L-SIL

La lesió de L-SIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) o Lesió escamosa intraepitelial de baix grau, és la lesió amb menor gradació i per tan amb menor capacitat de progressió.

Caracteritzada per cèl·lules escamoses madures, però que tenen grans nuclis 4-6 vegades més grans que els normals, hiper cromatisme, nuclis irregulars, binucleació.

Podem trobar també coilocitosi, que es defineix como un «halo» perinuclear citoplasmàtic. En el nucli podem trobar augment del tamany, membrana nuclear irregular, hipercromàsia, multinucleació, i canvis degeneratius com cromatina “tacada” o picnosi (Imatge 1a).

La seva versió histològica inclou els canvis per infecció de VPH i el CIN-1 (14).

1.3.2. H-SIL

La lesió d'H-SIL (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) o lesió escamosa intraepitelial d'alt grau, és la lesió amb major gradació i per tant la que major potencial oncogènic posseeix.

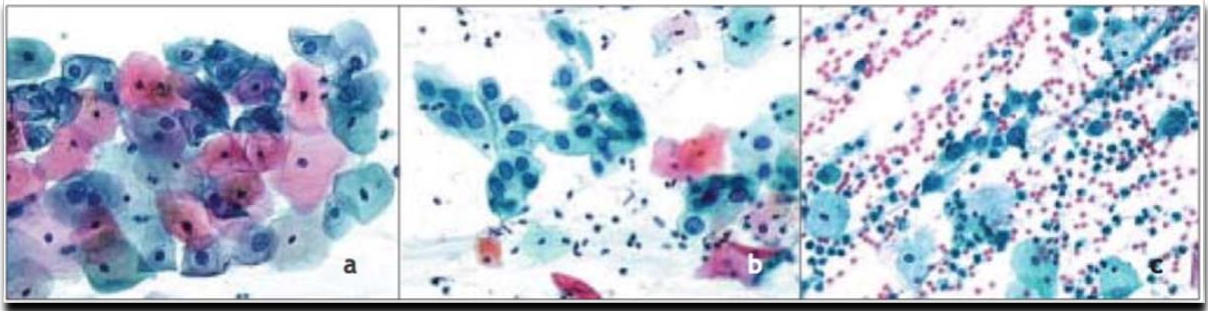
Al microscopi es pot observar un citoplasma immadur, un nucli anormal, i augment de la relació nucli-citoplasma. Els nuclis son 2 vegades majors als nuclis típics, ocupant més del 50% de la cèl·lula, hipercromàtics, amb membranes nuclears irregulars i amb anisonucleosi. En el citoplasma trobarem un ribetejat estret al voltant del nucli (14) (Imatge 1b, 1c).

La versió histològica inclou les lesions de CIN-2 i de CIN-3.

1.3.3. ASC-US / ASC-H

Aquest acrònim en anglès fa referència a la presència de cèl·lules escamoses atípiques de significat incert (ASC-US: Atypical squamous cells of unknown significance) o bé de cèl·lules escamoses atípiques suggestives de lesió d'alt grau (ASC-H: atypical squamous cells cannot exclude H-SIL) a l'exfoliat cervical.

Es tracta de lesions cervicals intraepitelials que amb les seves característiques no acaben d'encaixar en les L-SIL ni en les H-SIL. És necessari que el seu diagnòstic s'acompanyi del diagnòstic de VPH, de manera que ens ajudi a sospitar o no una lesió d'alt grau oculta. En el ASC-US hi ha d'un 10-20% de lesions d'alt grau ocultes, i en el ASC-H en trobem entre el 30-60%.



Imatge 2. Aspecte citologia: a) LSIL, i b) c) HSIL. www.eurocytology.eu

1.4. DIAGNÒSTICS HISTOLÒGICS

Les alteracions citològiques són una sospita diagnòstica. El diagnòstic de certesa s'estableix a partir de l'estudi histològic d'una mostra de teixit cervical. El diagnòstic de lesió cervical requereix per tant de la realització d'una biòpsia dirigida, mitjançant una colposcòpia.

La colposcòpia és una tècnica ginecològica basada en l'observació directa del cèrvix uterí mitjançant una lent d'augment i de diferents tipus de llum. Per a localitzar la possible lesió intraepitelial s'aplica àcid acètic i lugol, per tal de fer resaltar la zona de lesió, identificar-la, poder veure les seves característiques, i si es creu adient biopsiar-la. Això és possible gràcies a que l'àcid acètic coagula les proteïnes de les cèl·lules displàsiques i podem observar quina estructura histològica adopten en relació als vasos que passen a través del teixit. Això ens donarà el patró colposcòpic, que es defineix com a l'aspecte que adquireix l'epiteli davant l'agressió del virus del VPH i com resol la formació dels seus vasos, quedant de manifest amb l'aplicació de l'àcid acètic. Aquestes característiques morfològiques es correlacionen directament amb el grau de lesió, de manera que amb la visió directa apareix una sospita diagnòstica de displàsia. El que fa el lugol, ric en iode, és tintar l'epiteli ric en glucogen de color fosc, com és el cas de l'epiteli escamós sà. Les zones displàsiques tenen menys quantitat de glucogen, per la qual quedaran molt poc tenyides de lugol.



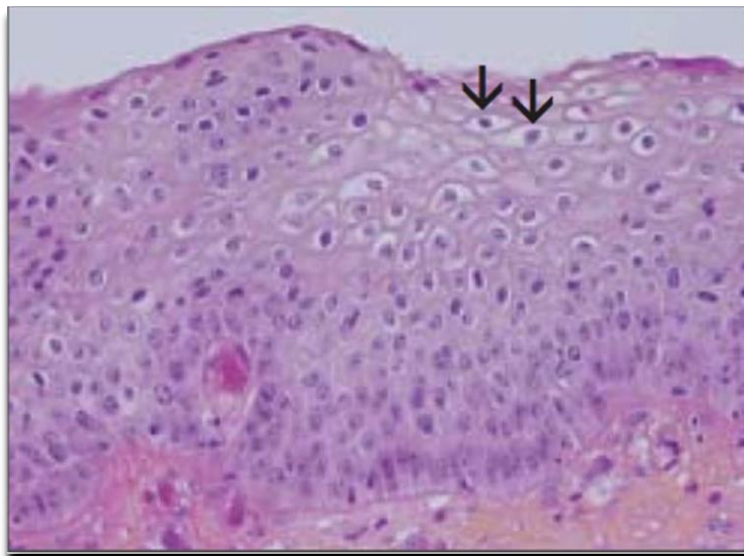
Imatge 3 Aspecte cèrvix en aplicar àcid acètic i mostrar un patró acetoblanc.

S'ha de biopsiar la zona que tingui més característiques patològiques segons els patrons establerts de colposcòpia, però en cas de dubte, s'ha de realitzar diverses biòpsies cervicals i anotar correctament la posició de la biòpsia. També és important

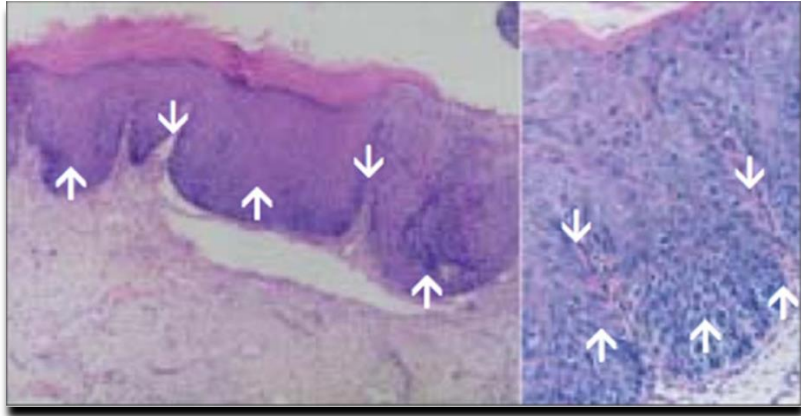
que la biòpsia sigui profunda, perquè així podrem observar l'estroma cervical i identificar una possible infiltració (15).

A l'hora de diagnosticar el grau de la displàsia, l'anatomopatòleg haurà de mesurar quina és la profunditat de la lesió en l'epiteli biopsiat, mitjançant una tinció d'hematoxilina-eosina. Lesions es classificaran en: displàsia lleu o CIN-1 quan la displàsia afecti el terç intern de l'epiteli (imatge 4); es classificarà en displàsia moderada o CIN-2 quan la displàsia afecti el terç intern i mig de l'epiteli (imatge 5); i finalment en una displàsia severa o CIN-3 quan la displàsia afecti a tot el gruix de l'epiteli (imatge 6).

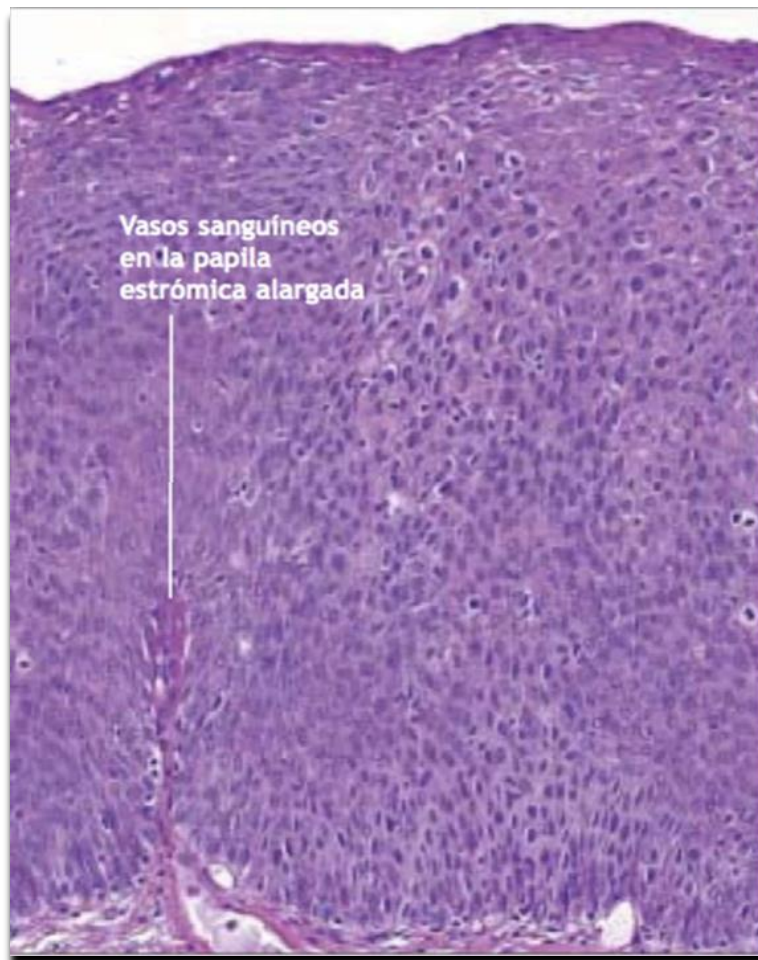
És important que es realitzi un correcte diagnòstic anatomopatològic per a classificar en els diferents graus de displàsia, ja que d'aquestes característiques en dependrà interpretar el seu comportament, i el seu maneig i el possible tractament.



Imatge 4. Biòpsia de CIN-1. www.eurocytology.eu



Imatge 5. Imatge 3. Biòpsia de CIN-2. www.eurocytology.eu



Imatge 6. Biòpsia de CIN-3. www.eurocytology.eu

1.5. HISTÒRIA NATURAL DE LES DISPLÀSIES CERVICALS

La història natural de les lesions intraepitelials es defineix com a la probabilitat que aquestes lesions es curin, regressin a un grau inferior, persisteixin o bé evolucionin a un grau superior. D'aquí la necessitat d'un bon diagnòstic anatomopatològic que ens defineixi bé la lesió. En alguna ocasió s'ha posat de manifest la dificultat de definir algunes lesions, que causen disparitat d'opinions entre diferents patòlegs, i evidencia la subjectivitat d'alguns diagnòstics. Això ha posat en evidència la necessitat d'utilitzar marcadors que ens diguin de manera objectiva quin naturalment té la lesió amb la que estem treballant, i ens predigui quin comportament és el més probable per a poder trobar el millor maneig i si fos necessari el tractament adequat per a la pacient.

Entre la infecció per VPH inicial i l'aparició de la lesió poden passar des de mesos a anys, depenent de les diferents variables com característiques intrínseques de cada pacient (genètica, immunitat, estat nutricional, hàbit tabàquic), i altres cofactors com presència d'hormones, inflamació crònica o bé el tipus de virus causant de la infecció(16)(17).

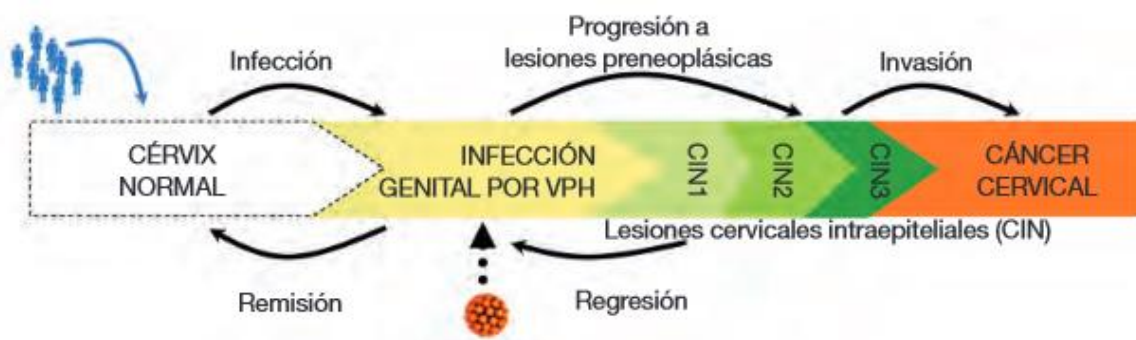


Figura 1. Història Natural del VPH. AEPC.

Nombrosos estudis han intentat entendre el comportament de les lesions per VPH, i tot i a ser estudis diferents i amb diferents metodologies, s'ha aconseguit un consens a l'hora de predir el comportament de cada tipus de lesió.

L'any 1993 Olson i col van intentar resumir els estudis sobre el comportament de les lesions cervicals publicats entre el 1950 i el 1993. El seu grup va afirmar que el CIN-1 tenia una regressió a curació del 57%, mentre el CIN-2 era de 43% i el CIN-3 del 32%. Del CIN-1 va observar una progressió a Ca in situ del 11%, i a carcinoma invasor del 1%. En el CIN-2 va veure una progressió a Ca in situ de 22% i a carcinoma invasor del 5%. I en el CIN-3 va veure que podien progressar a carcinoma invasiu fins a un 12% (Taula 3) (18).

Categoria CIN	Regressió	Persistència	Progressió CIN-3	Progressió a carcinoma invasor
CIN-1	57%	32%	11%	1%
CIN-2	43%	35%	22%	1,5%
CIN-3	32%	56%	-	12%

Taula 3. Evolució de les displàsies cervicals segons Olson (18)

En un metanàlisi de l'any 1980, Melnikow i col. van estudiar 27000 dones i les seves citologies per a trobar les taxes de HSIL i de carcinoma invasor als 24 mesos d'observació. En les lesions ASC-US es va trobar una taxa de lesió invasiva de 0,25% i de regressió de 68%. En els L-SIL de 0,15% i de 47% respectivament. En els H-SIL de 1,44% i de 25% respectivament. Les seves troballes suggerien que era segur controlar les lesions de ASC-US i de L-SIL fins a 24 mesos pel baix risc de progressar a carcinoma invasor, però abans calia un estudi detallat del cèrvix per descartar la presència d'una lesió H-SIL (19).

Altres autors com Mitchell i col va establir que un 45% de lesions cervicals en general regressaven, 31% persistien, un 23% progressaven (20). I McIndoe i col va observar taxes de malaltia invasiva en un 29-36% en el seguiment de CIN-3 i de carcinomes in situ (21).

En general s'ha acceptat que les lesions van seguint el seu curs natural segons les seves característiques biològiques i els factors ambientals que interactuen. D'aquesta

manera una infecció per VPH oncogènic esdevindrà una lesió de baix grau, que amb el temps evolucionarà fins a una lesió d'alt grau, que finalment adquirirà poder invasiu i es transformarà en un CCU. S'ha calculat un temps mig entre la infecció inicial del VPH i el desenvolupament de CIN-3 de 7 a 15 anys. Tot i així, hi ha investigadors que han postulat sobre la possibilitat que algunes lesions neixin directament com a lesions de baix o d'alt grau, i que en poc temps, les d'alt grau a base d'acumular ràpidament alteracions genètiques, esdevinguin carcinomes invasius de cèrvix (22–24).

1.6. VIRUS DEL PAPILOMA HUMÀ (VPH)

1.6.1. ESTRUCTURA I GENOTIPS

El virus del papil·loma humà (VPH) pertany a un gran grup de virus de petit tamany de la família dels Papillomaviridae. Aquesta família comprèn 16 gèneres, i només 5 dels quals són capaços d'infectar pell i mucoses humanes, formant el grup dels virus del papiloma humà (Figura 2).

EL VPH va ser descobert fa 30 anys per Orth i col, i per Coggin i zur Hausen (25,26) el que els va suposar guanyar el premi Nobel l'any 2008. Tot i així, el gran avenç clínic va tenir lloc a partir del 1985 amb l'aïllament de la gran majoria de VPH, i classificació d'aquests en famílies i gèneres, gràcies a la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). (26). Durant l'últim segle s'han identificat més de 200 genotips que s'han dividit en diferents grups (alpha-, Nu-/Mu-, Neta-, Gamma-papillomavirus) segons la seva estructura i el seu tropisme pels teixits humans (Figura 2) (25). El grup alfa inclou genotips que causen càncer, mentre el grup Neta i el Gamma causen infeccions normalment asimptomàtiques que en estats d'immunosupressió poden conduir cap a berrugues cutànies o predisposar càncer de pell.

La taula 4 recull els VPH que més freqüentment s'associen a patologia en humans. Destacar que s'han identificat 12 tipus (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, i 59), els anomenats d'Alt Risc (HR-HPV) que han estat classificats com a carcinogènics per als humans segons la International Agency for Research on Cancer (IARC). Els tipus 6 i 11 sempre generalment causen malalties benignes com berrugues genitals. Altres tipus classificats com a possiblement carcinogènics es troben molt poc freqüentment en estudis de càncers, de manera que encara estan per estudiar més en profunditat (27,28).

VPH	Genotips	Malaltia associada
Alt risc o oncogènic	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Càncer cervical, anal, vaginal, vulvar i orofaringi, i lesions precursors associades
Baix risc	VPH 6, 11	Berrugues genitals, papil·lomatosi respiratòria recurrent
Probable carcinogènics	VPH 68	Càncer cervical
Possible carcinogènics	VPH 5, 8	Carcinoma escamós de la pell en pacients afectes de epidermodisplàsia verruciforme
Possible carcinogènics	VPH 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, i 97	Incert

Taula 4. Virus alt i baix risc. *Lancet Oncol* 2009 A review of human carcinògens. Bouvard V (29).

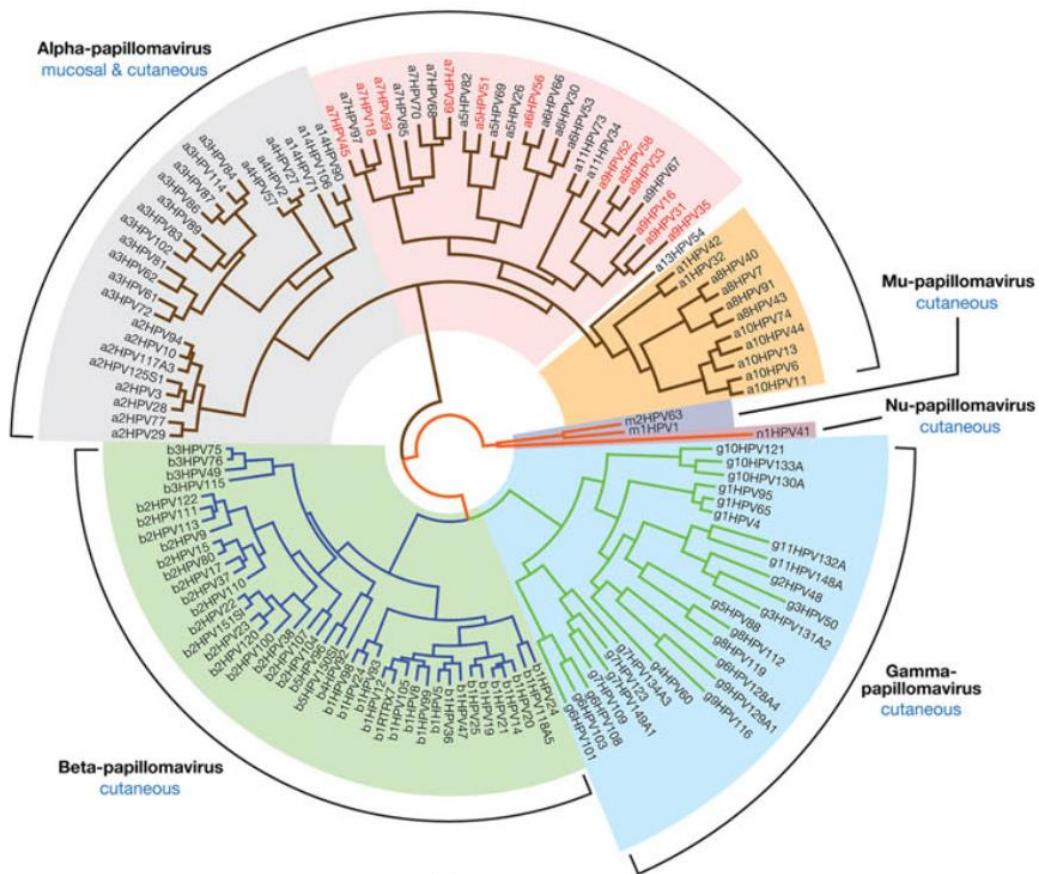


Figura 2. Arbre genealògic VPH (25).

El VPH és un ADN virus circular envoltat per una càpsida proteica. Aquest ADN conté informació sobre proteïnes de la càpsida a la regió L (de l'anglès Late, expressió tardana) i sobre proteïnes estructurals del virus a la regió E (de l'anglès Early, expressió temprana).

Les proteïnes L1 serviran per a classificar els diferents genotips de virus, i poder establir si es tracten de virus d'alt risc oncogènic (HR-HPV) o de baix risc (LR-HPV)(29).

Les proteïnes E, en concret E6 i E7 tenen una funció en l'acció oncogènica del virus. Aquestes proteïnes E6 i E7 interaccionen amb les proteïnes del retinoblastoma, fent que la cèl·lula estigui en constant activitat mitòtica, i amb la proteïna p53 de manera que es bloqueja l'apoptosi. També cal destacar l'acció de la proteïna E2 que actua regulant les anteriors E6 i E7. Tal i com veurem més endavant, aquest és un punt a destacar de cara a trobar un marcador biològic útil en la pràctica clínica, ja que la

proteïna p16, una ciclina que controla el cicle cel·lular, es veu augmentada en cas que el virus bloquegi la p53 mitjançant els seves oncoproteïnes (Figura 3).

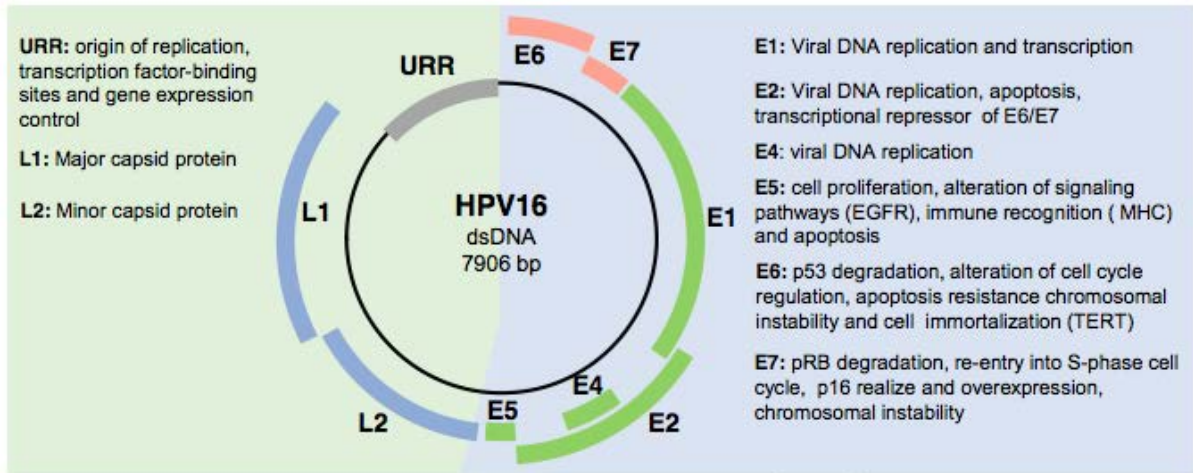


Figura 3. estructura genètica VPH. (31)

1.6.2. HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PER VPH

Existeix un gran consens entre la societat científica que accepta la gran associació observada entre el VPH i el càncer de cèrvix, una de les més fortes en la cancerologia humana. Així es pot qualificar la infecció per VPH com a causa necessària (absència de malaltia en absència d'infecció) però insuficient (presència d'infecció sense presència de malaltia) per a l'aparició de CCU.

La infecció pel VPH habitualment s'adquireix per via sexual. Estudis recents han mostrat una associació del 20-30% amb la transmissió vertical (30,31), tot i que aquestes infeccions són eliminades gairebé al 100% durant el primer any de vida dels nadons segons els resultats de la majoria d'estudis (32).

El VPH té una altíssima infectivitat, però tot i això, sabem que durant els primers 6 mesos el 50% de les dones l'eliminaran. Passat un any l'hauran eliminat el 70%, i fins a un 92% als 2 anys (33).

El cicle del VPH comença amb la infecció a través de microtraumes a l'epiteli arribant a les cèl·lules de la capa basal (34). En aquests moments hi ha una càrrega genètica de poques còpies en les cèl·lules hostes. Conforme aquestes cèl·lules es van replicant, el virus també ho va fent, i va augmentant el nombre de còpies de genoma i va expressant els gens de la càpside (L1 i L2). D'això en resultarà una nova fornada de virions que s'alliberaran a la superfície de la mucosa. Aquest cicle es va repetint amb les cèl·lules basals, de manera que es produeix la persistència viral (35). En el cas de virus de baix risc, aquest procés es dona menys freqüentment. En canvi, els virus d'alt risc tenen molta més tendència a produir aquest cicle infectiu.

Les zones de transició d'epitelis, on hi ha un recanvi constant en el tipus de cèl·lules, com és el cas de endo i ectocèrvix, i unió ano-rectal, són especialment susceptibles en la infecció per VPH (36).

Són els virus HR-HPV els que són capaços de produir infeccions que derivaran en alteracions de vies cel·lulars, que acabaran en transformació epitelial i oncogènesi. Una explicació plausible per a la capacitat oncogènica augmentada està basada en les oncoproteïnes E6 i E7. Tot i estar presents en tots els tipus de virus, d'alt i baix risc, aquestes proteïnes funcionen a major rendiment en els d'alt risc per a augmentar la producció de virions i assegurant que el virus es manté infectant l'epiteli, i acabant afavorint la transició cap a una infecció que modifiquen vies metabòliques cel·lulars que acaben en alteracions genètiques i l'oncogènesi (37).

Els HR-HPV han desenvolupat mecanismes per a evitar la resposta del sistema immune i així poder persistir i seguir amb la progressió de lesions pre-neoplàsiques. Una estratègia es basaria en mantenir-se com a virus intracel·lular sense provocar la lisi de la cèl·lula, i així no provocar cap resposta en les cèl·lules presentadores d'antígens o mediadores de resposta immune com les cèl·lules de Langerhans. D'aquesta manera evitarien que es produeixin citocines de resposta, de manera que hi hagi una resposta inflamatòria molt lleu o gairebé absent quan l'epiteli és infectat pel VPH(38,39). També s'han descrit mecanismes com inhibició de la senyal de l'interferó, inhibició de les cèl·lules de Langerhans mitjançant E6 i E7, modulació de senyals intracel·lulars i inhibició de l'adherència de molècules transmissores d'informació a la membrana cel·lular.

El mecanisme pel qual els HR-HPV poden transformar una cèl·lula de l'epiteli cervical en preneoplàsica es basa en l'acció de les proteïnes E6 i E7(40). Aquestes proteïnes inhibeixen la proteïna p53 i la pRB, dues proteïnes relacionades amb la supressió tumoral i inducció a l'apoptosi. A més, la E6 activa proteïnes com la telomerasa o desregula vies relacionades en la resposta immune, diferenciació epitelial o proliferació cel·lular. També cal afegir accions de la E7 com augmentar la inestabilitat cromosòmica fent que s'acumulin errors de transcripció. Totes aquestes accions, afegit a la inhibició de la proteïna viral E2, que controla la E6 i E7, crea un ambient molt favorable per a la transformació neoplàsica epitelial(41).

La majoria de lesions ano-genitals per infecció de VPH són adquirides a través de contacte sexual, i la persistència d'aquesta infecció ve determinada per l'acumulació de contactes sexuals i el comportament sexual de l'hoste (42). Una nova infecció es pot detectar just després del contacte sexual en un individu infectat (43,44).

El resultat d'aquesta alta transmissió és que les infeccions per VPH són molt freqüents en dones joves, de fet hi ha un pic d'infecció entre els 20-25 anys d'edat. Després hi ha un lent descens de la incidència, justificat per la negativització de la infecció, i a la disminució dels contactes sexuals. Segons algunes zones geogràfiques, existeix un segon pic d'infecció en la postmenopausa, que no ha estat del tot entès (5,45,46). Hi ha estudis que confirmen que a una major promiscüïtat, hi ha un major nombre d'infeccions(47,48).

Durant els seguiments de les dones infectades per VPH, s'ha vist que fins el 50% de les infeccions es curen als 6 mesos de control, i fins al 90% en els 2 anys següents (49,50).

La resposta inflamatòria del Sistema Immune té la clau a l'hora de negativitzar el virus. S'ha vist que els limfòcits Th1 (cèl·lules sanguínees encarregades de presentar antígens sobretot a macròfags per a desencadenar una resposta immune) tenen una funció important en la mediació de la resposta(51).

Les infeccions persistents per part de HR-HPV determinen el risc de CCU. Si bé no queda clara la definició de persistent, alguns estudis la defineixen a partir de 2 anys de la mateixa infecció (52).

En aquesta minoria de dones que persisteix la infecció del VPH, la lesió evolucionarà a CIN o carcinoma invasor entre uns 5 a 14 anys respectivament de mitja, si no es detecta i es tracta abans.

Globalment, el 5% de lesions produïdes per HR-HPV en poblacions sense cribratge evolucionaran a càncer. En canvi, en poblacions amb programes de cribratge només serà de 1-2% de totes les infeccions per HR-HPV.

A part de les característiques del virus, hi ha factors exògens que poden interactuar i canviar la història natural de la infecció per VPH. Varis factors s'han estudiat que poden influir en la persistència del VPH, i provocar que una lesió preinvasiva evolucioni a càncer invasiu. Destaquen el tipus de dieta, hàbits sexuals, reproducció, anticonceptius orals, tabaquisme, altres infeccions de transmissió sexual com ara la Chlamidia Trachomatis (53–57). Però els que únicament s'ha demostrat que estan relacionats són la immunodeficiència i el genotip viral (58,59).

1.6.3. COFACTORS IMPLICATS EN LA CARCINOGENÈSI DEL VPH

Per a que una infecció per VPH no es resolgui espontàniament i passi desapercebuda cal la presència d'una sèrie de factors que facin un ambient propici per al manteniment de la infecció i per al seu desenvolupament a una lesió de tipus CIN i finalment l'aparició d'un CCU.

1.6.3.1. EDAT

L'edat és un dels principals factors a l'hora de prendre decisions sobre el VPH i les seves lesions. La figura 4 ens resumeix l'evolució de la infecció del VPH al llarg dels anys de vida.

Existeix una alta prevalença de VPH en les primeres edats d'activitat sexual entre aproximadament els 15 anys i fins els 25 anys, que en seguirà un descens i estabilitat entre els 25-40 anys, precisament on quedaran les infeccions persistents i formant el grup de risc per a progressió a càncer. Cal ressaltar que en edats joves amb alta prevalença per VPH, on hi ha major activitat sexual i promiscuïtat, les infeccions per VPH es resolen espontàniament en més d'un 90% aproximadament en 2-3 anys, i una

mínima fracció de les infeccions persisteix(53,60). Aquest petit grup de dones portadores de VPH serà el grup de risc abans citat (61,62).

La tendència serà que a mesura que passen els anys es tendeix a tenir menys parelles sexuals, i la prevalença del VPH baixarà.

A partir dels 45 anys les infeccions del VPH s'estabilitzen i només un 5% de les dones tenen infecció per HR-HPV. Existeix un segon pic d'infecció per VPH en algunes poblacions, però no s'ha aconseguit entendre'n la causa. S'ha especulat amb un hipotètic descens de la immunitat natural de les dones post-menopàusiques, amb una possible reactivació d'una infecció latent o bé per a exposició a una nova parella sexual. S'ha descrit certa protecció davant els genotips que han produït la infecció, davant noves infeccions pels mateixos(63).

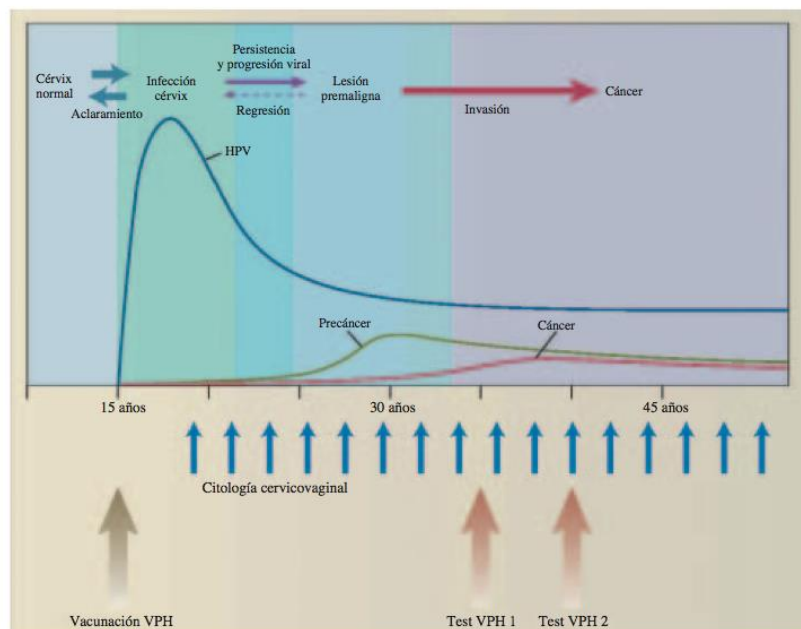


Figura 4. Història natural de la infecció per VPH i el càncer de cèrvix per Schiffman.

En edats fèrtils la distància entre incidència de VPH i la mortalitat és màxima, mentre que en edats avançades la tendència és la confluència entre infecció amb lesió precursora i càncer amb mal pronòstic. També reflexa la major susceptibilitat de pacients en edat avançada donat la pitjor sensibilitat del criatge i del pitjor pronòstic del CCU(64).

En un estudi als EUA per Benard realitzat l'any 2012 (65), es va estudiar durant 9 anys la incidència del CCU cobrint el 92% de la població d'Estats Units durant el període 1999-2008. En dones menors de 40 anys, el 78% dels CCU es diagnosticaven entre els 30-39 anys, el 21% entre els 20-29 anys, i el 1% en dones menors de 20 anys. Va haver-hi un total de 3063 càncers durant el període descrit, 14 dels quals en edats entre els 15-19 anys (incidència de 0.5 per cada 100000), i 125 entre els 20-25 anys d'edat (incidència de 1.4 per cada 100000) (Taula 5).

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

Taula 5. Incidència de CCU per edats segons Bernard (67)

*Taxa calculada per 100.000 dones

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

Un altre estudi sobre la incidència de CCU en pacients joves durant el període 2003-2010 fet per Katki el 2013 (66) estudiava el risc de CIN-3+ i càncer a 5 anys en un programa de cribatge durant 7 anys a l'estat de Califòrnia. Es van diagnosticar 3 casos de CCU en el seguiment de 130000 pacients de entre 21-14 anys d'edat.

Pacients de 21-24 anys amb ASCUS/LSIL tenen un risc de CIN-3+del 3% en els posteriors 5 anys, i les que tenien una citologia prèvia de HSIL tenen un risc de CIN-3+ del 28% i de càncer del 0%. En majors de 30 anys el risc passa a ser de 47% i 7.3% respectivament (Taula 6).

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

Taula 6. Risc acumulat en 5 anys de CIN3+ i càncer segons Katki 2013

Això justifica que en els protocols no es recomani iniciar cribatge cervical abans dels 25 anys.

1.6.3.2. TABAC

És sabut que en general el tabac és un dels principals agents carcinogènics. Les dades publicades indiquen que les pacients amb VPH positiu i fumadores tenen un risc de 2 a 4 vegades més de desenvolupar CIN3 i càncer de cèrvix que les no fumadores, augmentant progressivament el risc amb el nombre de cigarrets per dia i amb l'edat d'inici de fumar més precoç (67). A més a més, el fet de deixar de fumar o disminuir el tabac s'ha associat amb un augment de les taxes de regressió de les infeccions del VPH(68,69).

L'associació del consum de tabac amb el càncer de cèrvix en dones amb VPH positiu és biològicament plausible, ja que substàncies carcinogèniques presents en el tabac s'han aïllat de forma consistent en el moc cervical, contribuint a cronificar la infecció pel VPH. Cal dir que les dades existents són molt limitades, i no es coneix bé el mecanisme pel qual interacciona en el cicle vital del VPH(70).

1.6.3.3. CONDUCTA SEXUAL

L'arribada del VPH es produeix per contacte sexual majoritàriament. Els llocs més susceptibles d'invasió viral són zones del cos amb un ràpid recanvi i diferenciació cel·lular com la zona de transformació escamo-columnar del cèrvix. Per tant és lògic pensar que la conducta sexual pot ser un cofactor en el desenvolupament del càncer de cèrvix ja que a major nombre de contactes sexuals, major probabilitat d'entrar en contacte amb el VPH.

Nombrosos estudis han mostrat que la conducta sexual, específicament el nombre de parelles sexuals és el factor determinant per l'augment de la detecció del VPH, ja que en dones dedicades a la prostitució, la prevalença del VPH està més augmentada, al voltant del 48% a Japó, del 50% a Mèxic i del 61,6% a Espanya(71) i conseqüent tenen més risc de lesions preinvasives i càncer de cèrvix(72). L'edat de la primera relació sexual també és un conegut factor de risc per la infecció del VPH, ja que sabem que la prevalença del VPH més alta es troba en edats immediates a l'inici de les relacions sexuals. En grups d'edat entre 15 i 25 anys, si es tenen diferents parelles sexuals, la infecció pel VPH arriba a una prevalença de fins el 30-40%(73).

Estudis epidemiològics en dones d'edats avançada indiquen també una forta associació entre les noves parelles sexuals i la incidència d'infecció pel VPH,

concloent que el comportament sexual de risc condueix a un major nombre d'infeccions pel VPH, també en aquest grup d'edat(74,75).

Altres infeccions cervico-vaginals també s'han descrit com a cofactors de la infecció del VPH, induint la inflamació crònica, com en el cas de la Clamídia trachomatis i l'Herpes simple tipus 2(76,77).

1.6.3.4. PARITAT

Les dades publicades demostren que existeix una forta associació entre el CCU i la paritat(78), però el mecanisme no està clar. Una de les explicacions suggerida és que l'alta paritat augmenta el risc de càncer de cèrvix mitjançant el manteniment durant molts anys de la zona de transformació a l'exocèrvix, fet que pot facilitar l'exposició al VPH, així com també factors hormonals de l'embaràs (79) o els traumatismes cervicals durant el part podrien afavorir la progressió de les lesions(80) .

1.6.3.5. ANTICONCEPCIÓ HORMONAL

La planificació familiar també és un factor a tenir en compte a l'hora de buscar causes i mecanismes pels quals es desenvolupen les lesions CIN i el CCU. Els estudis han trobat relació entre l'ús d'anticoncepció hormonal oral combinada (ACHO) i el risc de càncer de cèrvix, però és un tema controvertit i complex. Tot i que el risc de molts altres càncers és menor en les usuàries de ACHO que en les no usuàries, les taxes de càncer de cèrvix són generalment més altes entre les usuàries. Les revisions sistemàtiques d'estudis epidemiològics observacionals han trobat una associació entre el risc de càncer de cèrvix i l'ús prolongat d'anticonceptius hormonals durant 5 anys o més, encara que el risc tendia a disminuir, però no a desaparèixer, quan deixaven de prendre'ls(54).

La controvèrsia recau en factors de confusió en aquesta relació entre ACHO i CCU, com poden ser la reducció de l'ús del mètode barrera en dones que utilitzen ACHO, la multiparitat, l'edat d'inici de les relacions sexuals o la història familiar, entre d'altres.

A més a més s'ha comprovat que el preservatiu és un factor protector i ajuda a promoure la regressió de les lesions intraepitelials amb l'eliminació del VPH, però no evita de forma total el contagi ni l'adquisició de les lesions precursors(81–83).

1.6.3.6. IMMUNITAT

El paper com a factor de risc en la progressió de les infeccions i lesions per VPH es va establir a partir d'observar una major incidència i taxes de progressió de les lesions CIN en dones infectades per VIH(84). Un estudi de l'any 2000 descrivia taxes de infecció persistent en infectades per VIH del 79% davant el 48% en dones sanes, a més de major prevalença de VPH en dones amb un recompte de CD4 menor a 200 cèl/mcL. També es va registrar major incidència de lesions CIN-2+ i CIN-3+ en les dones VIH positives (84).

1.6.4. GENOTIPS DEL VPH I LA SEVA RELACIÓ AMB CIN I CCU

Ja hem comentat que per a l'aparició de una lesió intraepitelial preinvasiva és necessària la presència d'una infecció per VPH, però que a més sigui persistent. Si aquesta lesió no es resol, podrà evolucionar a un CCU.

Els genotips de VPH amb capacitat oncogènica són els anomenats HR-HPV, i tenen unes característiques que els proporcionen la capacitat de mantenir-se en l'epiteli cervical i seguir provocant alteracions a les cèl·lules que desemboquin en una displàsia. El VPH 16 i el 18 expliquen el 70% de les neoplàsies de cèrvix uterí. La resta de HR-HPV (45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39) són causants del restant 25-30%. Això indica que el genotip de la infecció pot fer variar l'evolució de la lesió.

Molts estudis han intentat trobar la relació entre el genotip viral i el tipus i evolució de la lesió cervical. El 2003 es va publicar un meta-anàlisi per Clifford, que intentava relacionar els genotips del VPH i la lesió HSIL o carcinoma invasor (Taula 7). En les lesions invasores es va trobar sobretot VPH tipus 16, 18 i 45, en major proporció que en lesions HSIL. Sempre el més freqüent era el tipus 16, tan en HSIL com en lesions invasores(85).

HPV type	SCC		HSIL		SCC : HSIL	
	<i>n</i>	HPV (%)	<i>n</i>	HPV (%)	prevalence ratio ^a	
All	8550	87.6	4338	84.2	1.04	(1.03, 1.06)
16	8594	54.3	4338	45.0	1.21	(1.16, 1.26)
18	8502	12.6	4338	7.1	1.79	(1.56, 2.10)
33	8449	4.3	4302	7.2	0.59	(0.53, 0.68)
45	5174	4.2	2214	2.3	1.85	(1.35, 2.91)
31	7204	4.2	4036	8.8	0.48	(0.43, 0.54)
58	5646	3.0	2175	6.9	0.43	(0.37, 0.52)
52	5304	2.5	2153	5.2	0.48	(0.40, 0.60)
35	6223	1.0	2690	4.4	0.22	(0.18, 0.27)
59	4488	0.8	1636	1.5	0.55	(0.38, 0.97)
56	4493	0.7	2110	3.0	0.23	(0.18, 0.31)
51	4580	0.6	2171	2.9	0.20	(0.16, 0.27)
68	4148	0.5	1763	1.0	0.50	(0.33, 1.04)
39	3899	0.4	1841	1.1	0.35	(0.24, 0.66)
66	4799	0.2	1778	2.1	0.10	(0.08, 0.15)

Taula 7. distribució de genotips de VPH segons HSIL i CCU segons Cliffort i col.

El 2004 Zuna i col. van presentar un estudi de les distribucions de genotips de VPH determinats en medi líquid i PCR, també en lesions HSIL i CCU (tan el de tipus escamós, com el de tipus adenocarcinoma (Taula 8). Van observar que VPH-16 era més freqüent com més severa era la lesió (86).

Diagnosis	HPV 16 only^a n (%)^b	HPV 16 and other HPV^c n (%)	Total HPV 16+ n (%)	HPV+ but not HPV 16^d n (%)	Total cases
HSIL-M	4 (15)	3 (11)	7 (26)	20 (74)	27
HSIL-S	13 (46)	6 (21)	19 (68)	9 (32)	28
All HSIL	17 (31)	9 (16)	26 (47)	29 (53)	55
Carcinoma ^e	25 (53)	4 (9)	29 (62)	15 (32)	47 ^f

^a HPV 16 present as single HPV type.

^b Percentages calculated across the rows.

^c HPV 16 present as one of two or more HPV types.

^d HPV positive but not HPV 16.

^e Includes adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas.

^f Three carcinoma cases were negative for HPV.

Taula 8. distribució de VPH-16 i altres HR-HPV a lesions d'alt grau(86)

En el 2008 Bosch va publicar un meta-anàlisi, com va fer Zuna i col. diferenciant les dos histologies típiques de CCU, i va analitzar quins genotips de VPH es trobaven en les mostres. En aquest cas va trobar també que el VPH-16 era el més prevalent amb diferència, però també un augment de VPH-18 en el adenocarcinoma (31).

GENOTIPO	NORMAL	HSIL	SCC	ADENOCA
16	2.6	45.3	55.2	48.4
18	0.9	6.9	12.8	36.3
31	0.6	8.6	3.8	0.7
45	0.4	2.3	4.6	5.8
33	0.5	7.3	3.7	2
52	0.9	5.1	2.9	0
58	0.9	7.0	2.8	0.7
OTROS	6.8	23.9	7.6	7.7

Taula 9. Distribució dels genotips de VPH en el SCC i Adenocarcinoma de Bosch i col.(31)

Al País Basc, Delgado i col. van fer un estudi sobre 106 pacients amb displàsia cervical, però afegint un grup per a ASC-US i LSIL a diferència d'estudis anteriors. Com es pot comprovar a la Taula 10 la distribució dels genotips de VPH és més homogènia en el subgrup de ASC-US i de L-SIL que en el d'alt grau i CCU(32) on destaca el 16 per sobre de tots.

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

Taula 10. distribució de genotips en ASC-US i LSIL i Alt Grau segons Delgado i col.(32).

El treball que millor ha intentat explicar aquesta diferència de capacitat per produir invasió ha estat el realitzat per Muñoz i col. El que van intentar fer va ser classificar els tipus de virus VPH en alt risc oncogènic i baix risc, calculant la Odds Ratio (OR) de cada virus per a produir càncer de cèrvix (Taula 11). Per a estimar aquestes OR, Muñoz i col van fer servir dades d'11 estudis de cas-control incloent a un total de 1918 pacients amb càncer de cèrvix i 1928 controls. Els virus amb una OR superior a 5, amb el marge inferior de l'interval de confiança superior a 3 o bé no apareguessin en els controls es van definir com a virus d'alt risc. Per tant, concloïa que els virus de tipus 16 i 18 a més de 31, 35, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, i 82 van ser considerats carcinogènics o d'alt risc, i els genotips 26, 53 i 60 probablement carcinogènics (87).

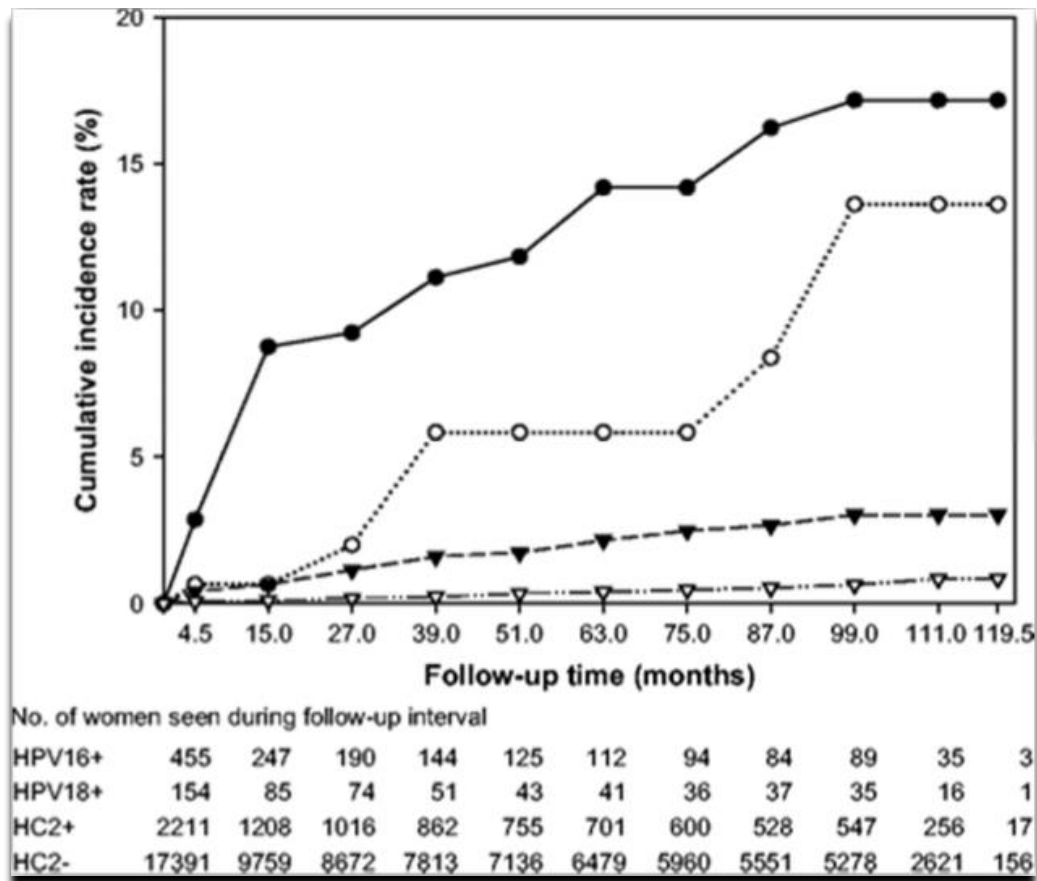
Table 4. Risk of Squamous-Cell Cervical Cancer According to Human Papillomavirus (HPV) Type.^a

HPV Type	Patients		Controls		Odds Ratio (95% CI) [†]
	no.	%	no.	%	
Negative for HPV	46	3.4	1091	84.4	1.0
16	685	50.5	42	3.3	434.5 (278.2–678.7)
18	177	13.1	17	1.3	248.1 (138.1–445.8)
45	74	5.5	9	0.7	197.6 (91.7–425.7)
31	36	2.7	8	0.6	123.6 (53.5–286.0)
52	37	2.7	4	0.3	200.0 (67.8–590.1)
33	14	1.0	1	0.1	373.5 (46.7–2985.8)
58	31	2.3	6	0.5	114.8 (45.1–292.6)
35	15	1.1	6	0.5	73.8 (26.4–206.5)
59	17	1.3	1	0.1	419.2 (54.2–3242.4)
51	13	1.0	4	0.3	66.5 (20.0–221.0)
56	9	0.7	5	0.4	45.1 (14.0–145.3)
39	8	0.6	0	0.0	—
73	5	0.4	1	0.1	106.4 (11.4–991.8)
68	2	0.2	1	0.1	53.7 (4.4–650.1)
6	1	0.1	6	0.5	4.3 (0.5–38.4)
11	1	0.1	2	0.2	11.2 (1.0–128.0)
81	0	0.0	6	0.5	—

Taula 11. Risc de càncer invasor segons el tipus de VPH (87)

Khan i col. van estudiar de manera similar el risc de desenvolupar un CIN3 o pitjor als 10 anys en pacients infectades per VPH-16 o VPH-18. Buscaven la relació entre una displàsia inicial causada per determinat virus, amb l'evolució als 10 anys. A la taula 10 es mostra la incidència acumulada de CIN-3+ i el virus causant de la lesió. Es va veure

que el que millor preveia l'aparició d'un CIN-3 o pitjor era la presència d'un VPH-16. A més que el risc acumulat del VPH-16 per a desenvolupar un CIN-3 o pitjor era 7,5 vegades major que si el genotip fos qualsevol altre (88).



Taula 12. Incidència acumulada de CIN-3+ als 10 anys. Cercles negres VPH-16, cercles blancs VPH-18, triangles negres VPH-no16-no18, triangles blancs VPH negatiu(88).

També eren similars resultats que va trobar Castle i col. en el seu estudi observant durant 2 anys a més de 5000 pacients amb displàsia cervical, per a buscar el risc de desenvolupar CIN-3+ segons el tipus de VPH que tingués. El fet d'estar infectada per VPH-16 tenia un risc 13 vegades major que una citologia de LSIL a desenvolupar el CIN-3+, i 5 vegades més que qualsevol altre HR-HPV (89).

A l'hora de veure el risc dels altres HR-HPV, Berkhof i col. van analitzar l'evolució de les lesions preinvasives segons el tipus de HR-HPV, aprofitant el resultat dels

cribratges de 44000 dones a Holanda amb VPH positiu i citologies normals, ASC-US o LSIL. Van observar la seva evolució durant 18 mesos i quina relació podia tenir amb el genotip de VPH. A la Taula 13 es pot veure com també hi ha un risc molt més elevat de patir un CIN-3+ si es té una infecció per VPH-16, sense importar quina era la citologia inicial fins i tot essent normal (90).

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

Taula 13. Risc acumulat als 18 mesos per a CIN-2+ segons genotip VPH i citologia (90).

En definitiva, davant d'aquest resultat està àmpliament acceptat entre la comunitat científica que cada un dels diferents genotips del VPH tenen una diferent capacitat oncogènica, que es tradueix en una progressió variable de les lesions preinvasores a CCU invasor. El genotip viral amb major capacitat oncogènica és el VPH 16.

1.6.5. DETECCIÓ I GENOTIPAT DE VPH

Els mètodes per a detectar la presència de VPH es basen en trobar ADN o ARN viral en les cèl·lules vaginals i cervicals preses en les citologies. La majoria d'aquests mètodes busquen ADN viral (91). El mètode ideal hauria de realitzar-se fàcilment, ser reproducible també amb facilitat, tenir una elevada especificitat i sensibilitat, i que fos capaç de detectar i identificar diferents tipus de VPH que es puguin trobar en la mostra.

Els diferents mètodes (taula 14) desestabilitzen la doble cadena ADN mitjançant un increment en la temperatura i en alguns casos s'amplifica i s'aconsegueixen major nombres de cadenes mitjançant la PCR. Aleshores s'intenta identificar les seqüències de ADN de la mostra enfrontant les a sondes de ADN conegut que formen part del mètode de detecció i així podem saber quins virus són presents a les nostres.

CATEGORIA	DIANA	PRINCIPI TEST	MÈTODE
Amplificació de dianes (grup 1)	ADN	PDR format variable Lectura per hibridació	<ul style="list-style-type: none"> * PGMY-linear array (Roche) * SPF10-Lipa (Innogenetic) * GP5+/6+- PCR-EIA * MGP PCR (Luminex) * BSGP5+/6+- PCR-MPG * Digene HPV genotyping RH test (Qiagen) * Digene HPV genotyping LQ test (Qiagen) * Amplicor (Roche) * Papillocheck (Greiner-Bio-One) * CLART HPV2 (Genomica)
		PCR temps real	<ul style="list-style-type: none"> * Abbot real time High Risk HPV test * Cobas 4800 HPV Test (Roche)
	ARNm	RT-PCR	* HPV 16 E6*1 RT-PCR-EIA
		NASBA	<ul style="list-style-type: none"> * Nuclysens easyQ HPV v1 (Biomerieux) * PreTect HPV Proofer Assay (Norchip)
		TMA	* Aptima HPV Assay (Gen-Probe)
	Amplificació de senyals (grup 2)	ADN	Fase líquida
In situ			<ul style="list-style-type: none"> * Ventana Inform HPV (Ventana) * Dako Gen (Dako)

Taula 14. Resum de de tests per a detecció VPH+.

1.6.5.1. MÈTODES D'AMPLIFICACIÓ DE LA SENYAL

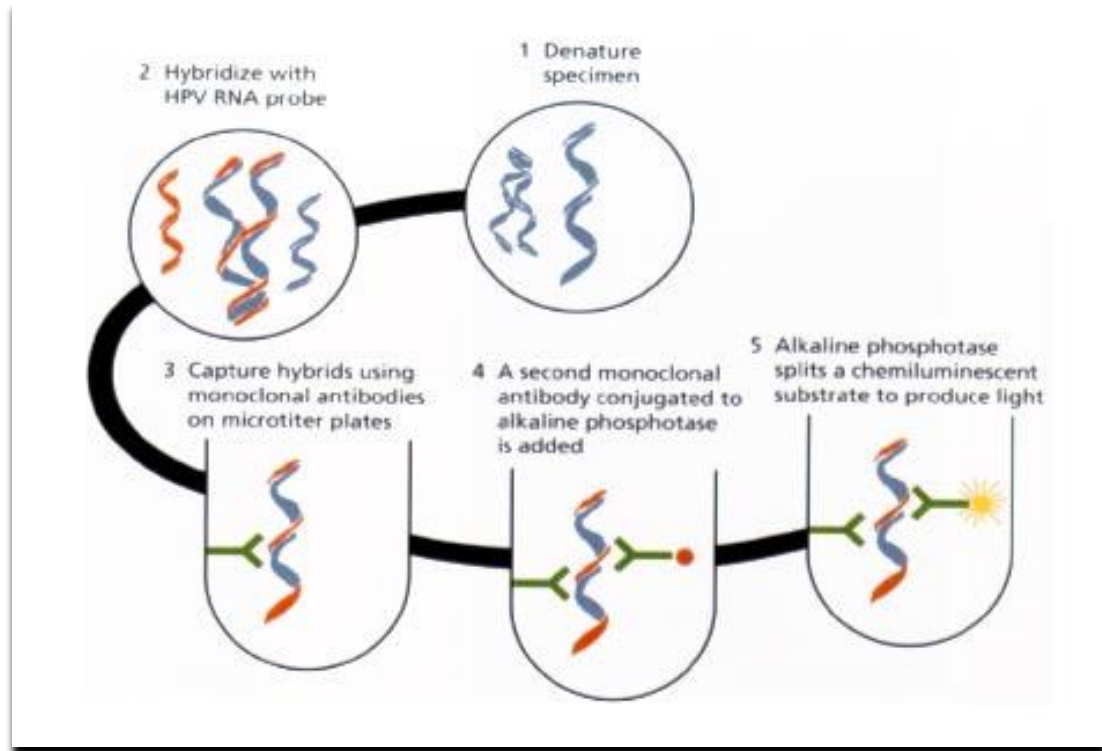
1.6.5.1.1. MÈTODES AMB ADN

- CAPTURA D'HÍBRIDS (HYBRID CAPTURE 2. HC2, DIGENE CORP., USA)

Aquest mètode Va ser el primer en usar-se massivament als laboratoris per a la pràctica clínica, en els cribratges poblacionals. Per tal d'identificar el VPH, aquest mètode amplifica la senyal basant-se en la hibridació de l'ADN del VPH que es troba a les mostres, fent servir ARN marcat (Imatge 7). Mitjançant aquest procediment s'obtindrien uns híbrids ADN-ARN que haurien de ser reconeguts per anticossos monoclonals lligats a un substracte quimioluminescent que donarà una resposta semicuantitativa sobre l'ADN del VPH present a la mostra (92)(93).

El test consta en una barreja de diferents sondes (ARN marcats). Tenim 13 sondes per a detectar virus d'alt risc (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) i unes altres 5 sondes per a detectar virus de baix risc (6, 11, 42, 43, 44). A la pràctica clínica no s'utilitzen les sondes de baix risc.

Tot i la seva gran utilitat, la principal limitació d'aquest test és que tot i que pot detectar qualsevol dels virus de que es disposa sonda en el test, no identifica quin es el genotip present, només la presència de virus i sense saber si ni ha un tipus o més.



Imatge 7. Tècnica captura d'híbrids. www.papillomavirus.cz/eng/diagnosis_kits_hybrid.html

- **CERVISTA HPV HR** (Hologic, Inc.; Marlborough, MA, USA)

El test Cervista és similar al HC2, ja que permet detectar virus d'alt risc mitjançant l'amplificació del seu ADN (94,95). Té sondes per a detectar 14 virus d'alt risc (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), tot i que hi ha una varietat d'aquest test que únicament identifica virus 16 i el 18 (Cervista HPV 16/18)

1.6.5.1.2. MÈTODES AMB PCR

Aquesta tècnica es basa en una reacció en cadena de l'enzim polimerasa, la reacció PCR (polimerasa chain reaction). Aquesta reacció comença quan s'apliquen les mol·lècules iniciadores ("primers" en anglès, iniciadors o cebadors) que es complementen amb el fragment d'ADN viral, i que continuarà amb la realització de diferents cicles amb la PCR, i finalment en resultaran moltes còpies de l'ADN viral.

Les tècniques basades en PCR (Taula 15) tenen l'avantatge que es poden aplicar a mostres de qualsevol tipus, però com a contrapartida, i donat que n'amplifiquen molt el senyal, tenen més falsos positius.

- **COBAS 4800** (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA)

El COBAS 4800 és un mètode basat en la reacció en cadena de la polimerasa, en temps real i automatitzat. La mostra ha de ser en medi líquid, i no pot processar material histològic en parafina.

Aquest test informa si en la mostra es troba ADN de VPH, i en ser positiu el resultat, de quin genotip viral es tracta: VPH-16, VPH-18 o bé VPH-no16/no18 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68).

És un test molt usat en la pràctica clínica. S'ha demostrat que és útil per a ASC-US, i a més dóna informació sobre la càrrega viral trobada a la mostra. Té validesa per a fer-se servir en el cribratge poblacional (96), i la seva especificitat i sensibilitat per a trobar CIN-2+ no és pitjor que la que aporta l'Hybrid Capture (97).

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

Aquest test també es basa en tècniques de PCR. Detecta de manera automatitzada 14 subtipus de HR-HVP (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). De manera més específica, l'APTIMA detecta l'ARN missatger de les proteïnes E6 i E7 virals, i només informa de la existència de HR-HPV, no aporta informació del genotip viral.

Els estudis mostren una sensibilitat igual als anteriors mètodes explicats aquí, i inclús amb certa milloria en la especificitat per a detectar CIN-2+(98).

Test	Tècnica	Genotips virals
HC2®	Amplificació senyal ADN	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
CERVISTA HR-HPV®	Amplificació senyal ADN	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
CERVISTA HR-HPV 16/18®	Amplificació senyal ADN	16, 18
COBAS 4800®	Real Time PCR-DNA	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
APTIMA®	PCR-DNA	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

Taula 15. Resum de tests aprovats per la FDA

1.7. MÈTODES DE CRIBRATGE

Els mètodes de cribratge tenen com a objectiu detectar el màxim de pacients possible que puguin patir certa malaltia, davant el mínim signe, tot i estar totalment asimptomàtiques. És important en el moment de determinar si una malaltia és tributària de cribratge, conèixer la seva història natural, i que la detecció precoç tingui un tractament.

En el cas particular del cribratge per a càncer de cèrvix uterí, el que volem trobar és el màxim de pacients amb lesions intraepitelials cervicals i infeccions per VPH, per a reduir la incidència i mortalitat del càncer de cèrvix. Mitjançant protocols d'actuació segons les troballes, s'ha de tractar adequadament les lesions que poden progressar a càncer invasor, i a l'hora evitar el sobretractament de les lesions que no progressaran i les que son transitòries. Tot i tenir el programa ben dissenyat, s'accepta que cap prova diagnòstica té una sensibilitat del 100% i que queda un càncer residual un cop ha passat la ronda del cribratge o l'anomenat càncer d'interval (els falsos negatius i les neoplàsies de ràpida progressió)(1).

Els beneficis del cribratge són clars: curació de dones tractades després de la detecció que potencialment haurien mort per càncer invasor, millora de qualitat de vida donat que els tractaments són molt menys agressius en estadis precoços de la malaltia, i benefici psicològic quan la prova és negativa en saber que no s'és portadora de càncer de cèrvix.

Tot i els beneficis dels programes de cribratge per CCU, de fet han demostrat la seva eficàcia en la reducció de la incidència de CCU allà a on s'han aplicat, aquests programes comporten determinats riscos. Aquesta morbiditat derivada ve determinada pel fet que per una banda, hi ha dones que són diagnosticades de lesions no progressives. Aquestes dones són sotmeses a un major número d'exploracions colposcòpiques innecessàries, realització de biòpsies i tenen el risc de ser sobretractades, a més a més moltes patiran angoixa en tenir una prova positiva i esperar per a la següent prova diagnòstica. D'altra banda hi haurà casos amb proves amb un resultat falsament negatiu, amb les conseqüències clíniques i pronòstiques que se'n poden derivar del retard en la administració d'un tractament potencialment curatiu.

Des que es van començar els primers cribratges a principis de segle XX es calcula que als llocs on hi ha una forta implantació del cribratge amb cobertura de més del 70%

(Finlàndia, Regne Unit, Suècia, Països Baixos) de la població s'ha aconseguit una reducció del 80% dels CCU.

Però tot i la gran reducció gràcies a la introducció de la citologia com a cribratge, s'ha de dir que no és un mètode ideal donat que té una taxa de falsos negatius que arriba al 25%, i a més a més s'ha d'afegir un alt percentatge de citologies inadequades (99). Les citologies inadequades són aquelles que no es pot llegir una gran part de l'extensió cel·lular ja sigui per falta de cel·lularitat o per un mal processat de la mostra (tinció, fixació, molt gruixuda, falta de material), presència de sang o altre material, que fa un diagnòstic que no sigui segur. En aquests casos es recomana repetir la presa.

En un esforç de millorar la taxa de citologies inadequades es va desenvolupar i implementar la citologia líquida en alguns dels programes de cribratge. Hi ha estudis que demostren una millor sensibilitat per a trobar LSIL i HSIL en comparació a la citologia clàssica. En canvi hi ha una mica més de discrepància a l'hora d'aconseguir més sensibilitat pels ASC-US. Bernstein i col. (100) va realitzar un seu estudi de més de 154000 citologies líquides i més de 311000 citologies clàssiques, i va observar que en la citologia líquida augmentava la taxa de detecció d'ASC-US en comparació amb la citologia clàssica. A l'hora es va reduir la taxa de citologies insatisfactòries quan s'utilitzava la citologia líquida enlloc de la clàssica. Cal afegir a la citologia líquida té el benefici de poder realitzar al moment una detecció de VPH en el cas que sigui necessari com amb els ASC-US.

Per a incrementar encara més la detecció de lesions CIN amb els programes de cribratge, s'han realitzat varis estudis l'objectiu dels quals ha estat demostrar la superioritat de la detecció de VPH sobre la citologia per a trobar CIN-3+ (101). Tot i que la sensibilitat de les proves de detecció de VPH és superior, no millora l'especificitat, sobretot en la gent jove, on el fet de tenir infecció per VPH no significa que s'hagi de tenir una displàsia cervical, ja que tal i com hem anotat anteriorment les infeccions són majoritàriament passatgeres.

Tot i l'èxit de la citologia en el cribratge del CCU com que té una baixa sensibilitat, actualment s'accepta la combinació de citologia i detecció de VPH, l'anomenat co-test, en el cribratge, ja que augmenta la sensibilitat per a detecció de CIN-3+, tot i perdre especificitat quan una de les 2 proves surt positiva. A favor d'aquestes dades, aquest any 2018 s'ha publicat un treball per part del grup d'Ogilvie, que es basava en un

estudi prospectiu sobre 19909 pacients dins del cribratge del sistema de salut públic canadenc, amb l'objectiu de comparar la sensibilitat per a diagnosticar CIN-3+ del test de detecció del HR-HPV contra la citologia líquida durant un total de 48 mesos de seguiment. El grup conclou que l'ús del test de detecció del HR-HPV millora la sensibilitat per a detecció de CIN-3+, donat que té menys valors falsament negatius(102)

El problema derivat de l'augment de la sensibilitat és que obliga a la realització d'un major nombre d'exploracions colposcòpiques i inclòs biòpsies per a assolir un diagnòstic de certesa. Així, per a reduir el nombre de colposcòpies innecessàries, els falsos positius i els falsos negatius, en les dones majors de 30 anys s'accepta la realització de la detecció de VPH com a prova de cribratge en lloc de la citologia clàssica. En el cas de positivitat de la prova, caldria afegir una citologia cervicovaginal clàssica o líquida. En el cas que la detecció de VPH resultés negativa, la probabilitat de que la dona tingués una lesió CIN és mínima i el següent control podria realitzar-se en 5 anys(1,6).

Els programes de cribratge poblacional per a CCU varien d'un país i inclòs d'una regió a una altra, però tots tenen uns fonaments biològics comuns al darrera i venen avalats per les diferents guies locals i/o regionals.

El moment de finalització o abandonament del programa, vindrà determinat pel fet d'haver patit o no episodi de displàsia i/o presentar un cribratge inadequat de més de 5 anys. Només es podrà finalitzar un cop s'arribi a l'edat final de cribratge amb 3 citologies consecutives normals.

A Catalunya existeix un cribratge oportunista, amb una població diana dels 25 anys fins als 65 anys (Figura 5 i 6). Segons les últimes dades de la Generalitat, només un 40% de la població està seguint el cribratge del sistema sanitari públic (103). Es recomana iniciar el cribratge a partir dels 25 anys, i un cop es tenen 2 citologies seguides anuals negatives es pot començar amb intervals de 3 anys. En dones majors de 40 anys i un cribratge inadequat (última citologia més de 5 anys) es recomana realització simultània de citologia i detecció de VPH.

Cal afegir que existeixen recomanacions especials per a determinats grups de pacients. Les pacients amb antecedents de patologia d'alt grau es recomana un cribratge perllongat d'entre 10-20 anys després de la resolució de la patologia. En el cas de dones immunodeprimides, com les pacients infectades per VIH, s'aconsella realitzar cribratge a partir dels 21 anys i co-test a partir dels 30 anys. Les

recomanacions tenen en compte tant la càrrega viral com la presa o no de tractament retroviral. D'aquesta manera, en aquelles pacients amb uns linfòcits CD4 >200 o amb tractament retroviral, es podrà fer cribratge cada 3 anys; en cas de CD4 <200 o sense tractament caldrà realitzar un cribratge anual(1).

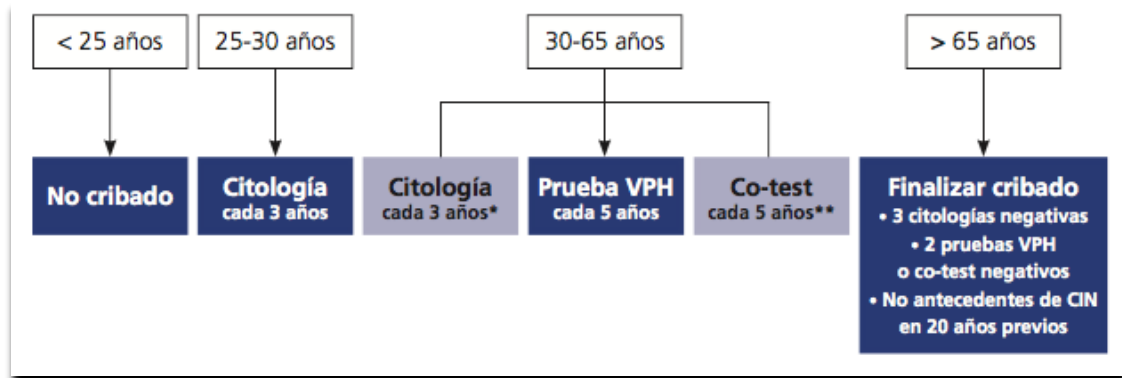


Figura 5. Algoritme de cribratge de càncer de cèrvix. Oncoguías SEGO 2014(1).

Amb la introducció de la vacuna contra el VPH en el calendari vacunal, quan arribin les primeres cohorts de noies vacunades és de preveure un canvi en la història natural de la infecció per VPH, i en conseqüència de la incidència de CCU, que probablement farà replantejar aquests programes de cribratge.

Población diana y estrategia de cribado		Niveles de evidencia	Recomendación
Mujeres que han iniciado su actividad sexual y con edad comprendida entre los 25 y 65 años de edad		Moderado	Fuerte a favor
El cribado, independientemente de la prueba utilizada, debería garantizar una propuesta de base poblacional con mecanismos de evaluación de cobertura		Moderado	Fuerte a favor
Edad	Prueba de cribado		
Antes de los 25 años	Ninguna prueba de cribado	Moderado	Fuerte a favor
Entre 25 y 30 años	Citología cervical cada 3 años	Alto	Fuerte a favor
Entre 30 y 65 años	Prueba VPH cada 5 años. (opción preferente) Prueba VPH y citología (co-test) cada 5 años. (opción aceptable) Citología cada 3 años. (opción aceptable)	Alto Bajo Moderado	Fuerte a favor Débil a favor Débil a favor
A partir de los 65 años	Finalizar cribado Cribado previo adecuado y negativo (10 años) y no CIN o CCU (20 años)	Moderado	Fuerte a favor
Histerectomía (No CIN ni CCU previos)	Ninguna prueba de cribado	Alto	Fuerte a favor
Antecedentes de lesión \geq a HSIL/CIN2	Cribado al menos 20 años	Moderado	Fuerte a favor
Inmunodeprimidas	Citología a partir de los 21 años Co-test a partir de los 30 años	Bajo Bajo	Fuerte a favor Fuerte a favor
Obtención de muestras de cribado			
Citología en medio líquido			Preferente
Citología, extensión en portaobjetos			Aceptable
Pruebas moleculares, otros medios			Aceptable
Actuación ante una prueba de cribado anormal			
Prueba VPH	Citología "réflex" si medio líquido		Aceptable
Citología	Prueba VPH o Colposcopia (Protocolo específico)		Aceptable

Taula 16. Algoritme de cribatge de càncer de cèrvix amb evidència científica.

1.8. MANEIG DE LES DISPLÀSIES CERVICALS

L'èxit de la implementació dels programes de cribratge per a la detecció i prevenció del CCU, és la detecció de lesions precursoras que poden ser tractades en funció del seu risc de progressió. D'aquesta manera tal i com veurem seguidament, el maneig podrà variar des d'un seguiment amb citologia i colposcòpia periòdiques, a cirurgies excisionals i fins i tot histerectomia.

1.8.1. ATÍPIA DE CÈL·LULES ESCAMOSES DE SIGNIFICAT INCERT

L'atípia de cèl·lules escamoses de significat incert (ASC-US) és l'alteració més freqüent. Suposa aproximadament un 2-5% dels diagnòstics citològics. Els 33-51% dels ASCUS són causats per infecció de HR-HPV. D'aquestes, trobarem una lesió CIN-2+ en 5-12% de les pacients, i 0.1-0.2% seran càncers de cèrvix(6).

Donats a aquests percentatges de lesió CIN2+ i davant el resultat d'una citologia amb un ASC-US tenim 3 opcions de maneig (Figura 6):

- Prova de detecció de VPH (recomanat i més usada)
- Colposcòpia
- Citologia anual durant 2 anys

Un dels estudis que més han aportat al maneig de les citologies amb resultat d'ASC-US i de L-SIL és l'estudi ALTS (ASC-US/LSIL triage study), un estudi multicèntric randomitzat publicat l'any 2003, on es van estudiar com s'havien comportat 3488 pacients amb lesió de baix grau. El seu l'objectiu era establir quin seria el millor maneig d'aquest tipus de lesions. Es va observar que per l'ASC-US la millor estratègia era realitzar una prova de detecció de VPH (reduint el nombre de colposcòpies), en canvi el cas de lesions L-SIL la millor estratègia era la realització directa de colposcòpia, ja que fins el 80% de les pacients eren positives per a VPH (104).

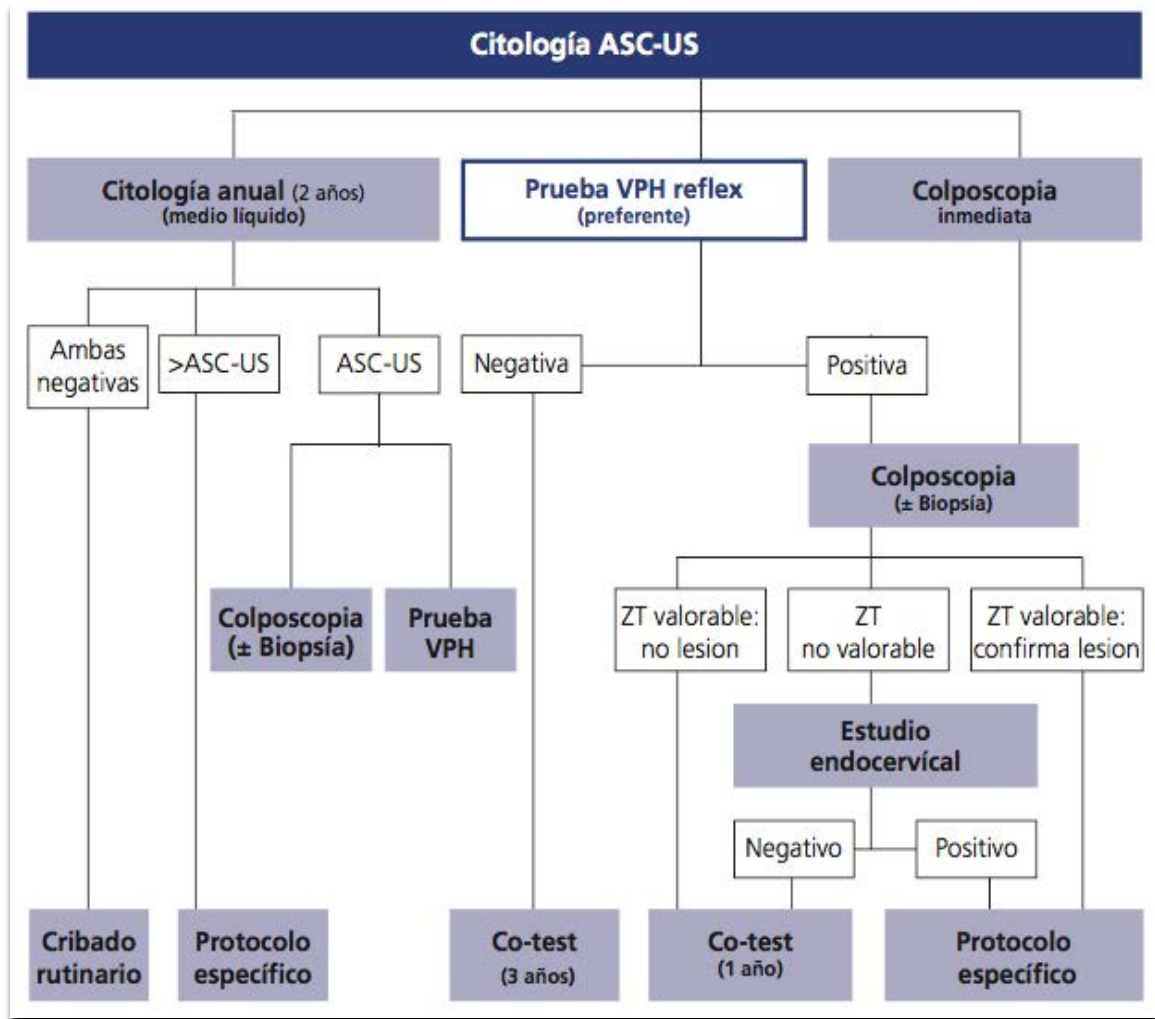


Figura 6. Algoritme actuació davant ASC-US (1).

En noies menors de 25 anys no caldria realitzar determinació de VPH donat a l'alta probabilitat de remissió de la lesió citològica (95%), i a l'alta prevalença de infecció per VPH que també amb molta probabilitat serà resolta. Es recomana citologia anual durant 2 anys, i en cas d'evolució a L-SIL o H-SIL caldria una colposcòpia.

En pacients postmenopàusiques estaria recomanat administrat estrògens locals 4-6 setmanes i repetir la citologia, o bé sol·licitar una detecció de VPH.

Les dones majors de 65 anys amb citologia de ASC-US i detecció de VPH negativa, caldria realitzar un seguiment amb co-test (citologia i HPV) a l'any, abans de treure-les del cribratge definitivament, i fer colposcòpia en cas de que alguna prova sortís positiva.

1.8.2. ATÍPIA DE CÈL·LULES ESCAMOSSES QUE NO POT DESCARTAR LESIÓ D'ALT GRAU

L'atípi de cèl·lules escamoses que no pot descartar lesió d'alt grau (ASC-H) apareix aproximadament en un 0,27-0,6% de les citologies de cribratge. Es podria classificar com un entremig entre ASC-US o LSIL i el HSIL, ja que té més risc que ASC-US i LSIL d'amagar un CIN-3+, però menys risc que un HSIL(6).

La probabilitat que la lesió subjacent sigui un CIN-2+ és entre 28-68%, i la prevalença d'infecció per VPH és molt elevada, raó per la qual es recomana realitzar una colposcòpia directament i no actuar en funció o no de la presència de HPV. (Figura 7).

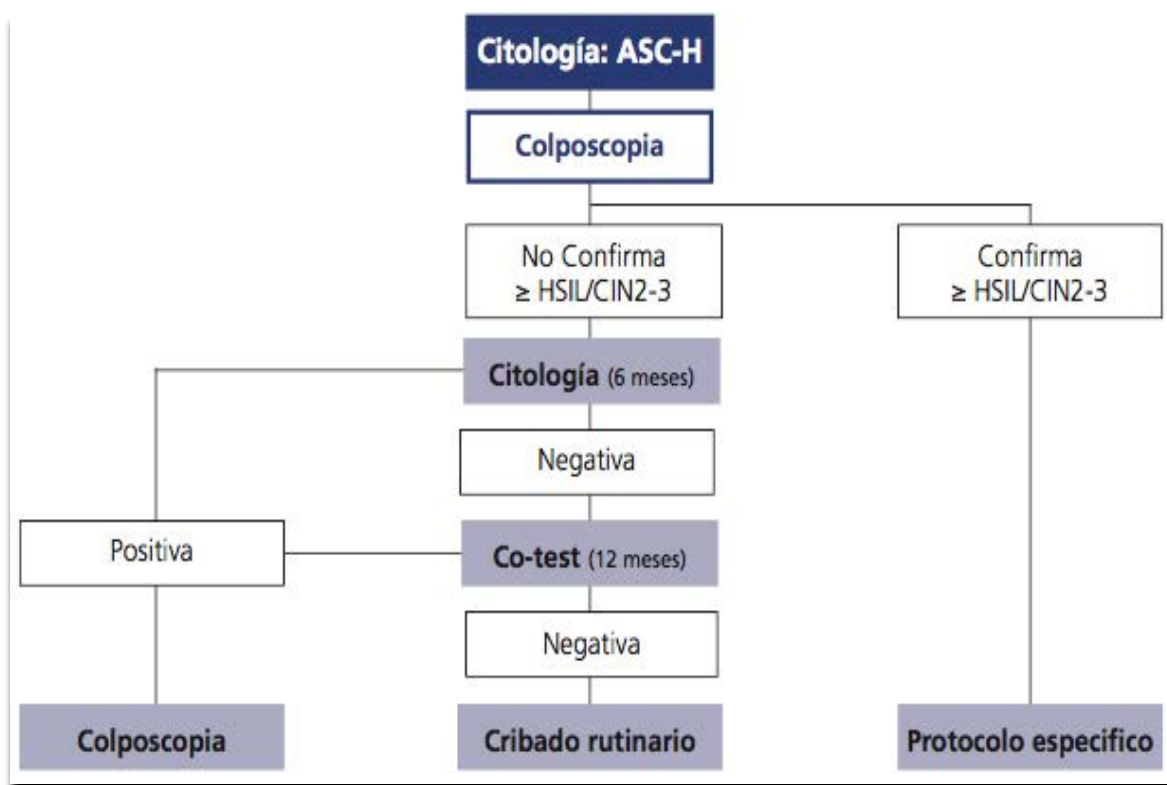


Figura 7. Algoritme actuació davant ASC-H (1).

1.8.3. LESIÓ INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE BAIX GRAU

Les lesions de baix grau (LSIL) constitueixen aproximadament un 2-3% de tots els diagnòstics citològics provinents de cribratges. La majoria correspon a una infecció per HR-HPV (70%) . Per això mateix, no es recomana una detecció del virus del papil·loma, per la seva alta prevalença, i si s'aconsella una colposcòpia amb biòpsia dirigida, donat que la importància clínica del diagnòstic de LSIL és que en un petit percentatge, entre 12-16%, hi existirà una lesió CIN-2+. Si es donés que s'ha realitzat un co-test (és a dir citologia i determinació de HR-HPV), i fos negatiu, faríem un control en 1 any amb un nou Co-test (Figura 8).

Aquestes recomanacions es modifiquen en situacions especials. D'aquesta manera, les pacients gestants seguiran controls com en els ASC-US fins al puerperi. En les pacients postmenopàusiques si que estaria justificat la determinació de VPH, donat que és poc prevalent. A més aquestes pacients poden enviar-se a realitzar-se una colposcòpia o bé també un seguiment en 6-12 mesos donat que una porció d'aquests L-SIL estan causats per atrofia i hipoestrogenisme (105).

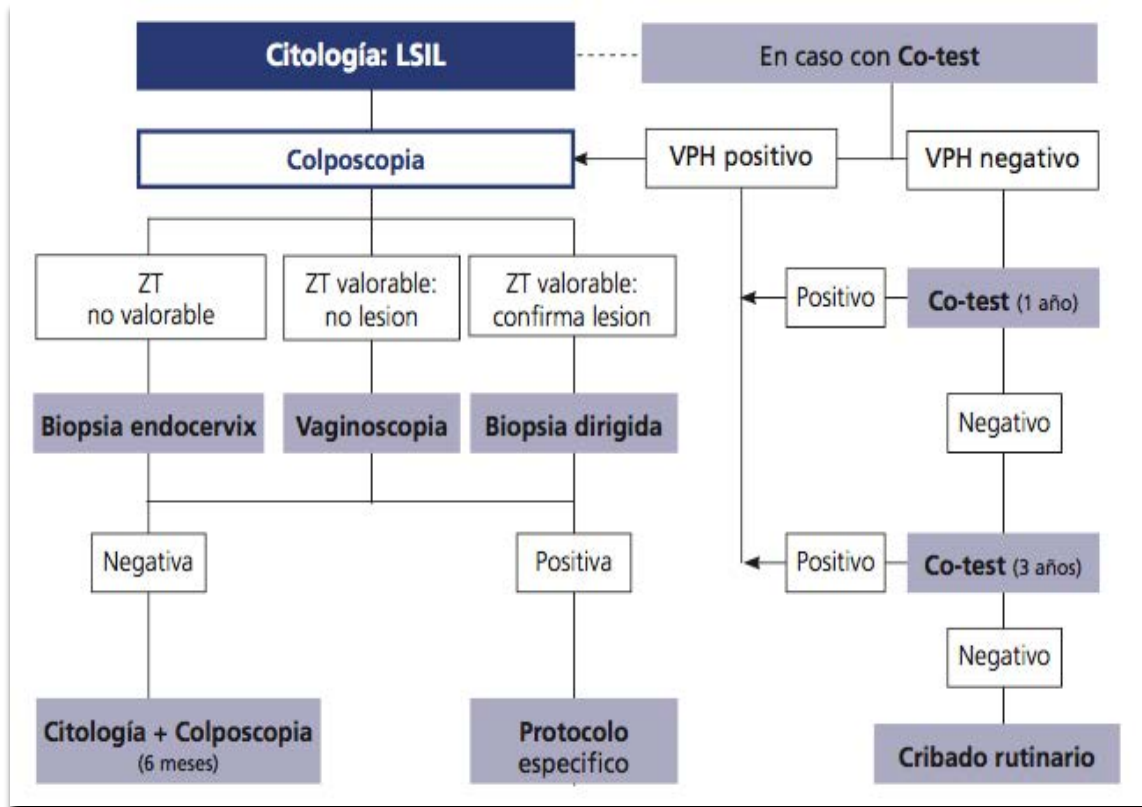


Figura 8. Algoritme actuació davant L-SIL (1).

1.8.4. LESIÓ INTRAEPITELIAL D'ALT GRAU (H-SIL)

Les lesions intraepiteliais d'alt grau (H-SIL) representen un màxim d'un 1% de totes les citologies de cribatge per a càncer cervical. El pic màxim d'incidència està comprès entre els 20 i 29 anys d'edat, i després va disminuint progressivament. La importància d'aquest resultat citològic roman en que el 60% correspondran a lesions CIN-2+, i que el 2% de les citologies correspondran a carcinomes invasors (1). Un resultat citològic d'H-SIL en dones majors de 30 anys comporta un risc de CCU del 8% en els següents 5 anys al diagnòstic(64).

A l'hora del maneig, la indicació és realitzar sempre una colposcòpia per a poder fer biòpsies dirigides, i tenir un diagnòstic definitiu (Figura 9). En el cas de no poder biopsiar, i/o no poder fer seguiment es pot realitzar una conització directa amb finalitat diagnòstica i i en cas de confirmar CIN-2+, també terapèutica.

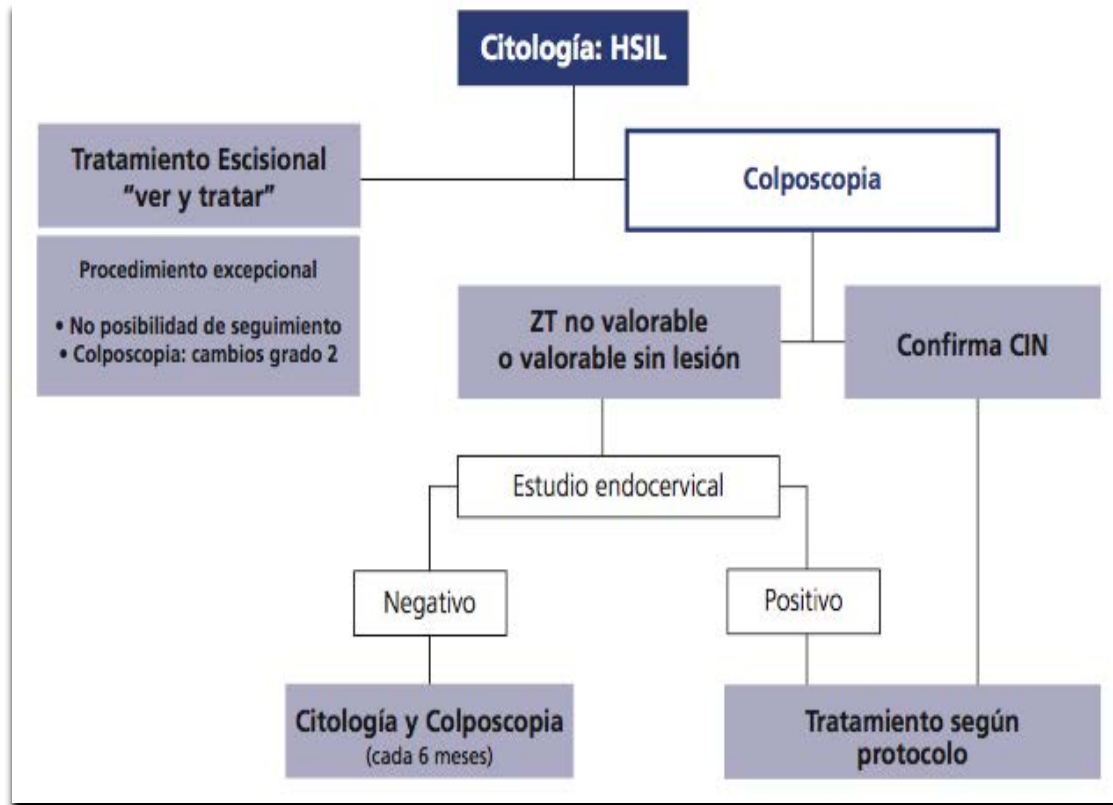


Figura 9. Algoritme actuació davant H-SIL (1).

En cas de tractar-se de pacients menors de 25 anys, donat que el risc de carcinoma invasor és molt baix i existeix una taxa de remissió espontània del 65%, es remet a la pacient a colposcòpia i pot no realitzar-se tractament directament sinó fer seguiment(1).

1.9. COLPOSCÒPIA I BIÒPSIA DIRIGIDA

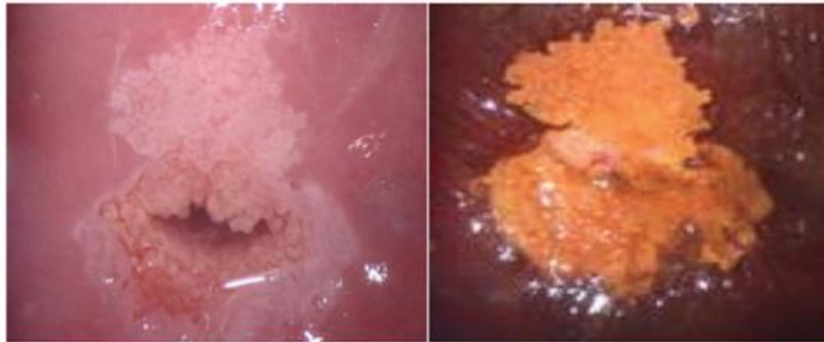
Davant determinades alteracions citològiques de SIL s'ha de descartar la presència d'una lesió histològica de CIN tal i com hem anat explicant a l'apartat anterior. La colposcòpia és la tècnica diagnòstica exploradora d'elecció per a aquest comesa. Va començar a ser utilitzada per Hinselman el 1925 (106), i es basa en la observació del tracte genital inferior (cèrvix, vagina i vulva) amb una lupa binocular d'augment de 5x a 10x. La principal qualitat de la realització de la colposcòpia és que detecta canvis macroscòpics que es poden correlacionar amb patologia a nivell microscòpic, permetent realitzar biòpsies de manera dirigida. A més a més de permetre localitzar lesions, permet establir la seva extensió, fet de gran utilitat en aquells casos en els que es fa seguiment.

De manera prèvia a la realització de la tècnica s'ha de netejar i retirar els fluids i secrecions cervicals que poden dificultar la visualització directa del cèrvix i en particular de la zona de transformació (ZT). En primer lloc es fa una exploració directa de la ZT per tal d'identificar alguna zona patològica o sospitosa. En el cas de no aconseguir visualitzar total o parcialment la ZT es considerarà una colposcòpia no adequada.

Un cop realitzada l'avaluació directa del cèrvix i la ZT s'ha d'avaluar el tipus de vascularització i possibles alteracions. Posteriorment cal aplicar una solució d'àcid acètic al 3-5% per a coagular proteïnes del citoplasma de les cèl·lules epitelials. En el cas de cèl·lules escamoses normals, gairebé no es noten canvis en l'observació. Però on hi ha hagut infecció pel VPH les cèl·lules expressen més proteïnes que es coagulen, i dificultaran més el pas de la llum del colposcopi, resultant en un aspecte blanc característic "acetoblanc". Quan es tracta d'una lesió de baix grau, com l'alteració es troba a més profunditat al costat de la membrana basal epitelial, el canvi triga uns segons més en aparèixer. En canvi en les lesions d'alt grau, que s'estenen fins més a prop de la superfície, l'aparició del blanc característic és més precoç.

S'associa la intensitat del color blanc de CIN característic a la intensitat de la lesió. Però també s'han trobat zones acetoblanques característiques en lesions benignes com hiperqueratosi, ZT congènita i condilomes.

Finalment, es realitza el Test de Schiller, que consisteix en l'aplicació de solució lugol (solució rica en iode) sobre l'epiteli, i en observar quina captació en fan les cèl·lules. El fonament de la tècnica es basa en que les cèl·lules normals tenen una alta proporció de grànuls de glucogen, i les lesions CIN i el càncer invasor contenen molt poc. Així, l'epiteli sà captarà lugol i adquirirà un color fosc, i les lesions tipus CIN i els carcinomes, quedaran sense tenyir de color molt més clar (imatge 7). El teixit metaplàsic immadur, l'infamatori, l'acantosi (regeneració), i la ZT congènita també poden adquirir un color clar sense iode o només parcialment.



Imatge 8. Imatge d'una colposcòpia amb ZT normal amb aplicació d'àcid acètic (dreta) i de lugol (esquerra).

Les troballes de la colposcòpia segueixen la classificació de la International Federation for cervical pathology and colposcopy (IFCPC) que es va realitzar a Rio de Janeiro el 2011. La colposcòpia informa del patró que segueix l'epiteli i classifica les imatges anormals en lesions mínimes (canvis menors o grau 1), canvis greus (canvis majors o grau 2), i lesions molt greus suggestives de carcinoma (Taula 17).

Terminologia colposcòpica del coll uterí de IFCPC 2011			
Evaluació General		<ul style="list-style-type: none"> Adequada/inadequada a causa de ...(per ex.: coll uterí no clar per inflamació, sagnat, cicatriu) Visibilitat de la unió escamocolumnar: completament visible, parcialment visible, no visible. Tipus de zona de transformació 1,2,3	
Troballes colposcòpiques normals		Epiteli escamós original: <ul style="list-style-type: none"> Madur Atròfic Epiteli columnar <ul style="list-style-type: none"> Ectòpia Epiteli escamós metaplàsic <ul style="list-style-type: none"> Quists de Naboth Obertures glandulars i/o criptes glandulars Deciduosi en l'embaràs	
Troballes colposcòpiques anormals	Principis generals	Ubicació de la lesió: dins o fora de la zona de Transformació, ubicació de la lesió segons les agulles del rellotge. Tamany de la lesió Nombre de quadrants del coll uterí que cobreix la lesió, tamany de la lesió en percentatges del coll uterí.	
	Grau 1 (Menor)	Epiteli acetoblanc prim. Bores irregular	Mosaic fi, Puntejat fi
	Grau 2 (Major)	Epiteli acetoblanc dens, Aparició ràpida d'epiteli acetoblanc. Orificis glandulars oberts amb bores engrosados.	Mosaic gruixut, Puntejat gruixut. Bores delimitades, Signe del límit de la bora interna, Signo de cresta o sobreelevat.
	No específics	Leucoplàsia (queratosi, hiperqueratosi), Erosió Solució de Lugol (Test de Schiller): positiu/negatiu	
Sospita d'invasió		Vasos atípics Signes addicionals: Vasos prims, superfície irregular, lesió exofítica, necrosi, ulceració (necròtica), tumoració nodular.	
Troballes varies		Zona de transformació congènita, Condiloma, Pòlip(exo/endocervical) Inflamació.	Estenosi, Anomalia congènita, Anomalies post tractament, Endometriosis

Taula 17. Terminologia colposcòpica del coll uterí de IFCPC 2011

Per a un bon diagnòstic colposcòpic es requereix conèixer bé característiques del cèrvix i de la ZT: tonalitat, intensitat, forma i contorns de les zones acetoblanques, el patró vascular i la tinció amb iode.

La colposcòpia té una sensibilitat molt elevada per a detectar lesions CIN i CCU, però és molt menys específica, donat que moltes imatges anormals no es corresponen amb un diagnòstic de patologia. Per això cal una bona formació en patologia del tracte inferior, i les diferents associacions de colposcòpia creen guies clíniques que intenten promoure uns estàndards de qualitat.

El 1998 Mitchel i col van realitzar un meta-anàlisi que incloïa 9 estudis sobre colposcòpia, amb l'objectiu de conèixer la fiabilitat de la colposcòpia a l'hora de diagnosticar lesions CIN. L'anàlisi de les seves dades va establir una sensibilitat per a la colposcòpia en trobar lesions CIN-2+ del 96% i una especificitat del 48% (15,107).

Les troballes colposcòpiques de grau 2 (canvis majors) tenen un major valor predictiu positiu (VPP) per al diagnòstic de CIN-2+. Aquestes troballes són l'epiteli acetoblancc (73,3%), mosaic groller (33,3%), puntejat groller (53,8%), i vasos atípics (62,5%) (108).

Donades les seves limitacions en quant a especificitat i VPP, no s'aconsella l'ús de la colposcòpia com a eina de cribratge. La seva utilitat recau en diagnosticar lesions preinvasives i carcinomes en pacients que han passat un cribratge amb citologies cervico-vaginals, i aquestes han resultat alterades. Aquesta afirmació no és tant aplicable en països en desenvolupament. L'estudi de Shastri i col, realitzat a la Índia l'any 2014 amb la inclusió de 150000 pacients que no participaven de cap programa de cribratge, va demostrar que la realització d'una colposcòpia fent servir vinagre podia resultar útil com a mètode alternatiu de cribratge en zones amb pocs recursos. Les seves dades mostraven una reducció del 30% dels CCU (109).

1.10.MANEIG DE LES LESIONS BIOPSIADES

L'estudi anatomopatològic de les biòpsies dirigides mitjançant colposcòpia, informarà o no de la presència d'una lesió precursora tipus CIN. Aquestes lesions seran tractades de manera més o menys intervencionista en funció de la seva capacitat de progressió a un carcinoma invasor.

Les lesions escamoses intraepitelials de baix grau (CIN-1) són la infecció més lleu del VPH i regressen espontàniament la majoria de vegades (60-80%). La seva capacitat de progressar a CIN-3 és de només un 5-10%(110–112), i per tant també una molt baixa probabilitat de progressar a un CCU. Tot i això, les guies recomanen un seguiment estricte d'aquest tipus de lesions per a minimitzar el risc d'evolució a un CIN-3. En aquells casos en que el diagnòstic de CIN1 s'hagi establert a partir d'una citologia prèvia de H-SIL amb una colposcòpia no satisfactòria, o bé davant la persistència de la lesió per més de 2 anys, s'indicarà un tractament excisional de la lesió des del seu diagnòstic, donat que no podem descartar una lesió més greu subjacent (infradiagnòstic).

Per altra banda, les lesions d'alt grau, en particular el CIN-3 i l'adenocarcinoma in situ, són considerades com les veritables lesions pre-invasives i per tant les lesions que cal identificar i tractar amb més celeritat. Una pacient amb CIN-3 no tractada té una probabilitat d'evolucionar a un CCU del 30% en 30 anys i del 50% a més llarg termini. En canvi les pacients tractades mitjançant la exèresis quirúrgica d'aquestes lesions, tenen un risc de CCU d' un 0,7% al cap de 30 anys.

1.10.1. MANEIG DE LA DISPLÀSIA MODERADA (CIN-2)

La lesió CIN-2 té un significat biològic menys definit que les altres lesions. Es troba entremig d'una lesió CIN-1 que majoritàriament regressarà i necessita un seguiment, i d'una lesió CIN-3 que té una altra probabilitat d'evolucionar a CCU i necessita un tractament definitiu exerètic. Actualment s'agrupa el CIN-2 amb el CIN-3, tot i tenir unes taxes de regressió d'entre 40 i 60%, segons els resultats de la majoria d'estudis. Dit d'altra manera, a l'hora d'establir el maneig terapèutic de les lesions CIN2 es

menysprea aquest potencial de curació espontània, i es corre el risc del sobretractament de les lesions.

Basant-se en la capacitat de progressió dels CIN2, i no tenint en compte la seva alta taxa de progressió, no s'ha considerat ètic realitzar estudis clínics-epidemiològics de seguiment de pacients amb aquest tipus de lesió, fins no fa gaires anys. Això ha fet que no coneguem adequadament la història natural d'aquestes lesions CIN-2 (113). Els estudis més representatius realitzats amb aquest objectiu, es recullen a la taula 18.

Autor	Any	N	Edat (anys)	Període de seguiment	Taxa de regressió	Taxa de progressió
Chan JK(114)	2003	38	19-55	2 anys	58%	
Moore K(115)	2007	23	13-21	1,5 anys	65%	5%
Fuchs K(116)	2007	36	11-21	2 anys	50%	8%
Guedes AC(117)	2010	45	18-61	1 any	44%	23%
Castle P (118)	2009	357	18-62	2 anys	40%	22%
Moscicki AB(119)	2010	95	13-24	2 anys	62%	12%
McAllum DE(120)	2011	157	< 25	1 any	62%	18%
Discacciati M(121)	2011	42	17-47	1 any	74%	24%
Ho GY(122)	2011	63	18-40	1 any	54%	5%
Wang SM(123)	2013	30	35-45	6 anys	56%	16%
Bleecker E (124)	2014	21	< 30	2 anys	52%	24%
Lee MH (125)	2018	99	<25	2	74,7	

Taula 18. Resum estudis amb maneig conservador del CIN-2

Un dels estudis més interessants el va publicar el grup de Moscicki i col. el 2010. El seu objectiu era conèixer el comportament de les lesions CIN-2 en adolescents i noies adultes joves menors de 25anys. Els seus resultats van mostrar un gran potencial de regressió del CIN-2 en aquestes pacients de fins al 62% en 2 anys. El treball de *Castle* i col del 2009 aprofitava dades de l'estudi ALTS (estudi per a establir maneig de

lesions ASC-US i LSIL) per a entendre l'evolució de les lesions CIN-2. Van observar que presentaven major incidència de lesions CIN-2 aquelles pacients que se'ls realitzava colposcòpia i biòpsia en el moment del diagnòstic de la citologia alterada, si les comparem amb les que es feien seguiment amb citologia i colposcòpia als 12 mesos. D'aquí es va extreure una regressió del CIN-2 del 40% amb una progressió a CIN-3 del 22% i a CCU del 5% en més de 12 mesos des del moment del diagnòstic.

En un treball l'any 2010, Discacciati i col., en un estudi prospectiu, van observar el comportament de les lesions CIN-2 durant 1 any de control. Les seves dades descrivien que les pacients biopsiades de CIN-2 que provenien de citologies de baix grau tenen una taxa de regressió del 74%.

Totes aquestes dades justifiquen una revisió crítica del maneig cínico-terapèutic de les lesions de CIN 2. Segons els resultats d'aquests treballs es pot considerar un maneig conservador o observacional durant un lapse de temps raonable, i així evitar tots els problemes de comorbilitat posteriors que en poden derivar, en aquestes pacients que en general són joves i en edat fèrtil. En aquesta línia, cal destacar que algunes guies de pràctica clínica ja s'han actualitzat i donen la opció de maneig conservador del CIN-2 en determinats casos: pacients de màxim 25-30 anys, amb lesió petita i visible (un quadrant) i en gestants (1).

Actualment s'està duent a terme a Nova Zelanda i Austràlia un estudi prospectiu multicèntric liderat per Sykes i col, sobre la regressió del CIN-2 en pacients menors de 25 anys i factors de risc, amb l'objectiu d'obtenir recomanacions sobre el maneig d'aquestes pacients (126).

1.10.2. OBSERVACIÓ SENSE TRACTAMENT

És una opció de tractament que requereix uns criteris estrictes de compliment, com són que es pugui realitzar un seguiment periòdic, que la colposcòpia sigui satisfactòria amb ZT visible, lesió visible no extensa, absència d'afectació endocervical, i que la pacient entengui bé i accepti el risc. Si s'acompleixen aquestes condicions les dones amb una lesió de CIN 2 poden ser controlades un màxim de 24 mesos, i seran sotmeses a un tractament exèrètic en cas de persistència de la lesió CIN 2 al final del seguiment o bé d'evolució a CIN-3 abans de la finalització d'aquest període.

Tal i com es pot observar a l'algoritme de la Figura 10, el protocol de la SEGO recomana control cada 6 mesos amb citologia i colposcòpia durant 2 anys i detecció del VPH als 12 mesos. En aquells casos en que la citologia, VPH i colposcòpia finals siguin normals es repetirà citologia i VPH als 3 anys, i la pacient podrà tornar al cribratge normal en cas de mantenir-se sense alteracions. Davant qualsevol alteració durant el seguiment, s'ha de biopsiar la lesió de nou, i en cas de demostrar persistència de CIN-2 als 24 mesos es recomana realitzar un tractament exèrètic.

Davant el risc de perdre pacients durant el seguiment, i que acabin desenvolupant un CCU, seria bo poder identificar aquestes lesions CIN-2 que tenen potencial de regressió o bé les que tenen més risc d'evolucionar, de manera que es pogués adequar el protocol en funció del risc real una major seguretat del protocol que necessita cada pacient.

1.10.3. TRACTAMENTS EXCISIONALS

Es basen en l'exèresi de tota la zona de la lesió, amb marges amples, per permetin valorar fins on arriba la lesió i també si hi ha o no invasió de l'estroma. Els tractaments excisionals són procediments quirúrgics, que a més a més de la lesió, en la seva quasi totalitat també extirpen tota la zona de transició cervical, per tal de tenir bon marge quirúrgic i per assegurar-nos que no queda lesió no visible residual, realitzant el que es coneix com a conització.

La conització cervical es pot realitzar be amb una nansa diatèrmica, un tipus de bisturí elèctric monopolar, i s'anomena segons el seu acrònim en anglés LEEP (large loop electró-excision procedure) o LLETZ (large loop excision of transformation zone) . Realitzar una conització amb nansa és una tècnica fàcil de fer, que es pot fer de manera ambulatoria a consulta externa amb anestèsia local o bé a un quiròfan ambulatori o central. Idealment amb una sola passada de bisturí elèctric en forma de nansa es pot extreure tota la zona de transformació i així ser analitzada en bloc. També es pot realitzar una conització amb làser, tot i que es necessita més entrenament i és més cara, alguns autors defensen que és més precisa i permet valorar millor els marges de ressecció. Finalment, la conització es pot realitzar amb bisturí fred (cold knife conization). És la tècnica més antiga, que permet exèresis més àmplies amb més control de marges i millor profunditat. En ser més radical, és a dir en treure més teixit, és més agressiva, i pot donar lloc a més complicacions. Cada cop es

fa menys servir, només en casos molt seleccionats en que la lesió pot ser més endocervical o glandular, o amb colposcòpia insatisfactòria.

1.10.4. TRACTAMENTS DESTRUCTIUS

Aquests procediments es basen en destruir el teixit de la ZT mitjançant làser de CO2 o bé crioteràpia. L'inconvenient és que la destrucció impossibilita l'obtenció d'una peça histològica per estudiar, amb lo que no es pot descartar la presència d'una lesió major o fins i tot amb infiltració. Es per aquesta raó que els tractaments destructius s'indiquen en el maneig de lesions de baix grau, en que hi hagi una correspondència citològica i histològica, o bé en lesions de baix grau molt extenses i/o que s'estenen a fons de sac vaginal. En aquests casos, la colposcòpia ha de ser satisfactòria, i sobretot no hi ha d'haver sospita de lesió endocervical (caldrà tenir un legrat endocervical negatiu).

1.10.5. TRACTAMENT SENSE BIÒPSIA: VEURE I TRACTAR.

Aquesta tècnica és únicament vàlida quan no hi ha opció de seguiment de la pacient. Es realitza quan tenim una citologia de HSIL i uns canvis majors suggestius de lesió d'alt grau, però sense confirmació histològica. Es realitza un tractament exerètic tipus conització amb nansa diatèrmica.

1.10.6. HISTERECTOMIA

Realitzem una histerectomia o la exèresi de tot l'úter quan no sigui possible un maneig més conservador amb conització. Un exemple seria una segona o tercera conització en la qual el coll s'ha escurçat tan que ja no és accessible per via vaginal.



Figura 10. Algoritme actuació CIN-2/3 SEGO (1).

1.11. CONSEQÜÈNCIES OBSTÈTRIQUES TRACTAMENT EXCISIONAL

És important considerar que del tractament de les lesions CIN tot i la conseqüència esperada de eliminar una lesió amb capacitat de progressió a un CCU, se'n deriven una sèrie de conseqüències i efectes adversos que s'han de tenir presents en el moment de la seva indicació. Aquesta morbiditat derivada, sol manifestar-se de manera immediata o aguda durant i després de la cirurgia, generalment en forma de sagnat, lesions a estructures veïnes, com la vagina, o bé infecció. Però les conseqüències a llarg termini principalment en dones en edat fèrtil amb desitjos genèsics, tampoc són del tot insignificants.

En general, l'edat mitja de les pacients que requereixen un tractament local per lesió intraepitelial preinvasiva és similar a les dones que tenen el seu primer fill.

Clàssicament el tractament sobre el cèrvix per lesions preinvasives ha anat associat a un augment del risc de part preterme (abans de les 37 setmanes de gestació), i així com de ruptura prematura de membranes en prematurs, que donava com a resultat un augment de la morbiditat i de la mortalitat perinatal (127–137).

Destacar entre els metaanàlisis publicats al respecte, el realitzat per Kyrgiou i col l'any 2006 (127). Aquest metanàlisi, reunia dades de 27 publicacions, i tenia com a objectiu esbrinar les conseqüències del tractament del CIN en dones joves, sobre la seva fertilitat i problemes en les gestacions següents. Van concloure que la conització a bisturí fred augmentava el risc de part preterme, de baix pes al néixer, i de cesària. La LLETZ estava associada a un risc augmentat de part preterme, de baix pes al néixer, i de ruptura prematura de membranes preterme. No van trobar associació de la conització amb làser amb problemes obstètrics, ni tampoc de la destrucció de la lesió amb làser. Tampoc van trobar clarament cap associació a problemes de fertilitat.

Quan van analitzar la relació entre l'escurçament del cèrvix i el tamany de la peça quirúrgica en 3 estudis que contenien aquestes dades, van trobar un risc augmentat de part preterme amb una peça quirúrgica major de 10mm i que augmentava conforme la longitud de la peça quirúrgica creixia (127).

Posteriorment, el 2008 Arbyn i col al va realitzar un altre meta-anàlisi, a partir de 20 estudis publicats, amb unes conclusions similars. Aquest grup va trobar que tots els procediments quirúrgics per a tractar les lesions CIN estaven associats amb un

augment de la morbiditat obstètrica, i que particularment la conització amb bisturí estava associada a complicacions obstètriques severes, a més que la conització amb làser associava un augment significatiu de la mortalitat perinatal i del baix pes al néixer. La conització tipus LLETZ augmentava el risc obstètric però en la majoria d'estudis de manera no significativa, tot i que si que mostrava una tendència cap a problemes obstètrics. L'ablació amb làser quedava exclosa de causar problemes obstètrics de manera unànime en tots els estudis.

Una de les explicacions possibles de la patogènia de la conització causant problemes de part preterme i ruptura prematura de membranes seria l'extirpació i destrucció de teixit cervical que dona suport mecànic a la gestació, de manera que tractaments locals com ablació amb làser o crioteràpia que minimitzen el dany als teixits no afectarien al curs de la gestació (136). Això explicaria que tractaments més agressius com la conització a bisturí tinguin problemes obstètrics severs més freqüents.

Altres expliquen altres mecanismes pel qual apareixen les complicacions obstètriques. Postulen alteració en el tipus de col·lagen en el teixit regenerat i també un canvi en la flora vaginal com un augment de la vaginosi bacteriana, que està augmentada en pacients amb lesions tipus CIN (128).

El 2016 es va publicar un altre meta-anàlisi altre cop per Kyrgiou i col, per a intentar trobar si separant i estratificant les pacients amb lesions tipus CIN seguien tenint un risc augmentat de problemes obstètrics com el part preterme, i intentar saber si les lesions CIN actuaven com a factor de confusió a l'hora d'analitzar les dades dels diferents estudis en els meta-anàlisis anteriors. Van concloure que qualsevol tipus de tractament local de les lesions preinvasives augmentava el risc de patir parts pre-terme i problemes posteriors, a excepció de petites exèresis que no tenien gairebé efecte. Es va observar un augment de part pre-terme sever, amenaça de part pre-terme, RPM pre-terme, corioamnionitis, baix pes neonatal, i mort perinatal. A més, la taxa de cerclatges estava molt augmentada en aquesta població comparada amb el grup de controls. També destacava l'efecte del tamany de la peça de conització: com més gran fos la peça més augmentat estava el risc, sobretot a partir de 10mm de profunditat que es doblaria el risc, i per 15-17mm es triplica.

Tot i no tenir grans estudis amb dades al respecte, els resultats confirmaven que les dones amb CIN tenien un risc de base elevat per a prematuritat major a la població general, i que el tractament de les lesions tipus CIN, sobretot els tractaments radicals, augmentaven molt el risc (130).

Per tal de minimitzar les conseqüències derivades de les conitzacions, en posteriors gestacions, es proposa identificar aquestes dones com a de Risc per a Part Preterme, des de l'inici de la Gestació. D'aquesta manera podrien ser sotmeses a controls intensius clínics i periòdics de la longitud cervical per tal de detectar de manera precoç aquesta eventualitat i rebre el tractament adient. (131,132).

De totes maneres, la conclusió pràctica més important de tots els estudis anteriors, seria que en dones joves amb desitjos genèsics s'haurien d'exhaurir al màxim les maniobres conservadores, adequar de manera més precisa les indicacions de conització per tal d'evitar fer sobretractaments en dones susceptibles de tenir risc de prematuritat en gestacions posteriors, i que de fet sembla que independentment del tipus de maneig clínic tenen un cert risc augmentat de part preterme pel sol fet de la lesió preinvasiva cervical tipus CIN.

1.12.COM SELECCIONAR PACIENTS CANDIDATES A OBSERVACIÓ

Con s'ha comentat anteriorment, el diagnòstic de la lesió preinvasiva i la seva classificació en categoria lleu, moderada o severa, és tot un repte. Els estudis confirmen que diferents anatomo-patòlegs trobaran diferències en els diagnòstics entre CIN-1 i CIN-2, i entre alguns CIN-2 i CIN-3, i no sempre coincidiran en el diagnòstic (138,139).

En el seu estudi, Gage et al, van buscar el grau de correlació en el diagnòstic de CIN en 15 laboratoris d'anatomia patològica diferents i es van estudiar 37846 biòpsies. El repte era trobar els problemes diagnòstics per al CIN-2, i intentar trobar si es tracta realment d'una entitat sola, o bé un grup heterogeni format per infeccions benignes de VPH similars al CIN-1, i lesions pre-canceroses reals similars al CIN-3. La seva conclusió principal va ser que la taxa de correlació entre els patòlegs de tots els diferents laboratoris era força baixa, i hi havia una proporció de CIN-2 molt variable. Donat que el CIN-2 té un tractament definit excisional, es podia dir que seguir un tractament o altre depenia del laboratori on s'enviés la mostra(139).

En el seu estudi, Mittal i col, van estudiar biòpsies de 9630 dones que havien donat positiu en detecció de VPH o d'àcid acètic en observació directa, amb 2 patòlegs diferents a doble cec(138). Aquest grup buscava estudiar la correlació de concordança entre els 2 patòlegs. La seva conclusió va ser que el diagnòstic de CIN era molt poc reproduïble, inclòs quan es tenia en compte el test per a detecció de VPH fos positiu (millorava lleument la correlació). Van calcular per separat la reproduïbilitat pel CIN-2, veient que era la pitjor de totes, igual que Dalla Palma i col (140), i van arribar a qüestionar-se si s'havia de considerar el CIN-2 realment un estadi independent en l'escala de les lesions CIN i formar part del CIN-1 o del CIN-3.

El significat biològic i validació del CIN-2 també ha estat qüestionat, ja que la seva història natural s'assembla més a la de un CIN-1 que a un CIN-3 (118). Hi ha estudis com el de Guedes i col. que demostren un poder de regressió del CIN-2 gens menyspreable. Aquest grup en un estudi prospectiu va trobar que en 1 any el 44% de les pacients estudiades regressaven a la normalitat, i que el 22% regressaven a un CIN-1(141).

La reproductibilitat en el diagnòstic del CIN és baixa a excepció pel CIN-3 que troba una correlació molt elevada. L'any 2015 el grup de Stoler va publicar un estudi retrospectiu sobre la reproductibilitat de les lesions CIN a l'hora del diagnòstic anatomo-patològic. Mitjançant 3 anatomo-patòlegs independents especialistes en ginecologia van tornar a estudiar un total de 21297 biòpsies cervicals. L'acord de diagnòstic en el CIN-1 i el CIN-2 només arribava al 38%, i en el cas del CIN-3 fins al 68%(142).

El gran repte, el suposen els diagnòstics de CIN 2, que tot i tenir un risc de progressió, aquestes lesions tenen un potencial de curació espontània que pot arribar al 60% tal i com hem pogut anar veient en els anteriors estudis. Identificar aquests casos de CIN2, que es podrien beneficiar d'un maneig inicial conservador, evitaria un gran número de sobretractaments i en conseqüència de morbiditat derivada.

Es necessiten factors objectius que defineixin les lesions tipus CIN i que ens expliquin quin comportament serà el que seguiran per a poder adaptar-nos millor al seu maneig i tractament adient (142) per a no dependre de només del grau histològic, que és més subjectiu.

1.13.BIOMARCADORS

De fa anys diferents estudis han anat mostrant que determinades molècules, els anomenats biomarcadors, ens poden ajudar a definir les lesions tipus CIN. Amb la seva ajuda sumariem tècniques objectives al diagnòstic més subjectiu de l'anatomopatòleg sobre la citologia i biòpsia, i a la detecció del VPH. La majoria estan relacionades en regulació del cicle cel·lular, i queden alterades per la infecció del VPH (143). Entre tots aquests biomarcadors en destaquen dos: la p16INK4a i la Ki-67.

1.13.1. P16INK4a

La proteïna p16 és una proteïna supressora de tumors present en totes les cèl·lules. El biomarcador més important i més utilitzat és el p16INK4a, una isoforma de la p16 sobre la que podem realitzar una tinció immunohistoquímica, de manera que podem identificar les cèl·lules que estan expressant aquesta proteïna .

La p16 inhibeix proteïnes quinases dependents de ciclins que regulen el cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (pRb). En condicions normals, aquest fenomen pot provocar que la cèl·lula pari del seu cicle, i fins i tot a induir l'apoptosi, si es produeixen errors genètics. D'aquesta manera aquests errors no s'acumularan al genoma de la cèl·lula i no comportaran una transformació neoplàsica (144)(145)(Figura 11).

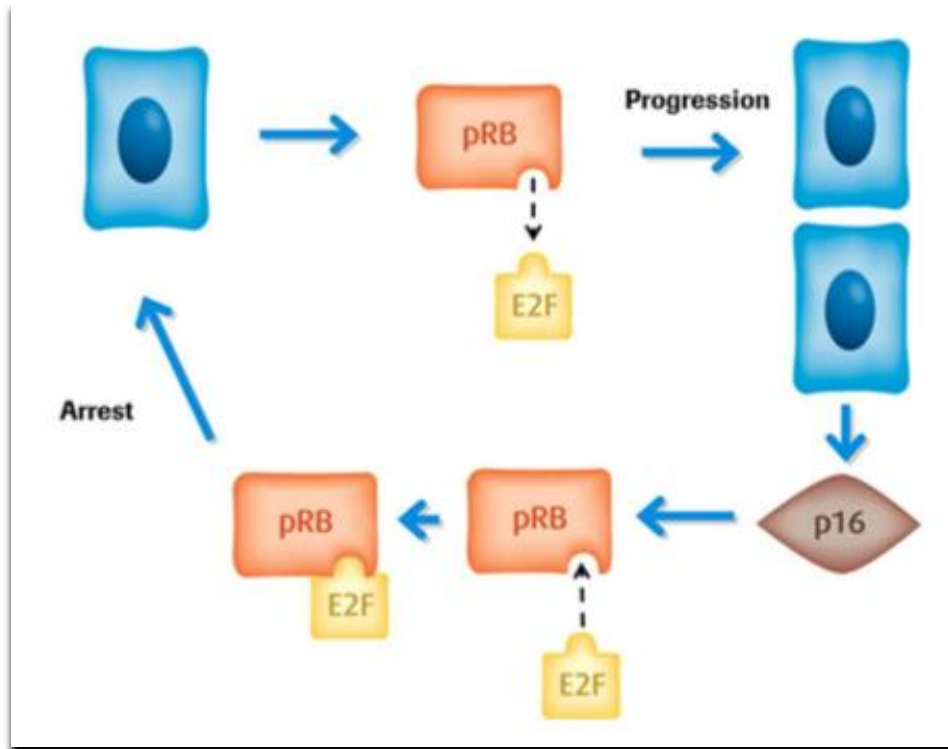


Figura 11. Funció de p16, pRb i E2F en cicle cel·lular normal(144).

Tal i com s'il·lustra a la figura 12, quan un HR-HPV infecta una cèl·lula de l'epiteli cervical, s'integra en el genoma de la cèl·lula, la proteïna E2 provoca un augment de la síntesi de la E6 i de la E7 virals, que a l'hora provocaran un augment de la p53 i la pRb de la cèl·lula hoste respectivament. El bloqueig de la E7 sobre la pRb provocarà que la proteïna E2F quedi lliure i estigui constantment estimulant la síntesi de p16. Aquest augment de síntesi de p16 el podem identificar mitjançant tècniques d'immunohistoquímica.

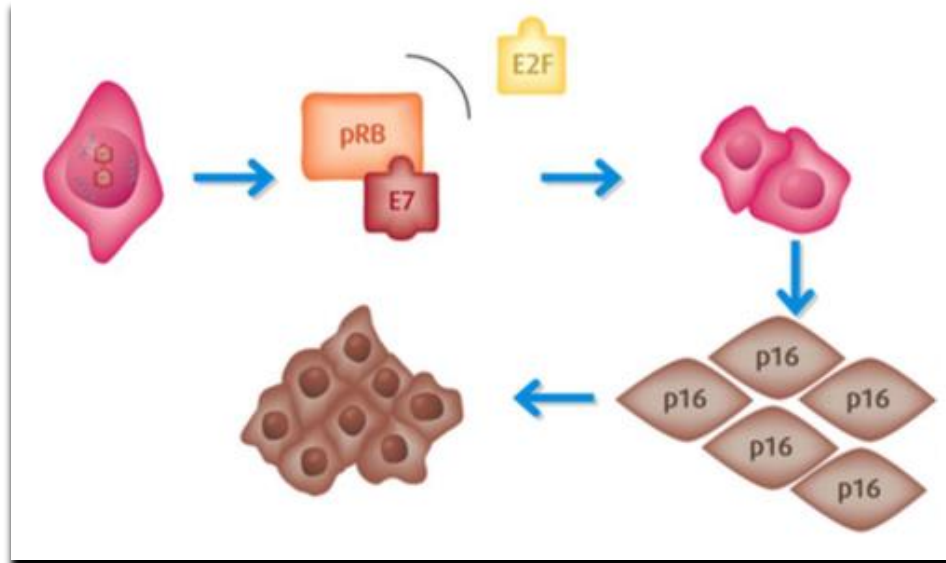
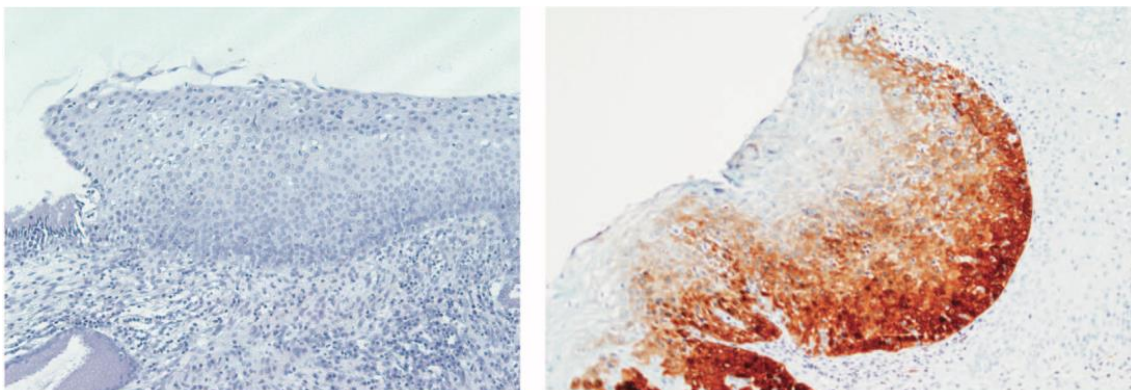


Figura 12. Funció de p16, pRb i E2F en transformació oncogènica (144)(145).

La tinció per a p16 ve comercialitzada com a CINTEC® Histology Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) i la seva positivitat ve definida com coloració de nucli i citoplasma marronàcia en les cèl·lules de l'epiteli cervical. La tinció difusa i intensa de l'epiteli serà considerat positiu; la coloració de cèl·lules aïllades o petits grups de cèl·lules serà considerat negatiu (146–149). La imatge 8 és un exemple de tinció per a p16, enfrontada a una tinció de biòpsia cervical amb tinció d'hematoxilina-eosina.



Imatge 9. Esquerra epiteli cervical amb tinció hematoxilina-eosina. Dreta tinció per a p16INK4a.

Diferents treballs han demostrat que la tinció p16INK4a ajuda en la identificació de CIN i en la seva classificació en aquells casos dubtosos (147,150,151). En cap cas però s'ha d'utilitzar únicament per a la seva definició com a lleu, moderada o severa sense tenir en compte la classificació morfològica donada pel patòleg(152,153).

Altres autors han intentat determinar si aquesta activitat proliferativa augmentada de les displàsies que queda reflexada en una p16 augmentada segons la tinció p16INK4a i en aquest cas, si en té algun significat a l'hora de predir el comportament d'aquesta lesió. Destacar l'estudi de Da Costa i col (154), del 2014 en que van avaluar retrospectivament 66 casos de CIN-1 i van trobar que aquelles lesions amb una p16 positiva estaven associades a progressió a CIN-2/3 ($p=0,042$). Van concloure que la p16 era capaç d'identificar aquelles lesions lleus però amb capacitat biològica de créixer a una lesió més severa en els propers anys. També van trobar que les lesions p16 negatives tenien una major tendència a la regressió i negativització, tot coincidint amb altres treballs publicats (155–159).

En el seu estudi Del Pino i col. van seguir durant 12 mesos a 138 pacients amb biòpsia de CIN-1, observant-ne la seva evolució(160). En els resultats mostraven que totes les pacients que van progressar a CIN-2/3 tenien una positivitats difusa per a p16 de tota la displàsia, indicant una clara associació de la positivitats intensa per a p16 amb la progressió. També es va observar que el fet de tenir p16 positiva aïllada/focal o negativa estava associat a regressar o com a molt persistir com a CIN-1. Algunes pacients amb p16 positiva van regressar, potser perquè a més de l'activació de la pRb calen altres situacions, una cadena d'esdeveniments com el cúmul d'error genètics i mutacions o d'instabilitat cromosòmica, que són necessàries per a la progressió en la carcinogènesi (155,160,161) i acabar tenint un CIN-2+ (153).

1.13.2. PROTEINA KI-67

La proteïna Ki-67 és una molècula localitzada al nucli cel·lular de les cèl·lules que no es troben quiescents o en fase G₀, o el que és el mateix en les cèl·lules en fase activa de replicació (fase G₁, S, G₂ i mitosi)(162). El fet que la seva expressió estigui lligada a cèl·lules en proliferació va donar peu a fer-la servir per a localitzar aquestes cèl·lules en teixits neoplàsics i elaborar índexs de proliferació de determinats grups de cèl·lules, que en alguns casos són útils per a preveure el comportament del teixit i tenir el risc de progressió i factor pronòstics en cas de que es tracti de malaltia. Per a aconseguir això

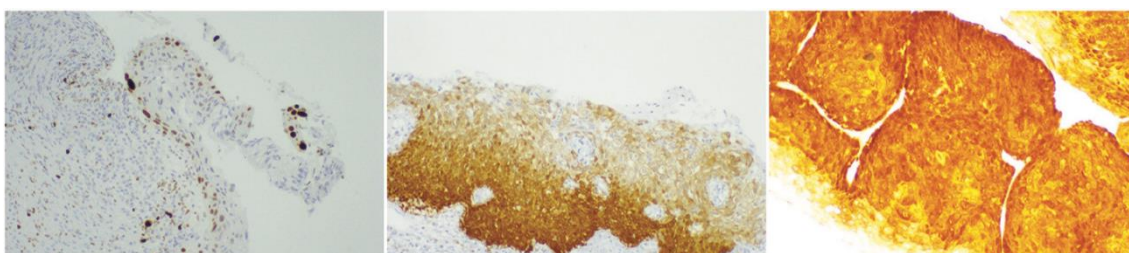
es van desenvolupar antígens que localitzaven la proteïna Ki-67 dins la cèl·lula i podien quantificar-ho en un índex de proliferació cel·lular segons el grau i percentatge de reactivitat per a l'antigen nuclear. L'antigen més utilitzat es el MIB-1. No existeix cap altra proteïna capaç de correlacionar al mateix nivell el grau de proliferació de determinada població cel·lular. S'ha utilitzat per a diferenciar diferents tipus de teixit, com en el cas del mieloma múltiple de la gammapatia monoclonal de significat incert. Però la gran utilitat roman en l'elaboració de l'índex de proliferació cel·lular en determinades neoplàsies com pròstata i mama, i formulació del risc de progressió i d'agressivitat.

El rol de la proteïna Ki-67 encara és desconegut, però es creu que té una íntima relació amb la progressió del cicle cel·lular però no en la carcinogènesi (163).

En diferents estudis Kruse i col. van aconseguir demostrar la utilitat de la proteïna Ki-67 per a diferenciar les lesions CIN i classificar-les com a baix i alt risc, a més de lligar la seva positivitat al risc de progressió del CIN-1. És una altra eina per aconseguir una millor reproductibilitat de les lesions CIN.

En estudis posteriors van demostrar una alta associació de l'augment del Ki-67 i la presència d'infecció per HR-HPV(164), i la seva capacitat de progressió a lesions d'alt grau (165). L'ús de la detecció de la Ki-67 milloraria el VPP de la classificació histopatològica(166) ja sigui en la versió original més subjectiva d'observació al microscopi, o en la seva nova versió de model quantitatiu d'anàlisi electrònica de la imatge.

La tinció immunohistoquímica per al Ki-67 ve comercialitzada com a Confirm® anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Ventana Roche Diagnostics, Tucson, Arizona). A la imatge 9 podem observar 3 seccions de teixit cervical positives per a la tinció immunohistoquímica per a Ki-67, amb diferent intensitat.



Imatge 10. Seccions de teixit cervical positiu per a immunohistoquímica per a Ki-67.

1.13.3. P16INK4a + KI-67

La citologia sola no té una sensibilitat suficient i a més té una variabilitat interobservador no despreciable. Quan se li afegeix el test de detecció de l'HPV s'aconsegueix una sensibilitat del 95-97% però amb una especificitat encara millorable (93). A més, aquests tests seleccionen moltíssimes pacients susceptibles de tenir una lesió CIN que a l'hora de la veritat mai evolucionaran a una lesió d'alt grau. Això genera una gran quantitat de visites de control i seguiment, amb el conseqüent increment del dispendi econòmic, però que a més a més no ajuda a localitzar les lesions amagades d'alt grau dins el subgrup LSIL, donat que el test de detecció del HPV no és útil per la seva alta prevalença al subgrup del voltant del 80%.

Donat que s'ha provat la utilitat de la p16 i la ki-67 per al cribratge del CCU, i de la seva relació amb la progressió de les lesions per separat, varis estudis van optar per la combinació dels marcadors. El seu objectiu era intentar aconseguir una major certesa en el diagnòstic de les lesions d'alt grau i evitar seguiments i tractaments innecessaris.

El kit CINTec Plus ® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) combina ambdues tincions en el que s'anomena la tinció dual, i fa anys que està comercialitzat tan per a citologia com per a mostres de biòpsia cervical.

L'any 2014 Ordi i col. Van realitzar un estudi per a comparar la utilitat del p16/ki-67 i la del test de detecció del VPH en 1123 dones referides a colposcòpia, amb l'objectiu de determinar la utilitat en l'avaluació morfològica de la doble tinció del CINTec Plus ®. Van obtenir resultats que doblaven l'especificitat i el VPP del test de detecció del VPH, sense gairebé alterar-ne la sensibilitat per a detectar lesions CIN d'alt grau, i destacant que si s'afegia l'avaluació morfològica clàssica d'anatomia patològica, l'especificitat del CINTec Plus ® augmentava en 90%.

Una de les indicacions estaria en pacients joves menors de 30 anys on el Test de detecció del VPH no és útil per l'alta prevalença de la infecció, o bé en lesions LSIL per aquesta mateixa raó(167).

Wentzensen i col. van publicar un dels primers estudis on buscaven reduir el nombre de colposcòpies tot trobant millors taxes de detecció de CIN-2+ en pacients amb ASC-US i LSIL amb VPH positiu. Van demostrar aplicant la tinció dual p16/Ki-67 que es podia reduir a la meitat el nombre de colposcòpies realitzades(168).

Altres estudis avaluant el p16/ki-67 assenyalen la mateixa sensibilitat però millor especificitat comparant amb el test de detecció de VPH per a detectar CIN-2+ (169–171).

El 2013 el grup d'Ikenberg van publicar a l'estudi PALMS (Primary ASC-US LSIL Marker Study) resultats on milloraven la sensibilitat i especificitat de la citologia clàssica gràcies a la tinció dual de p16/Ki-67. L'especificitat augmentava fins un 95,2%, i la sensibilitat es mantenia lleugerament per sobre del 90% de la citologia + HPV, en dones de més de 30 anys; a més a més es reduïa la taxa de falsos positius en un 50%. Cal destacar que totes aquestes dades estaven aplicades al cribratge poblacional, no com estudis anteriors que s'aplicaven a mostres amb citologies alterades prèviament (168,169,171–174) o bé amb detecció de HPV positiu (170,175,176). Davant aquests resultats, els autors recomanaven el seu ús en dones joves on la tècnica de detecció del VPH no era útil per ser molt prevalent, com en el cas del LSIL(177).

Caldria mencionar l'associació entre la infecció per HR-HPV i la positivitat per a la tinció dual p16/Ki-67, que fa augmentar molt el risc de trobar un CIN-2/3 en els següents 2 anys(178).

1.14. CONSIDERACIONS

Com hem pogut comprovar en apartats anteriors un alt percentatge de la població femenina entrarà en contacte amb el VPH, però només un petit percentatge desenvoluparà lesió CIN. D'aquestes dones, la majoria eliminaran la lesió, i un altre petit percentatge no podrà i la mantindrà. El fet de trobar lesions que molt probablement desapareixeran no deixa de crear una falsa seguretat. Provoca controls excessius que augmenten els costos i els recursos humans i tecnològics, per un bon seguiment d'una lesió que podria desaparèixer sola. D'aquí la importància d'identificar aquestes pacients i poder definir quin tipus de lesió tenen i saber amb exactitud quina serà la història natural de la lesió.

El fet que una infecció per VPH persisteixi, sense poder ser eliminada per l'hoste, depèn de varis factors ambientals i de propis de la pacient. Identificant aquests factors de susceptibilitat ens permetrà identificar quines pacients tenen una major probabilitat de desenvolupar lesions pre-neoplàsiques, que ens permetin centrar tots els esforços en elles per evitar l'evolució a un càncer, i també triar el millor maneig i tractament per a les altres lesions amb baix risc de progressar.

Com hem explicat anteriorment, les lesions CIN-2 queden en mig camí entre les CIN-1 i les CIN-3, i donat que fins a un 60% poden desaparèixer podem afirmar que estem menyspreant el poder de regressió del CIN-2. Per a identificar aquestes lesions que regressar gran s'han proposat biomarcadors que ens definiran la naturalesa de la lesió CIN-2 a estudi, i ens orientaran sobre la probabilitat a evolucionar a un CIN-3 o de regressar. Cal en emfatitzar que la clau per a millorar el maneig de les lesions amb possibilitat de regressar està en seleccionar bé les lesions segons les seves característiques biològiques.

2. HIPÒTESI

La història natural del càncer de cèrvix s'explica a partir de la lesió precursora, la neoplàssia cervical intraepitelial (CIN), que apareix a partir d'una infecció persistent del virus del papil·loma (VPH). Per acció de diferents cofactors ambientals i intrínsecs de la pacient, la lesió CIN és modulada i pot regressar a la curació o bé evolucionar amb els anys a un càncer de cèrvix. Aquests factors encara no estan ben definits per a poder predir quin comportament farà aquesta lesió.

La lesió estudiada, el CIN-2, es troba entre el CIN-1 i el CIN-3, i té unes taxes de curació espontània d'entre el 40-60% i de progressió a un CIN-3 de 10-20%.

Actualment el tractament del CIN-2 és la conització, tot i que les últimes propostes en les guies clíniques prefereixen un maneig més conservador inicialment, sobretot en pacients joves, de manera que es pugui evitar un sobretractament de les lesions i així es pugui evitar possibles repercussions obstètriques de la cirurgia.

Per tal de poder identificar marcadors que ens puguin predir l'evolució de les lesions CIN-2, proposem estudiar la p16 i el Ki-67, uns biomarcadors que es troben augmentats en la seva expressió amb la infecció per VPH que ha causat lesions tipus CIN al cèrvix uterí.

La hipòtesis del nostre treball és que l'estudi de l'expressió de p16 i Ki67 pot predir l'evolució clínica de la lesió CIN2. D'aquesta manera es podrien identificar aquelles lesions amb una major probabilitat de remetre i per tant no tributàries de tractar, o bé amb major probabilitat de progressar a un CIN-3 i tributàries de rebre tractament ja en el moment del seu diagnòstic.

3. OBJECTIUS

3.1 OBJECTIU PRINCIPAL

- Avaluar el valor predictiu de l'expressió de p16 en l'evolució de les lesions CIN-2.
- Avaluar el valor predictiu de l'expressió de Ki-67 en l'evolució de les lesions CIN-2.

3.2 OBJECTIUS SECUNDARIS

- Definir les característiques epidemiològiques de les pacients amb CIN-2 durant el període estudiat en la nostra població.
- Relacionar els factors de risc epidemiològic de la població a estudi amb l'evolució de les lesions CIN-2
- Calcular les taxes de curació, regressió, persistència i progressió de les lesions CIN-2 a la nostra població.
- Estudiar la distribució del genotip de VPH i la seva relació amb l'evolució de la lesió CIN-2
- Relacionar el tipus de citologia prèvia al diagnòstic de CIN-2 amb l'evolució de la lesió.
- Avaluar la relació del patró colposcòpic en el moment diagnòstic del CIN-2 amb l'evolució posterior de la lesió.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. POBLACIÓ A ESTUDI

Es va dissenyar un estudi prospectiu observacional on s'inclouïen pacients diagnosticades de CIN-2 dins la població de referència del Parc de Salut Mar i que complien els criteris d'inclusió. El nostre treball compartia la cohort de pacients reclutades amb un altre estudi, un altre projecte de tesi doctoral també sobre la regressió del CIN-2, però centrat en el paper que hi juga la immunitat amb les cèl·lules Natural Killer (NK) com a protagonistes. Així és el cas, que els materials i mètodes i el protocol de seguiment és compartit entre els dos treballs.

Com a criteris d'inclusió es va definir:

- dones diagnosticades de CIN-2 mitjançant biòpsia exocervical dirigida per colposcòpia.
- Majoria d'edat
- Colposcòpia satisfactòria amb zona de transformació i lesió visible que no afectés endocèrvix
- Acceptació per part de les participants de conducta expectant amb seguiment estricte cada 4 mesos durant 2 anys, signant consentiment informat aprovat pel Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica del Parc de Salut Mar (Annexe).

I com a criteris d'exclusió:

- No poder atendre al seguiment proposat.
- Preferir tractament exerètic
- Colposcòpia no satisfactòria
- Tractaments cervicals previs per patologia de VPH
- Citologia prèvia de ACG
- Biòpsia de CIN-2 endocervical
- Immunodepressió

El càlcul del tamany de la mostra a estudi per a una regressió del CIN-2 del 40% va ser de 79 pacients, però es va decidir reclutar 100 pacients considerant les possibles pèrdues. Es van recollir les dades epidemiològiques i anatomo-patològiques de totes les pacients incloses.

Es va realitzar un estudi de seguretat després del primer any de seguiment per a valorar si calia suspendre l'estudi si es detectava una taxa de progressió major al 30% (10% major al 20% descrit a la majoria d'estudis)(179).

4.2. RECLUTAMENT I SEGUIMENT DE LES PACIENTS

Totes les pacients diagnosticades de CIN-2 en l'àrea d'influència del Parc de Salut Mar van ser derivades a la consulta de Tracte Genital Inferior de l'Hospital del Mar, on especialistes en Patologia Cervical del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital del Mar van realitzar el seguiment des de desembre 2011 fins a octubre de 2013.

En la primera visita es va informar del resultat de la biòpsia cervical, del seu significat i pronòstic. A més a més, es va informar de les opcions de maneig terapèutic, en el context d'aquest estudi clínic, explicant el tractament protocol·lari i d'aleshores amb conització o bé donant opció també de la possibilitat de seguir una conducta expectant durant 2 anys amb visites estrictes cada 4 mesos, sempre explicant els avantatges i inconvenients de les dues opcions. S'adjuntava el full informatiu i el consentiment informat que signaven en cas d'acceptar entrar a formar part de l'estudi (Annexe). L'estudi de marcadors biològics p16 i Ki-67 en el que es basa aquesta tesi finalitzava al primer any de seguiment, amb l'estudi preliminar de l'evolució de les lesions fet per a comprovar que no hi havia una taxa de progressió elevada. Posteriorment les pacients seguien dins l'estudi sobre paper de les cèl·lules NK en l'evolució del CIN-2, amb la que també s'ha realitzat un treball de tesi doctoral.

Després es procedia a anamnesi dirigida, exploració física i ginecològica especialitzada amb una citologia si havien passat un mínim de 4 mesos de l'anterior i una colposcòpia detallada. A més a més es prenia una mostra de sang per a determinació de serologies (VIH, citomegalovirus, lues, herpes tipus 2) i anàlisi de cèl·lules NK.

A partir d'aquí es citaven a les pacients cada 4 mesos fins a completar 2 anys de seguiment. A cada visita es realitzava una citologia i una colposcòpia. Només es realitzava una nova biòpsia cervical si es sospitava empitjorament del diagnòstic, i en el control del 1er any de seguiment.

Tota pacient que volgués deixar l'estudi, que es diagnosticués de CIN-3 en el seguiment, o que finalitzat el període de 2 anys de control persistís amb la lesió

de CIN-2 era tractada amb una conització. En cas de negativitzar-se la lesió era donada d'alta al seu ASSIR.

4.3. VARIABLES

Totes les dades de les diferents variables estudiades es recollien en el full de recollida de dades específic per a cada pacient, i es podrien classificar:

- Socio-demogràfiques i antecedents ginecològics i obstètrics
- Clíniques: ginecològiques i obstètriques, i mèdiques en general
- Biològiques: citologies i biòpsies prèvies, i genotip del VPH, resultat tinció immunohistoquímica p16/ki67
- Terapèutiques: resultats de colposcòpies, biòpsies i peces de conització i temps de seguiment.

Alhora les dades recollides s'anaven recopilant i classificant en una base de dades dissenyada per a l'estudi.

A més d'aquestes variables del nostre treball, també s'inclouen dades immunològiques per a l'estudi del valor predictiu de les cèl·lules NK.

4.4. DEFINICIONS

Durant el seguiment les lesions podien canviar i evolucionar tan a una millora en el diagnòstic com a un empitjorament.

- Regressió completa: desaparició de la lesió completament, amb 2 controls seguits normals.
- Regressió parcial: pas enrere de la lesió a un CIN-1 en la biòpsia final.
- Persistència: continua amb la mateixa lesió CIN-2 amb la que va entrar a l'estudi.
- Progressió: en qualsevol moment de l'estudi una biòpsia informa de una evolució a CIN-3.

Totes aquelles pacients que no es van incloure a l'estudi o que no van voler seguir estant dins de l'estudi i no van seguir el protocol establert, es van considerar pèrdues donat que es tractava d'un estudi observacional.

El genotip del VPH d'alt risc analitzat mitjançant COBAS es va classificar com:

- VPH-16: detecció de VPH-16 independentment de la presència o no d'algun altre virus d'alt risc.
- VPH-18: detecció de VPH-18 independentment de la presència o no d'algun altre virus d'alt risc.
- VPH-no16no18: detecció de VPH diferent a VPH-16 i a VPH-18, excloent una coinfecció aquests.
- VPH negatiu: no hi havia detecció de VPH d'alt risc.

Les citologies prèvies al diagnòstic de CIN-2 es van classificar en:

- NPCM: negatiu per a cèl·lules malignes
- ASC-US VPH positiu
- ASC-US VPH negatiu
- LSIL
- ASC-H

- HSIL
- Càncer invasor

Posteriorment per necessitat analítica els resultats de les citologies es van classificar en 2 categories:

- No HSIL: incloent NPCM, ASC-US, LSIL, ASC-H
- HSIL: incloent només els casos HSIL

L'edat es va classificar com una variable continua, que després es va agrupar en rangs d'edat. L'edat de la primera relació sexual es va recollir també com a continua, i després es va analitzar amb tall als 18 anys. El nombre de parelles sexuals també es va analitzar com a continua.

L'hàbit tabàquic es va descriure de manera dicotòmica: fumadores vs. no fumadores, i si havien estat fumant durant l'estudi.

En el mètode anticonceptiu es van fer servir 3 categories com a variable qualitativa nominal:

- Preservatiu
- Anticoncepció hormonal, en qualsevol de les seves presentacions
- Dispositiu intrauterí (DIU) o res

La paritat es definia com el nombre de parts que havia tingut la pacient, com una variable quantitativa. També es va recollir si estava embarassada durant l'estudi.

4.5. RECOLLIDA CITOLOGIA I DETECCIÓ DEL VPH

Les mostres de citologies es prenen amb el raspall Cervex-brush (Dispositius Mèdics Rovers, Oss, Països Baixos) per a citologia en medi líquid utilitzant vials de ThinPrep que contenen 30ml de PreservCyt (Hologic, Marlborough, MA, USA) que ens permet realitzar l'anàlisi patològic de la citologia i el test de detecció de VPH en la mateixa mostra(12).

Les citologies es van classificar segons el Sistema Bethesda(10). Per a la detecció del VPH vam fer servir el "Cobas 4800 HPV test) (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Amb aquest test es podia determinar la presència de 14 genotips diferents de HR-HPV, identificant per separat si es tractava de VPH-16 o de VPH-18, o bé un altre HR-HPV que no es tractava de VPH-16 o VPH-18.

Les mostres histològiques obtingudes en les biòpsies cervicals de les colposcòpies es mantenen en vials que contenen solució de formalina al 10% un màxim de 16-24h, per a ésser processades posteriorment en parafina i tenyides amb hematoxilina i eosina segons el mètode usual per a poder ser analitzades i classificades per anatomia patològica.

4.6. PROCESSAT DE MOSTRES

El diagnòstic histològic de CIN es va establir segons els criteris de la OMS i basat en criteris morfològics utilitzant tinció d'hematoxilina i eosina.

Les mostres van ser examinades per 2 patòlegs especialitzats en patologia del tracte genital . El diagnòstic de CIN 2 es va establir quan l'afectació del gruix epitelial abarcava els dos terços inferiors(11).

Un cop establert el diagnòstic de CIN-2 i la pacient era reclutada a l'estudi, es procedia a la tinció immunohistoquímica, per a p16 i per a Ki-67.

Les mostres fixades en formalina al 10% eren conservades en parafina i aleshores s'aplicava el Cintec® Histology Kit (Ventana Roche Diagnostics, Tucson, Arizona) per a la tinció de la p16, segons el manual del fabricant. Per a la ki-67 es va fer servir el l'anticòs diluït del clon 30-9, segons les indicacions del fabricant (Ventana Roche Diagnostics, Tucson, Arizona). Les mostres van ser processades automàticament amb el Benchmark XT (Ventana Roche Diagnostics).

En el cas de la p16, per a considerar una biòpsia com a tenyida havia de presentar tinció de nucli o citoplasma. Vam considerar positiu per a tinció de p16 quan trobàvem una tinció difusa, continua, o en bloc de com a mínim un terç de l'epiteli, segons ja s'ha descrit en altres estudis(11). Les tincions amb cèl·lules aïllades, dèbil, grups cel·lulars aïllats o que no fossin en bloc es van considerar negatius per a expressió de p16.

Per a la tinció del Ki-67 es va avaluar la tinció dels nuclis cel·lulars de les cèl·lules epitelials del cèrvix. Es considerava negatiu quan les cèl·lules positives es limitaven a la capa més interna suprabasal o bé quan no es detectava cap mena de immunopositivitat. D'altra banda, es considerava Ki-67 positiu quan s'observava cèl·lules positives per a la immunotinció en tot l'espessor del terç intern de l'epiteli, en els 2 terços interns, o bé en tot el gruix de l'epiteli.

4.7. ANÀLISI ESTADÍSTIC

En primer lloc es va realitzar un anàlisi descriptiu de les característiques clíniques i patològiques de les pacients, amb mitjanes i desviacions estàndard per a variables quantitatives, i freqüències i percentatges per a qualitatives.

Per a comprovar la normalitat de variables quantitatives contínues es va fer servir el test de Kolmogorov-Smirnov. Les variables contínues que no seguien la normalitat van ser analitzades mitjançant un test no paramètric U de Mann-Whitney, d'altra cas es va utilitzar el test t-student. Les variables categòriques es van avaluar fent servir el test de x² quadrada o test exacte de Fisher, segons apropiat.

Es va assumir un nivell de significació estadística amb un valor de p inferior a 0,05. Es va calcular el Risc Relatiu (RR) i la Odds Ratio i els seus intervals de confiança, segons les variables i construint taules de contingència quan era necessari.

Els anàlisis es van realitzar amb el programa informàtic SPSS Versió 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) per a Windows.

4.8. FASES DE L'ESTUDI

FASE 1 (Octubre 2011)

Presentació del projecte a l'equip investigador i disseny de circuits

Aprovació pel Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica

FASE 2 (Desembre 2011)

Sessió informativa als centres implicats i inici del reclutament

FASE 3 (Desembre 2011 - Octubre 2013)

Reclutament de les pacients

FASE 4 (Octubre 2015)

Finalitza el seguiment de pacients incloses en l'estudi.

Anàlisi preliminar el primer any de seguiment de les pacients.

FASE 5 (Setembre 2017 – Juliol 2018)

Redacció de la tesis

4.9. IMPLICACIONS ÈTIQUES.

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

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

5. RESULTATS

5.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ A ESTUDI

Tal i com descriu la figura 13, de les 158 pacients diagnosticades de HSIL/CIN-2 pel Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar i que es van derivar a la Unitat de patologia Cervical durant el temps de reclutament (desembre 2011-octubre de 2013), hi va haver 53 pacients que no van complir els criteris d'inclusió. De les restants 105, va haver 3 pacients que no van completar l'any de seguiment i es van considerar com a perdudes, i en 6 casos no es va obtenir suficient material en la biòpsia per a realitzar les tincions de p16 i Ki-67. Com a resultat només es van incloure en l'estudi un total de 96 pacients.

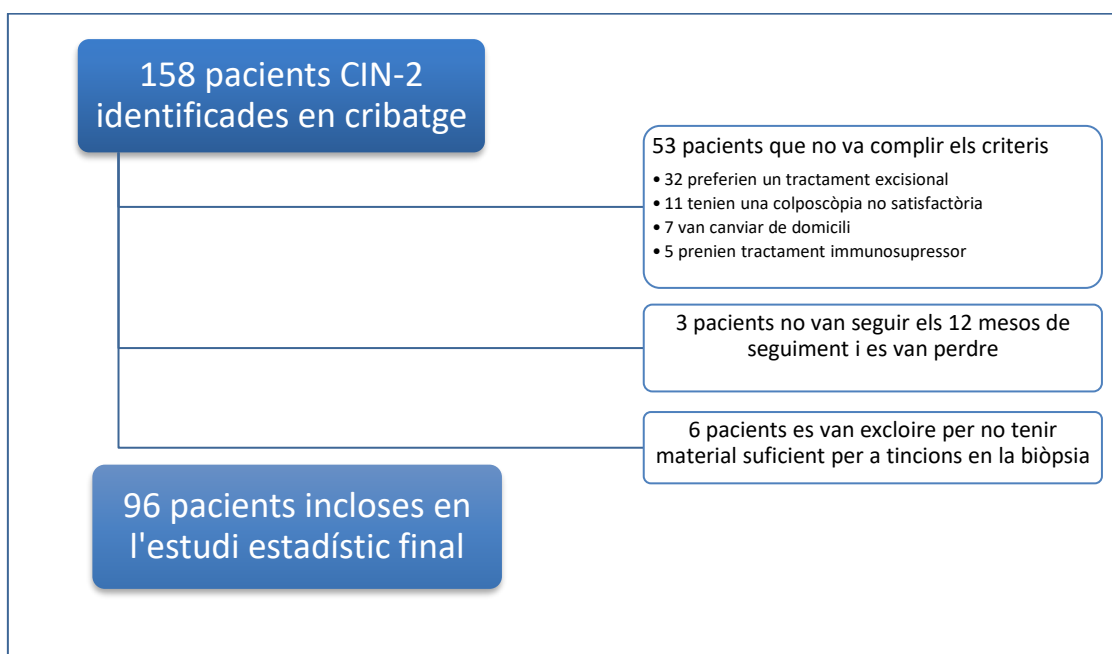


Figura 13. Diagrama de flux del reclutament de les pacients.

5.2. ANÀLISI DE LES VARIABLES EPIDEMIOLÒGIQUES

Les variables epidemiològiques de les 96 pacients incloses en l'estudi es recullen a la taula 19. La mitja d'edat va ser de 30 anys (rang 18-56). El 52,1% de les pacients eren fumadores en el moment del diagnòstic. L'edat mitja d'inici de les relacions sexuals era als 17 anys , (13 - 29 anys), i la mitja de parelles sexuals era de 9 en un interval molt ampli que anava de 1 parella fins a 40 parelles en total. El mètode anticonceptiu preferit era el preservatiu pel 42,7%, i el 41,7% de les dones feien servir un mètode hormonal. El 74% de les dones incloses eren nul·líparaes .

	n	%
Edat (anys)		
Mitjana (rang)	30 (18-56)	
Fumadora		
Si	50	52,1
No	46	47,9
Paritat		
Nul·lípara; n (%)	71	74
Té fills	25	26
Mètode anticonceptiu		
Preservatiu	42	41,7
Tractament hormonal	40	41,7
DIU o res	15	15,6
Edat d'inici de les relacions sexuals (anys)		
Mitjana (rang)	17 (13-29)	
Nombre total de parelles sexuals		
Mitjana (rang)	9 (1-40)	

Taula 19: Característiques socio-demogràfiques de la mostra a estudi

5.3. ANÀLISI DE LES CARACTERÍSTIQUES DE LES LESIONS CIN-2 AL DIAGNÒSTIC

5.3.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA COLPOSCÒPIA AL DIAGNÒSTIC

Tal i com s'ha explicat a l'apartat de material i mètodes, totes les pacients que s'inclouïen a l'estudi se les realitzava una colposcòpia en el moment del reclutament per a unificar criteris de diagnòstic colposcòpic entre els investigadors.

A la taula 20 i 21 es recullen les troballes de la colposcòpia al moment diagnòstic. Com es pot observar, no totes les imatges colposcòpiques suggerien lesió d'alt grau.

Tot i que s'ha de destacar que el 69,6% de les lesions tenien com a mínim una extensió de 2 quadrants o més del cèrvix, els canvis colposcòpics majors tan sols es van observar en el 46% del casos. De fet només el 37,4% de lesions acetoreactives eren intenses; el 16,2% de les lesions amb patró puntejat, grolleres o irregulars; i el 25,3% de les lesions tipus mosaic eren irregulars.

	Tipus 1: (n,%)		Tipus 2: (n,%)	
Zona de transició	n: 70 (70,7%)		n: 29 (29,3%)	
	Absent		Present	
Acetoreactives Intens	n: 62 (62,2%)		n: 37 (37,4%)	
	Regular		Irregular	
Puntejat	n: 58(58.5%)	n: 25 (25.3%)	n: 16 (16.2%)	
Mosaic	n: 53 (53.5%)	n: 21 (21.2%)	n: 25 (25.3%)	

Taula 20. Tipus de ZT i de patró colposcòpic

Dg Colposcòpic	Canvis menors	55	53,95%
	Canvis majors	47	46,10%
Tamany lesió	1 quadrant	31	30,4%
	2 quadrants	29	38,2%
	3 quadrants	20	19,6%
	4 quadrants	12	11,8%
	>= 2 quadrants	61	69,6 %

Taula 21. Diagnòstic colposcòpic i tamany de la lesió

5.3.2. CARACTERÍSTIQUES ANATOMO-PATOLÒGIQUES DE LES LESIONS CIN-2 AL DIAGNÒSTIC

Es va analitzar les dades de la nostra mostra al moment del diagnòstic sobre diferents variables anatomo-patològiques: citologia prèvia, detecció i genotipat del VPH, expressió de la p16, i expressió del Ki-67.

5.3.2.1. CITOLOGIA PRÈVIA

Les lesions CIN-2 de les pacients incloses a l'estudi, provenien d'una lesió d'alt grau (H-SIL) en un 46,9% dels casos, però fins a un 21,9%, provenien d'una citologia de baix grau (L-SIL), (Taula 22). Aquesta observació va plantejar la necessitat d'esbrinar si la citologia cervical que havia motivat el posterior diagnòstic histològic de CIN2, podria fer preveure l'evolució posterior de la lesió.

		Total
		n(%)
Citologia inicial	ASC-US HPV+	13(13,5)
	L-SIL	21(21,9)
	ASC-H n(%)	17(17,7)
	H-SIL n(%)	45(46,9)
Total		96(100)

Taula 22. Tipus de citologia del cribratge estratificada segons l'evolució de la seva lesió subjacent

5.3.2.2. GENOTIPAT DEL VPH

Un dels objectius secundaris d'aquesta tesi era establir la incidència d'infecció per VPH en les lesions CIN-2, i determinar quins eren els genotips de VPH causals de les lesions.

Com podem veure a la Taula 23, el 85,4% de lesions eren positives per a VPH. En particular el 59,4% de les lesions amb VPH contenien infecció per VPH-16 (Taula 24). En les taules 23 i 24 hi ha la relació de les infeccions per VPH-18 i VPH-no16no18

VPH inicial	Negatiu n(%)	14 (14,6)
	Positiu n(%)	82 (85,4)
Total n(%)		96 (100)

Taula 23. Prevalença d'infecció per VPH en lesions CIN-2

	VPH-16
	N(%)
negatiu	57 (59,4)
positiu	39 (40,6)
Total	96(100)

Taula 24. Prevalença d'infecció de VPH-16 en lesions CIN-2

	VPH-18 N(%)
negatiu	90 (93,8)
positiu	6 (6,2)
Total	96(100)

Taula 25. Prevalença d'infecció per VPH-18 en lesions CIN-2.

	VPH-no16-no18 N(%)
negatiu	56 (58,3)
positiu	40 (41,7)
Total	96 (100)

Taula 26. Prevalença d'infecció per VPH-no16no18 en lesions CIN-2

5.3.2.3. EXPRESSIÓ DE LA p16

Un dels objectius principals d'aquest treball de tesi era l'anàlisi de l'expressió de la proteïna p16 en el moment del diagnòstic de les lesions CIN-2, per tal de poder relacionar-les amb l'evolució a l'any de seguiment.

El 17,7% de les pacients tenien una biòpsia amb tinció negativa per a p16, i la resta, el 82,3% tenien una biòpsia positiva per a p16.

Les pacients de la mostra, diferenciades segons l'expressió de la p16, es van estratificar també segons les variables epidemiològiques estudiades per a conèixer si hi havia diferències significatives entre elles, tal i com es mostra de manera resumida a la Taula 27 Tal i com es pot observar les variables epidemiològiques eren comparables entre tots dos grups ($p > 0.05$).

		total	p16 -	p16 +	P
Total		96	17	79	
Edat	Mediana (rang)	30 (18-56)	33 (24-56)	30 (18-47)	0,145
Tabac	Si	50 (52,1%)	10(58,8%)	40(50,6%)	0,366
	No	46 (47,9%)	7(41,2%)	39(49,4%)	
Contra-cepció	Preservatiu	41 (42,7%)	6 (35,3%)	35 (44,3%)	0,225
	Hormonal	40 (41,7%)	6 (35,3%)	34 (43%)	
	DIU o res	15 (15,6%)	5 (29,4%)	10 (12,7%)	
1ª relació sexual		17 (13-29)	17 (13-22)	17 (14-29)	0,469
Nombre parelles sexuals		9 (1-40)	8 (2-20)	9 (1-40)	0,992
Paritat	Nulíparas	71	13 (76,5%)	58 (73,4%)	0,531
	Pares	25	4 (23,5%)	21 (26,6%)	

Taula 27. Factors socio-demogràfics segons l'expressió de p16.

5.3.2.4. EXPRESSIÓ DEL Ki-67

Un dels objectius principals d'aquest treball de tesi era l'anàlisi de l'expressió de la proteïna Ki-67 en el moment del diagnòstic de les lesions CIN-2, per tal de poder relacionar-les amb l'evolució a l'any de seguiment.

El 10,4% de les lesions CIN 2 estudiades tenia una expressió de la Ki-67 negativa, i la resta el 89,6% tenien una expressió positiva. Les pacients de la mostra, diferenciades segons l'expressió de la Ki-67, es van estratificar també segons les variables epidemiològiques estudiades per a conèixer si hi havia diferències significatives entre elles, tal i com es mostra de manera resumida a la Taula 28.

Tal i com es pot observar les variables epidemiològiques eren comparables entre tots dos grups ($p > 0.05$), a destacar únicament que el mètode anticonceptiu es van trobar diferències significatives entre els grups ($P=0,006$).

		total	Ki-67 +	Ki-67 -	P
Total		96	86	10	
Edat	Mediana (rang)	30 (18-56)	30	32	0.139
Tabac	Si	50 (52,1%)	43(50%)	7(70%)	0,321
	No	46 (47,9%)	43(50%)	3(30%)	
Contracepció	Preservatiu	41 (42,7%)	38 (44,2%)	3 (30%)	0,006
	Hormonal	40 (41,7%)	38 (44,2%)	2 (20%)	
	DIU o res	15 (15,6%)	10 (11,6%)	5 (50%)	
1ª relació sexual (rang)		17 (13-29)	17 (13-22)	17 (14-29)	0,581
Nombre parelles sexuals (rang)		8 (1-40)	8 (2-20)	10 (1-40)	0,541
Paritat	Nulíparas	71	65 (75,6%)	6 (60%)	0,281
	Pares	25	21 (24,4%)	4 (40%)	

Taula 28. Factors socio-demogràfics segons l'expressió de Ki-67.

5.4. EVOLUCIÓ DE LES LESIONS CIN-2

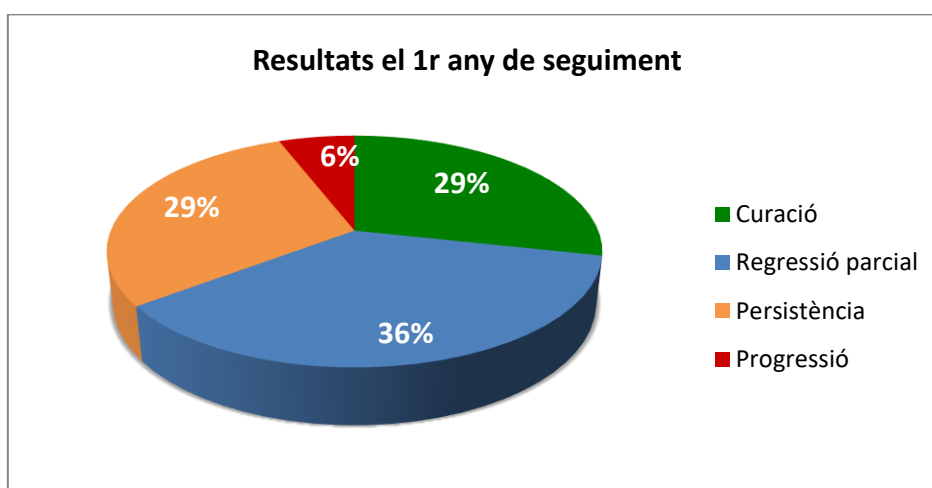
Un cop les pacients eren incloses a l'estudi, se les citava cada 4 mesos fins a un total de 2 anys que duraria l'estudi. A cada visita es realitzava citologia i colposcòpia, i només en cas de sospitar un empitjorament en el patró colposcòpic es feia una biòpsia dirigida. En arribar a l'any de seguiment es va realitzar una biòpsia de control. Amb aquesta biòpsia es va poder comprovar els possibles canvis de les lesions al llarg del primer any de seguiment, i es va realitzar l'estudi estadístic d'aquest treball de tesi.

A la taula 29 i al gràfic R es troben recollits els resultats de l'evolució de les lesions CIN2 al primer any de seguiment. Destacar que 62 de les 94 pacients (65.9%) presentaven lesions que havien curat (n:27), o be havien regressat de manera parcial

(n:35). No es va observar cap cas de progressió a carcinoma invasiu durant el primer any de seguiment.

		n	%
Evolució	Curació	27	28,1
	Regressió parcial	35	36,5
	Persistència	26	27,1
	Progressió	8	8,3
	Total	96	100,0

Taula 29. Evolució de les lesions CIN-2 a l'any de seguiment.



Gràfic 3. Evolució de les lesions CIN-2 a l'any de seguiment

5.4.1. VARIABLES EPIDEMIOMÒLIGUES I EVOLUCIÓ DE CIN-2

Es va correlacionar l'evolució de les lesions CIN-2 al primer any de seguiment, amb les variables epidemiològiques de les pacients en el moment del diagnòstic.

A la Taula 30 hi ha resumides les relacions entre els factors demogràfics de les pacients objecte de l'estudi, estratificant-los segons l'estat evolutiu de les seves lesions

de CIN 2 al finalitzar el primer any de seguiment en : CIN<2 (disminució a CIN-1 o curació), CIN>=2 (persistència de CIN-2 o progressió a CIN-3).

		N (%)	CIN <2	CIN >=2
Total		96	86	10
Edat	Mediana (rang)	30 (18-56)	30	30
	<=25	24 (25)	16 (67)	8 (33)
	>25	72 (75)	46 (64)	26 (36)
Tabac	Si	50 (52,1)	32(64)	18(36)
	No	46 (47,9)	30(65)	16(35)
Contracepció	Preservatiu	41 (42,7)	30 (73)	11(27)
	Hormonal	40 (41,7)	23 (58)	17 (42)
	DIU o res	15 (15,6)	9 (60)	6 (40)
1ª relació sexual	Mediana (rang)	17 (13-29)	17 (13-22)	17 (14-29)
Nombre de parelles sexuals	Mediana (rang)	8 (1-40)	8 (2-20)	8 (1-40)
Paritat	Nulípara	71 (74)	48 (68)	23 (32)
	Pares	25 (26)	14 (56)	11 (44)

Taula 30. Evolució de les lesions CIN-2 segons variables epidemiològiques

A la Taula 31 podem veure els RR per a l'evolució a CIN-2+ segons les variables epidemiològiques.

Donat que la majoria de casos de CCU (78%) apareixen entre els 30-35 anys(119), es va calcular quin seria el risc relatiu per a la variable de l'evolució del CIN-2 en funció si es diagnosticava abans o després dels 35 anys

		p	RR (IC 95%)
Edat	Mediana (rang)	0,87	
	<=25	0,51	
	>25		
	>=35 anys		1,23 (0,47; 3,25)
Tabac	Si	0,54	1,06 (0,46; 2,44)
	No		
Contracepció	Preservatiu	0,31	1,69 (0,73; 3,96)
	Hormonal		
	DIU o res		
1ª relació sexual		0,56	
Nombre parelles sexuals		0,69	
Paritat	Nul·líparas	0,21	1,64 (0,65; 4,17)
	Pares		

Taula 31. Relacions estadístiques de les variables epidemiològiques respecte l'evolució del CIN-2, per a persistència i evolució a CIN-3.

5.4.2. CORRELACIÓ DE LES TROBALLES COLPOSCÒPIQUES AMB L'EVOLUCIÓ DEL CIN-2

La importància de la colposcòpia ve donada pel fet que permet identificar la presència de lesions cervicals que en molts casos estan relacionades directament amb la presència o no de lesions histopatològiques subjacents. Vam intentar relacionar aquests patrons colposcòpics al diagnòstic dels CIN2 estudiats amb l'evolució posterior dels mateixos.

A la Taula 32 es detallen les relacions entre el tipus de zona de transició, el patró colposcòpic, el diagnòstic colposcòpic de Canvis Majors, i el tamany de la lesió, amb l'evolució de la lesió CIN-2. També es van estudiar les probabilitats en 2 grups: un que reflecteix el risc de quedar-se en un CIN-2+, i finalment el risc d'evolucionar a un CIN-3.

Les lesions que associaven un increment del risc per a la progressió a CIN-3 van ser els canvis majors tal com podem observar a la taula Colp3.

	No regressió		Progressió	
	p	OR IC 95%	p	OR IC 95%
Tipus ZT	0,413		0,534	
Acetoreactiu Intens	0,040	2,37 (1,03-5,44)	0,850	
Puntejat irregular	0,018	2,82 (0,95-8,39)	0,605	
Mosaic irregular	0,576		0,003	8,88 (1,91-41,20)
Canvis Majors	0,024	2,56(1,12-5,82)	0,023	5,44 (1,09-27,02)
Quadrants50	0,002	3,92 (1,63-9,46)	0,181	

Taula 32. Relació entre factors colposcòpics i l'evolució de la lesió CIN-2

5.4.3. VARIABLES ANATOMO-PATOLÒGIQUES I EVOLUCIÓ DEL CIN-2.

L'objectiu principal de l'estudi va ser determinar el valor predictiu de l'expressió de p16 i ki-67 en l'evolució de les lesions CIN 2, amb la finalitat de poder determinar el seu possible paper pronòstic i terapèutic en aquests casos.

Com a objectius secundaris es va analitzar també l'efecte del tipus de citologia prèvia i el genotipat del VPH causant de la lesió en l'evolució de les lesions CIN-2.

5.4.3.1. ANÀLISIS DEL TIPUS DE CITOLOGIA DIAGNÒSTICA O PRÈVIA

A la taula 33 podem veure com es relacionaven els diferents tipus de citologia diagnòstica del cribratge amb l'evolució de la seva lesió CIN subjacent. Destacava que més de la meitat de les lesions provinents d'un H-SIL, el 55,6%, es mantenien en un

CIN-2 o progressaven a un CIN-3 després del primer any de seguiment clínic (p=0,001).

		CIN <2	CIN =>2	total	p
		n(%)	n(%)		
Citologia inicial	ASC-US HPV+	12 (92,3)	1(7,7)	13(13,5)	0,001
	L-SIL	15(71,4)	6(28,6)	21(21,9)	
	ASC-H	15(88,2)	2(11,8)	17(17,7)	
	H-SIL	20(44,4)	25(55,6)	45(46,9)	
Total		62(64,6)	34(35,3)	96(100)	

Taula 33. Relació entre el tipus de citologia de cribratge i l'evolució del CIN-2.

De la mateixa manera en agrupar els resultats citològics segons citologia de no alt risc clar (LSIS, ASC-US i ASC-H) i Citologia de Alt Risc (H-SIL), com es veu a la taula 34 es mantenia aquesta tendència a la persistència o progressió de les lesions CIN2 amb citologies de Risc (p<0,0001), amb un RR de 3,15 (IC 95% 1,65-6,02).

		<CIN-2	>=CIN-2	Total	p
		n(%)	n(%)	n(%)	
Citologia	No Alt Risc	42(82,4)	9(17,6)	51(100)	<0,001
	Alt risc	20(44,4)	25(55,6)	45(100)	
Total		62(64,6)	34(35,4)	96(100)	

Taula 34. Evolució de les lesions CIN-2 segons citologia d'alt risc o no alt risc.

5.4.3.2. ANÀLISI DEL GENOTIP DEL VPH

Un dels objectius secundaris d'aquest treball era esbrinar si existia una relació entre la presència d'una infecció per VPH d'alt risc, i els seus diferents genotips, i l'evolució de les lesions CIN-2.

En primer lloc vam analitzar si el fet o no de detectar VPH d'alt risc podia fer preveure l'evolució de les lesions CIN-2 (Taula 35). Tal i com es pot observar a 14 de les 94 lesions no es va detectar la presència de VPH d'alt risc. Totes aquestes lesions VPH negatives, després d'un any havien regressat a CIN 1 o bé s'havien curat ($p= 0,001$). Tot i així també el 58,5% de les dones amb lesions provocades per algun tipus de VPH d'alt risc (HR-HPV) van regressar i fins i tot curar.

		<CIN-2 n(%)	=>CIN-2 n(%)	Total n(%)
VPH inicial	Negatiu	14(100)	0	14(14,6)
	Positiu	48(58,5)	34(41,5)	82(86,4)
Total		62(64,6)	34(35,4)	96(100)

Taula 35. Relació entre infecció per HR-HPV i evolució del CIN-2.

Per tal d'establir quines d'aquestes lesions per HR-HPV serien tributàries de curar o no, es va relacionar l'evolució amb el genotip viral causal.

5.4.3.2.1. INFECCIÓ PER VPH-16

La taula 36 recull l'evolució de les lesions CIN-2 en funció de si a les lesions s'identificava o no VPH-16. Del total de casos inclosos, 39 pacients tenien lesions CIN2 per VPH-16. Tal i com es pot observar, el 53% d'aquestes lesions van persistir i/o progressar en comparació al el 22.8% de les lesions noVPH16 ($p=0.002$). Es va calcular que un RR de progressió per a aquestes lesions CIN2-VPH-16 de 2,36 (IC 95%, 1,350;4,129).

		<CIN-2 n(%)	=>CIN-2 n(%)	Total n(%)	p
VPH-16	no	44(77,2)	13(22,8)	57(59,4)	0,002
	si	18(46,2)	21(53,8)	39(40,6)	
Total		62(64,6)	34(35,4)	96(100)	

Taula 36. Relació entre infecció per VPH-16 i evolució del CIN-2.

5.4.3.2.2. INFECCIÓ PER VPH-18

La taula 37 recull l'evolució de les lesions CIN-2 en funció de si a les lesions s'identificava o no VPH-18. Del total de casos inclosos, només 6 pacients tenien lesions CIN2 per VPH-18. Podem veure com el 66,7% d'aquestes lesions van persistir i/o progressar en comparació al el 33,3% de les lesions noVPH18 (p=0.115). Es va calcular que un RR de progressió per a aquestes lesions CIN2-VPH-18 de 2 (IC 95%, 1,058; 3,781).

		<CIN-2 n(%)	=>CIN-2 n(%)	Total n(%)	p
VPH-18	no	60(66,7)	30(33,3)	90(93,8)	0,115
	si	2(33,3)	4(66,7)	6(6,2)	
Total		62(64,6)	34(35,4)	96(100)	

Taula 37. Relació entre infecció per VPH-18 i evolució del CIN-2.

5.4.3.2.3. INFECCIÓ PER VPH-no16-no18

La taula 38 recull l'evolució de les lesions CIN-2 en funció de si a les lesions s'identificava el VPH-no16-no18 o no s'identificava, quedant la possibilitat que si

s'identifiqués algun altre virus (VPH-16 o VPH-18). Del total de casos inclosos, 40 pacients tenien lesions CIN2 amb presència de VPH-no16-no18. Podem veure com el 30% d'aquestes lesions van persistir i/o progressar en comparació al el 39,3% de les lesions amb presència d'altres virus que no eren VPH-no16-no18 ($p=0.236$). Es va calcular que hi havia un RR de progressió per a aquestes lesions CIN2-VPH-no16-no18 de 0,764(IC 95%, 0,430; 1,356).

		<CIN-2 n(%)	=>CIN-2 n(%)	Total n(%)	p
Vph-no16no18	Negatiu	34(60,7)	22(39,3)	56(58,3)	0,236
	Positiu	28(70)	12(30)	40(46,7)	
Total		62(64,6)	34(35,4)	96(100)	

Taula 38. Relació entre infecció per VPH-no16-no18 i evolució del CIN-2.

5.4.3.3. ANÀLISI DEL VALOR PREDICTIU DE L'EXPRESSIÓ DE p16

Tal i com hem anotat anteriorment, del total de les 96 pacients incloses finalment a l'estudi, 17 (17.7%) tenien una lesió de CIN2 amb tinció negativa per a p16 i 79 tenien lesions CIN2 p16 positives (82,3%).

En primer lloc es va procedir a establir la relació existent entre l'expressió de la p16 en les lesions CIN-2 en el moment del seu diagnòstic, i l'estat evolutiu d'aquestes lesions després de l'any de seguiment (taula 39). Com es pot observar les 17 pacients amb una expressió de p16 negativa en el moment del seu diagnòstic, al final del primer any de seguiment van regressar, 7 de manera parcial a CIN-1 i 10 havien curat. En canvi només 45 de les 79 lesions CIN2-p16 positives (56.9%) van regressar durant el mateix període de seguiment ($p=0.002$).

		Evolució CIN2				Total n(%)	P valor
		Curació n(%)	Regressió n(%)	Persistència n(%)	Progressió n(%)		
p16	Negatiu	10 (58,8)	7 (41,2)	0	0	17	0.002
	Positiu	17 (21,5)	28(35,4)	26 (32,9)	8 (10,1)	79	
Total		27 (28,1)	35 (36,5)	26 (27,1)	8 (8,3)	96	

Taula 39. Evolució de la lesió CIN-2 segons l'expressió de la p16

La rellevància clínica derivada de conèixer l'evolució de les lesions CIN 2, radica en poder identificar les lesions que regressaran o curaran (CIN <2), de la resta (>=CIN-2). La taula 40 recull la distribució de les pacients en funció d'aquests dos subgrups i la l'expressió o no de la p16. Podem observar que de manera significativa ($p < 0,0001$) les lesions CIN2- p16 negativa varen tendir a disminuir la seva gradació CIN. En canvi les lesions CIN2-p16 positiva van evolucionar de manera molt diferent entre elles .

		CIN<2 n(%)	CIN=>2 n(%)	Total n(%)	p
p16	Negatiu	17 (100)	0	17 (100)	<0.0001
	Positiu	45 (57)	34 (34)	79 (100)	
Total		62 (63,6)	34(35,4)	96 (100)	

Taula 40. Distribució de l'expressió de p16 segons grups d'evolució de CIN-2

Per tal d'intentar precisar el possible paper predictor en l'evolució de les lesions CIN 2 de l'expressió de p16, aquesta variable es va estratificar en funció de l'afectació del gruix de l'epiteli cervical. D'aquesta manera es van establir 3 categories segons els 1/3 de l'epiteli ens els que s'identifiqués l'expressió de p16. (taula 41). El nostre objectiu era intentar diferenciar les lesions positives per a p16 que regressaven de les que persistien o evolucionaven, segons el nombre de terços epitelials positius per a p16. No es va identificar cap lesió p16 positiva afectant només 1 terç de l'epiteli. En

les 30 pacients amb 2 terços de l'epiteli positius per a p16 i de les 49 positives en tot el gruix epitelial no es va adquirir cap distribució que ens ajudés a preveure la seva evolució. Aquesta diferent distribució de la positivitat de p16 per terços va resultar ser estadísticament significativa ($p=0,012$), però no ens va permetre diferenciar aquelles pacients que amb p16 positiva que regressen total o parcialment de les que es mantenen o evolucionen, ja que la distribució de l'evolució en els 2/3 i els 3/3 no quedava explicat per la positivitat de la p16.

		Evolució CIN2				Total n(%)	p
		Curació n(%)	Regressió n(%)	Persitència n(%)	Progressió n(%)		
p16 Negatiu		10 (58,8)	7(41,2)	0	0	17(100)	0,012
	1/1	0	0	0	0	0	
	2/3	9 (30)	10 (33,3)	8(26,7)	3 (10)	30 (100)	
	3/3	8 (16,3)	18 (36,7)	18 (36,7)	5 (10,2)	49 (100)	
Total		27 (28,1)	35 (36,5)	26 (27,1)	8 (8,3)	96 (100)	

Taula 41. Distribució en terços de l'expressió de la p16 i la seva evolució

5.4.3.4. ANÀLISI DEL VALOR PREDICTIU DE L'EXPRESSIÓ DEL Ki-67

Un dels objectius principals d'aquest treball de tesi era l'anàlisi de l'expressió de la proteïna Ki-67 en el moment del diagnòstic de les lesions CIN-2, per tal de poder relacionar-les amb l'evolució a l'any de seguiment. Així es va analitzar el possible paper del Ki-67 com a factor de risc de progressió. Les dades sobre l'expressió del Ki-

67 en funció de la seva expressió inicial i l'evolució de les lesions a l'any de seguiment es recullen a la taula 42.

Del total 96 lesions analitzades, 10 pacients no presentaven expressió de la Ki-67 (10,4% del total), i 86 pacients tenien l'expressió positiva (89,6%). Destaca que totes les lesions CIN-2 amb una expressió de Ki-67 negativa van regressar. Totes les lesions CIN-2 que van persistir o progressar a l'any de seguiment, un total de 34, eren Ki-67 positives. Malgrat això, és important destacar que de les lesions que van regressar (n:79), 52 presentaven positivitat per a Ki-67.

	Evolució CIN2				Total n (%)	p
	Curació n (%)	Regressió n (%)	Persistència n (%)	Progressió n (%)		
Ki-67 Negatiu	5 (50)	5 (50)	0	0	10 (100)	0.093
Positiu	22 (25,6)	30 (34,9)	26 (30,2)	8 (9,3)	86 (100)	
Total	27 (28,2)	35 (36,5)	26 (27,1)	8 (8,3)	96 (100)	

Taula 42. Expressió del Ki-67 i relació amb l'evolució a l'any de la lesió

Igual com vam fer en el cas de la p16 a l'apartat anterior, vam intentar correlacionar l'expressió inicial de Ki-67 amb l'evolució de les lesions de CIN2 en funció de la seva capacitat de regressió (grup CIN <2), comparat amb la seva capacitat de persistència i/o progressió (grup >=CIN-2). La taula 43 recull aquestes dades. Les troballes corroboren que les lesions amb una expressió negativa de Ki-67 tendeixen a disminuir la seva gradació (p=0,010). En canvi la positivitat per a Ki-67 no es va demostrar com un factor predictiu d'evolució de les lesions CIN2, donat que mentre el 64,6% d'aquestes lesions van regressar, el 39,5% van persistir com a tal o van progressar

		CIN<2	CIN=>2	Tolta	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
ki67_bx	Negatiu	10(100)	0	10 (100)	0.010
	Positiu	52 (60,5)	34 (39,5)	86 (100)	
Total		62 (64,6)	34 (35,4)	96 (100)	

Taula 43. Distribució de la Ki-67 amb simplificació de l'evolució de la lesió CIN-2

En un intent de precisar el possible paper predictor del Ki-67 en l'evolució de les CIN-2, vam realitzar un re-anàlisi relacionant el grau de positivitat de Ki67 segons els terços (1/3) d'epiteli tenyits (taula 44 i 45). Tal i com es pot observar totes les lesions que només presentaven tinció positiva per a Ki67 en el 1/3 més intern de l'epiteli (n:10) be van curar (6; 60%), o bé van regressar a un CIN1(4; 40%). De les 43 pacients amb 2 terços de l'epiteli positius per a Ki-67: 26 (60.4%) van curar o regressar, i 16 (29.6%) van persistir o fins i tot van evolucionar. En canvi més de la meitat de les lesions a les que el Ki-67 era positiva a tot el gruix de l'epiteli van persistir i/o evolucionar a lesions de CIN3 (p= 0,005). Segons aquestes dades les lesions CIN2 que no expressaven Ki-67 o bé que l'expressaven en una baixa intensitat (anomenat Ki-67 de baix risc) tenien més probabilitat de curar-se o bé de regressar, (p <0,0001). Al contrari, les pacients amb una expressió moderada o alta del Ki-67 (anomenat Ki d'alt risc) no van mostrar una clara tendència cap un o altre tipus d'evolució (Taula 11R).

		Curació	Regressió	Persitència	Progressió	Total	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Ki-67 Negatiu		5(50)	5(50)	0	0	10(100)	0,005
	1/3	6(60)	4(40)	0	0	10(100)	
	2/3	13(30,2)	13(30,2)	11(25,6)	6(14)	43(100)	
	3/3	3(9,1)	13(39,4)	15(45,5)	2(6,1)	33(100)	
Total		27(28,1)	35(36,5)	26(27,1)	8(8,3)	96(100)	

Taula 44. Distribució en terços de l'expressió de la Ki-67 i la seva evolució

		CIN<2	CIN>=>2	Total	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
Ki-67	Baix risc	20(100)	0	10(100)	<0.0001
	Alt Risc	42(55,3)	34(44,7)	76(100)	
Total		62(64,6)	34(35,4)	96(100)	

Taula 45. Distribució de la Ki-67 segons alt o baix risc i amb simplificació de l'evolució de la lesió CIN-2

6. DISCUSIÓ

L'objectiu del nostre treball era explicar l'evolució de les lesions CIN2, caracteritzant individualment cada tipus de lesió segons les seves característiques anatomo-patològiques, a més de característiques epidemiològiques de les pacients. Els nostres resultats ens ajuden a conèixer millor el comportament de les lesions CIN-2. Aquesta informació ha de permetre avançant en aconseguir el millor maneig possible per a les lesions CIN-2, i així tractar-les quan sigui necessari per tal d'evitar el sobretractament i els possibles efectes adversos que se'n puguin derivar.

Molts estudis ja han intentat explicar quina és la història natural de les lesions CIN-2(114,115,124,116–123). Aquest és el primer estudi observacional prospectiu que combina l'estudi de l'evolució de les lesions CIN-2 relacionat amb factors anatomo-patològics, com la p16 i el Ki-67, hipotetitzant que la seva expressió ens podria marcar l'evolució posterior de les lesions CIN-2.

6.1. POBLACIÓ D'ESTUDI

Un total de 158 pacients van ser referides a la Unitat de Tracte Genital Inferior (UTGI) del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital del Mar amb el diagnòstic de CIN-2. 105 pacients complien els criteris d'inclusió, i finalment 96 van finalitzar el seguiment, i per tant van ser objecte de l'estudi.

Només hi ha 2 estudis amb un tamany mostral superior al nostre. El primer és el del grup de McCallum, que van elaborar un estudi retrospectiu sobre maneig conservador en 157 pacients menors de 25 anys(120). El segon és el realitzat per Castle i col. que a partir de dades de l'estudi ALTS van estudiar 357 pacients per a obtenir un millor maneig de lesions ASC-US i L-SIL.

Del total de dones referides a la UTGI, el 66,5% de les pacients van acceptar formar part del nostre estudi. Aquest fet posa de manifest la bona acceptació que va tenir el maneig conservador proposat entre les pacients. 53 pacients no van complir amb els criteris d'inclusió donat que 32 desitjaven un tractament immediat de la malaltia cervical i 7 no podien seguir controls per canvi de domicili o motius laborals. Només 14 pacients van ser excloses per motius mèdics com la colposcòpia no satisfactòria o immunosupressió, de manera que posa de manifest el pòc efecte de la comorbiditat de les pacients.

El protocol de seguiment estava integrat dins la pràctica clínica diària, basat en controls citològics i de colposcòpia, amb biòpsia cervical si es sospitava progressió. Es varen realitzar controls cada 4 mesos ja que al tractar-se d'una lesió amb major risc que el CIN-1, que es controla cada 6 mesos, es va valorar més adequat per a minimitzar el risc de progressió. El maneig conservador estava dividit en dues fases: una fase inicial de control de 12 mesos, moment en el qual es realitzava un control de les variables clínico-patològiques, i un segon temps fins a completar els 24 mesos per a valorar el paper de les cèl·lules NK durant els dos anys de seguiment. L'estudi general, que incloïa el càlcul del valor predictiu de les cèl·lules Natural Killer (NK) sobre l'evolució del CIN-2, tenia una durada de 24 mesos de control, però el nostre treball es va limitar a un estudi de 12 mesos per a obtenir un primer balanç sobre l'evolució de les lesions CIN-2 d'acord amb les variables a estudi(116).

6.2. L'EVOLUCIÓ DEL CIN-2

El maneig del CIN-2 encara és controvertit i un dilema pels ginecòlegs. Varis estudis s'han publicat en les últimes dècades sobre la regressió espontània del CIN-2 en dones joves però encara no s'han pogut entendre bé els factors predictors(114,115,124,125,116–123)

Els nostres resultats mostren una regressió espontània de la lesió CIN-2 d'un 64,6% durant els 12 mesos primers de seguiment, ja sigui cap a una lesió de CIN-1 en un 36,5% com a curació en un 28,1%, i una progressió a CIN-3 del 8%. Aquestes dades estan d'acord amb la majoria d'estudis previs (Taula 1D) on la taxa de regressió és similar (117,119,123), però és superada en estudis on la citologia prèvia al diagnòstic del CIN-2 és un L-SIL (118,121) o bé només inclou pacients menors de 25 anys(120). La taxa de progressió és inferior en estudis on la mostra inclou només pacients menors de 21 anys(116). Donat que no s'han trobat casos de progressió a carcinoma invasor fa que el maneig conservador es presenti com un mètode segur a l'hora de tractar les pacients amb CIN-2.

L'últim estudi realitzat s'acaba de publicar aquest mateix any 2018 pel grup de Tainio, i es basa en un metaanàlisi on s'inclouen un total de 36 estudis i 3160 dones de totes les edats. En aquest meta-anàlisi s'arriba a la conclusió que les lesions CIN-2 regressen en un 50%, persisteixen en un 32%, i progressen en un 18%.

Proposant un seguiment a pacients amb CIN-2 s'han evitat que un 28,1% de les pacients fossin conitzades sense necessitat, evitant possibles resultats obstètrics desfavorables com ara el part preterme(127) o d'altres complicacions físiques o psicològiques. Si afegim el 36,5% de pacients que a l'any de seguiment tenien un CIN-1 i encara podien esperar un any més de seguiment, és probable que una nova fracció es pogués beneficiar també de no realitzar una conització en el moment del diagnòstic.

Autor	Any	N	Edat (anys)	Període de seguiment anys	Taxa de regressió %	Taxa de progressió %
Chan JK(114)	2003	38	19-55	2	58	
Moore K(115)	2007	23	13-21	1,5	65	5
Fuchs K(116)	2007	36	11-21	2	50	8
Guedes AC(117)	2010	45	18-61	1	44	23
Castle P (118)	2009	357	18-62	2	40	22
Moscicki AB(119)	2010	95	13-24	2	62	12
McAllum DE(120)	2011	157	< 25	1	62	18
Discacciati M(121)	2011	42	17-47	1	74	24
Ho GY(122)	2011	63	18-40	1	54	5
Wang SM(123)	2013	30	35-45	6	56	16
Bleecker E (124)	2014	21	< 30	2	52	24
Lee MH (125)	2018	99	<25	2	74,7	-
Tainio(180)	2018	819	-	2	50	18
Genoves J	2018	96	>18	1	64,6	8

*Taula 46*Estudis sobre l'evolució del CIN-2 fins el 2018

D'avant cada cop més evidència a favor de una alta taxa de regressió de les lesions CIN2, algunes guies de pràctica clínica com la de la ASCCP americana(181) s'han actualitzat i contemplen el maneig conservador de les lesions de CIN-2 en determinats supòsits: pacients de màxim 25-30 anys, amb lesió petita i visible (un quadrants) i en gestants.

S'ha discutit molt sobre l'alta taxa de regressió de les lesions CIN2. Per una banda es va considerar que el microambient inflamatori secundari a realització de biòpsies de les mateixes, podria afavorir la seva resolució. Estudis com el de Del Pino i col sobre la utilitat de la p16 per a preveure el comportament de les lesions tipus CIN-1 desmenteixen la teoria, i mostren que no hi ha relació entre presa de biòpsies i l'evolució de la lesió(160).

Finalment, fins i tot s'ha hipotetitzat sobre el fet que aquestes lesions de CIN2 no fossin tals i que realment eren lesions de menys o major grau. De fet, la classificació morfològica del CIN-2 sempre s'ha considerat un repte entre els patòlegs. Algunes lesions CIN-1/2 borderline es poden haver supra-estadiat, és a dir haver sigut classificades com a CIN-2, augmentant falsament la taxa de regressió d'aquest tipus de lesions. D'igual manera es podria produir el mateix error en sentit contrari, infra-classificant lesions CIN-2/3 com a CIN-2 que podrien fer augmentar la taxa de progressió del CIN-2. El problema podria resoldre's afegint un segon patòleg a l'anàlisi de les biòpsies diagnòstiques de CIN2, tot i que els diferents estudis reporten una taxa de concordança entre patòlegs del 38%(142) . Es per aquesta raó que la utilització de Marcadors biològics validats poden ajudar a precisar el diagnòstic dels CIN2 i a establir el pronòstic en cada un dels casos.

6.2.1. FACTORS SOCIO-EPIDEMIOLÒGICS

El nostre estudi va valorar el possible paper de diferents factors individuals i epidemiològics tals com l'edat, l'hàbit tabàquic, el mètode anticonceptiu, l'edat d'inici de relacions sexuals, el nombre de parelles sexuals i la paritat, en la història natural del CIN2. No vàrem poder demostrar cap relació entre l'evolució de les lesions CIN-2 i aquestes variables.

L'edat ha estat sempre considerada un factor determinant a l'hora d'escollir el maneig de les lesions cervicals. Les guies actualitzades recomanen el maneig conservador en pacients joves i adolescents fins als 25 anys(6). El nostre estudi inclou pacients a partir dels 18 anys, sense límit superior. Els estudis anteriors on s'estudia l'evolució del CIN-2 amb pacients de màxim 25 anys(115,116,119,120) tenen una regressió d'entre el 50-

65%. Estudis amb mostres que inclouen pacients de major edat entre 18 i 62 anys(114,117,118,123,182) tenen una regressió d'entre el 44% i el 74%. Cap d'aquests estudis ha trobat relació entre l'edat i l'evolució del CIN-2. En el nostre estudi vàrem decidir incloure pacients a partir de la majoria d'edat per tal de buscar una relació entre les variables. L'edat mitja del nostre estudi era de 30,5 anys, entre 18 i 56 anys, i no es va trobar diferències significatives entre el grup de <25 anys i el de =>25 anys a l'hora de l'evolució de les lesions. Els grans estudis epidemiològics apuntaven que les pacients joves tenien taxes de regressió de les lesions CIN majors a les pacients de més edat, però en el nostre estudi no ha estat demostrat(31).

Un dels principals carcinògens en el nostre medi és el tabac, considerat causa directe de molts tumors. En el càncer de cèrvix es considera que pot arribar a augmentar el risc de CCU entre 2 i 4 vegades més que en les dones no fumadores (54,69), i que en deixar l'hàbit es va recuperant la capacitat d'eliminar la lesió tipus CIN. El 52% de les nostres pacients eren fumadores, i d'aquestes el 36% van mantenir-se en CIN-2 o bé progressar a CIN-3 ($p=1,00$). No vam poder demostrar una relació entre el tabac i l'evolució de les lesions CIN-2. Tampoc es va poder avaluar l'efecte de l'abandonament de l'hàbit tabàquic durant el període de control. És possible que la causa que no es trobessin diferències significatives entre el grup de fumadores i no fumadores fos el tamany mostral. Possiblement en un estudi poblacional epidemiològic similar s'hagués pogut demostrar la relació ja descrita en la literatura (estudi epidemiològic de carcinògens mundial) (BIBLIO BOSCH)..

Respecte l'ús d'anticonceptius, els grans estudis epidemiològics han relacionat l'ús d'anticoncepció hormonal durant més de 10 anys amb un augment de la incidència de CIN-3 i CCU (BIBLIO 68,186 M) amb un risc que tendeix a disminuir en abandonar l'ús però no a desaparèixer (BIBLIO 56). En el nostre treball el 41,7% de pacients incloses feia servir ACH a l'inici de l'estudi. D'aquestes pacients usuàries d'ACH el 42% va mantenir-se en CIN-2 o bé progressar en CIN-3 després d'un any de seguiment. Tot i així no es va poder demostrar una relació causal entre la presa d'ACH i la persistència i/o progressió del CIN2 ($p=0,135$), a diferència de l'estudi realitzat per Moscicki i col a l'any 2007, que amb 95 pacients d'entre 13 i 25 anys si va demostrar una relació directa causal entre la presa d'anticonceptius i la no regressió del CIN-2(119). La diferència amb el nostre treball no radica en el tamany mostral, sinó en l'edat de les pacients incloses.

La paritat és una altra variable epidemiològica que ha estat clàssicament relacionada arrel dels grans estudis epidemiològics. En el nostre cas el 44% de les pacients amb

fills van persistir amb una lesió CIN-2+, en contra del 32% de les pacients nul·ligestes ($p=0,336$), de manera que no hem pogut demostrar cap relació. Ha estat difícilment explicat el mecanisme pel qual augmenta en les lesions CIN, i un dels més plausibles és l'alta exposició de la ZT a infeccions vaginals com el VPH.

La conducta sexual de les pacients també va ser estudiada mitjançant l'edat d'inici de les relacions sexuals, i el nombre de contactes sexuals total. L'edat mitja d'inici de relacions sexuals era als 17,4 anys (entre 13 i 29), i el nombre mig de parelles de 8 (entre 1 i 40). Els valors mitjos no van variar estratificant segons l'evolució del CIN-2, de manera que no hi havia diferències significatives ($p=0,581$ per a l'edat d'inici de relacions, i $p=0,693$ per al nombre mig de parelles). Tot i no ser un estudi dissenyat per a variables epidemiològiques, aquestes dades coincideixen amb estudis com el de Disciaciatti i col., que va estudiar 42 pacients amb lesió de CIN-2 provinent de citologies de baix grau durant un any i que tampoc va trobar associació(121).

6.3. FACTORS CLÍNICS. COPOSCÒPIA.

Totes les pacients que es van incloure a l'estudi havien estat diagnosticades de CIN-2 a partir d'una biòpsia dirigida durant la realització d'una colposcòpia. Les imatges colposcòpiques estan directament relacionades amb el tipus i grau de lesió intraepitelial subjacent. Per això és de vital importància una acurada descripció del coll uterí, i una correcta selecció del punt de biòpsia per a augmentar la sensibilitat i especificitat de l'exploració per aquesta raó totes les colposcòpies van estar realitzades per un dels dos especialistes de la unitat PTGI.

Donat que els patrons colposcòpics es correlacionen amb les lesions subjacents, vam voler correlacionar les troballes colposcòpiques en el moment del diagnòstic amb l'estat de les lesions al final de 12 mesos de seguiment. L'objectiu era identificar patrons colposcòpics que preveïessin l'evolució a l'any de seguiment de les lesions de CIN2. Les nostres troballes van confirmar aquest supòsit, donat que les lesions majors de 2 quadrants i un patró colposcòpic irregular van presentar major risc de progressió que altres tipus de lesions ($P= 0,023$ i $p= 0,003$ respectivament). En concordància amb lo anterior, es va observar que les lesions acetoblanques intenses i el puntejat també tenien més risc de CIN-2+ ($p= 0,024$ $p=0,040$ i $p=0,018$ respectivament).

El nostre estudi és el primer que compara l'evolució de les lesions CIN-2 després d'un temps determinat de control, i la seva associació amb les troballes colposcòpiques en el moment del diagnòstic. Sabem que pacients infectades per HPV tenen un major risc de progressió a CCU(183,184). Alguns autors com Lowers i col. han trobat una relació entre la infecció per HPV i el patró colposcòpic inicial de manera que podríem establir una relació entre aquests patrons colposcòpics patològics i la infecció per VPH(185). Aquest grup de Lowers va realitzar un estudi retrospectiu de 355 pacients en un hospital universitari d'Amsterdam, comparant colposcòpies amb HPV positiu amb les colposcòpies de pacients amb HPV negatiu. Els seus resultats mostraven que les lesions més grans del 50% del cèrvix, zona de transformació visible, patró colposcòpic de mosaic o puntejat groller o irregular, eren més característics de les pacients amb infecció present d'HPV ($p=0,044$ $p=0,001$ i $p=0,036$ respectivament). Aquestes dades, es podrien considerar les proves d'imatge d'una infecció per HPV.

En sentit contrari a les nostres conclusions, tot i que en el cas de lesions citològiques de baix grau, es troben les conclusions de l'estudi de Del Pino i col.(186) Aquest estudi tenia com a objectiu establir el valor predictiu de la colposcòpia de l'evolució de lesions amb VPH positiu i citologia normal, ASC-US o bé L-SIL, amb diagnòstic

histològic de CIN-1. Els resultats no van demostrar que el patró colposcòpic inicial o el tamany de la lesió en el moment del diagnòstic podien preveure el risc de progressió de les lesions. El fet que el nostre estudi parteixi de biòpsies de CIN-2 proporcionaria una idea més acurada de l'estat de les lesions a estudi.

Per pal·liar al màxim les diferències interobservador, que depenen de la interpretació subjectiva de les troballes colposcòpiques, es va fer servir un cervicograma en cada colposcòpia per a intentar evitar possibles conflictes en la descripció de les lesions (Annexe 3), i es va decidir no utilitzar cap índex colposcòpic com per exemple el de Reid i Scalzi ja que s'ha demostrat que no milloren la uniformitat en la classificació de les lesions(186). Tot i això, aquestes petites diferències teòriques a l'hora de descriure les lesions podria ajudar a generalitzar els resultats i fer-los més útils per a la pràctica clínica diària.

D'altra banda, també és important minvar al màxim el risc de que una lesió de CIN3 passi desapercebuda quan es fa biòpsia dirigida per colposcòpia, ja que aquesta podria no ser suficientment representativa de tota la lesió. Aquesta eventualitat s'evita amb la presa de dos mostres de diferents punts del cèrvix davant del dubte. S'ha demostrat que la presa d'una única biòpsia disminueix la sensibilitat de la colposcòpia per a identificar correctament les lesions CIN, i que la presa de biòpsies no influeix a l'hora d'ajudar a la regressió i desaparició de la lesió(186).

Les conclusions derivades d'aquest anàlisi, tenen especial rellevància i aplicació clínica. L' exploració colposcòpica podria formar part de manera simultània de l'algoritme de maneig diagnòstic i terapèutic de les lesions CIN2, en la mesura que ajudaria decidir quines pacients es podrien controlar i quines serien tributàries d'un tractament excisional des del començament donat que l'aspecte de les lesions podrien suggerir una persistència o progressió de les seves lesions de CIN2.

6.4. FACTORS ANATOMO-PATOLÒGICS

L'objectiu principal d'aquest treball de tesi va ser establir si l'expressió de determinats biomarcadors, com la p16 i la ki 67 en la biòpsia diagnòstica de CIN2, podrien preveure quina evolució tindrien les lesions CIN-2.

6.4.1. PREVALENÇA DE P16

Aquest és l'estudi prospectiu més ampli que coneguem que avaluï l'expressió de la proteïna p16, com a predictor del comportament de la lesió CIN-2.

La troballa fonamental d'aquest estudi va ser que l'absència d'expressió immunohistoquímica de p16 (p16 negativa) va predir la regressió de les lesions de CIN2. De fet, totes les pacients amb una biòpsia de CIN2 negativa per a p16 van regressar als 12 mesos de control. Al contrari, les pacients amb una biòpsia de CIN 2 on s'identificava immunoexpressió de p16 (p16-positiva), el 87% dels casos, van presentar una tendència superior per a mantenir-se en CIN-2 o bé d'evolucionar a CIN-3, també als 12 mesos de seguiment. Segons aquestes dades es podria oferir amb seguretat un maneig conservador a pacients seleccionades amb lesions CIN2 p16 negativa donat que aquesta negativitat seria el reflex d'un comportament biològic diferent. Caldria senyalar que tot i que també el 43% de les lesions CIN-2 p16-positives van mostrar una tendència a persistir o progressar, el 57% d'elles van regressar en els primers 12 mesos de seguiment. De manera que la positivitat per a p16, no necessàriament va determinar la tendència a progressar de les lesions CIN2 pel que segons les nostres dades, si només es tingués en compte aquesta positivitat per a fer tractament des del moment del diagnòstic estaríem sobretractant més de la meitat de les pacients amb lesions CIN-2. S'ha discutit que les lesions CIN-2 que regressarien no serien lesions CIN-2 reals, sinó lesions CIN-1 mal classificades com a CIN-2. Però el que quedaria clar igualment, és que si l'expressió de p16 fos negativa, la capacitat de progressió seria nul·la.

En un esforç per a identificar les lesions CIN 2-p16 positives que regressen i diferenciar-les de les que es mantenen o progressen, vàrem estratificar les 79 pacients amb CIN2-p16 positives en tres grups segons el nombre de terços de l'epiteli a on s'evidenciés positivitat per a p16. No vam aconseguir demostrar una distribució

de l'expressió de p16 que ajudés a diferenciar entre les lesions CIN2 que regressaven de les que progressaven. Cal dir que no hi havia cap pacient amb tinció per a p16 que ocupés 1 terç de l'epiteli, és a dir, totes tenien una tinció per a p16 que ocupava 2 ó 3 terços.

El fet que les totes les lesions CIN2 p16-negatives hagin regressat a l'any de seguiment, podria ser justificat per alguns autors que consideren que mentre que les lesions amb tinció de p16 intensa o bé difusa en bloc sí es podrien considerar com a pre-càncer, les lesions CIN 2 p16 negativa o no en bloc (cèl·lules aïllades) tindrien la qualitat de lesions de baix grau. Aquesta dada ens confirma la tinció de la p16 com a una eina molt útil per a la correcta correlació interobservador dels patòlegs, ens cas que tinguin dubtes en la gradació de la lesió(187,188). En concret, en l'última revisió de la nomenclatura LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) ja considera la tinció immunohistoquímica p16 com una possible substituta de l'anàlisi anatomopatològic, dins un sistema de classificació de 2 grups: un grup de lesions de baix risc (L-SIL) i un altre d'alt risc (H-SIL), sense diferenciar entre CIN-2 i CIN-3. Però a més, utilitzaria la tinció de la p16 en casos dubtosos de CIN-2, on les lesions amb p16 negativa serien classificades com a L-SIL, i les lesions amb p16 positiva serien agrupades amb les H-SIL.(11).

El nostre estudi suggeriria que cal identificar totes les lesions CIN-2 amb la tinció de la p16 per a poder identificar totes aquelles lesions p16 negatives que tenen una altra probabilitat de regressar i així evitar un tractament exerètic innecessari.

Només tenim coneixement de 2 altres estudis sobre la utilitat de la tinció p16 per a predir l'evolució de la lesió CIN-2. El primer grup encapçalat per Guedes el 2007 va estudiar 45 pacients amb una mitja d'edat de 30 anys i amb biòpsia cervical de CIN-2 amb seguiment d'un mínim de 12 mesos(189). Van tenir una taxa de regressió a curació completa de 42%, un 20% van regressar a CIN-1, el 11% es van mantenir a CIN-2, i el 22% van progressar a CIN-3. En els seus resultats, els grups p16 negativa i p16 positiva no tenen diferències en l'evolució de les lesions CIN-2 ($p=$). La taxa de regressió acumulativa als 12 mesos de control amb la p16 positiva era del 24%, i amb p16 negativa era del 16%, sense diferències significatives entre els grups. Això pot estar explicat per diferent plantejament de l'estudi, ja que la positivitat de la p16 la van definir com a qualsevol expressió en la tinció immunohistoquímica de la p16: expressió dèbil, moderada i forta, enlloc de les últimes recomanacions (190) que defineixen la p16 positiva quan l'expressió és forta o bé difusa en bloc, tal i com hem fet en el nostre estudi.

En canvi l'altre grup, el de Miyamoto, sí que va demostrar que l'expressió de la p16 estava relacionada amb progressió a CIN-3. El seu plantejament partia d'un estudi retrospectiu de 122 pacients diagnosticades de CIN-2 durant els anys 2004 i 2011, en les quals es va estudiar la positivitat per a p16, a més de la del Ki-67. Va separar les pacients en 3 grups segons regressessin, persistissin o bé progressessin a CIN-3. La positivitat per a p16 es va definir com al nostre estudi amb positivitat de les cèl·lules basals de l'epiteli però en aquest cas en un mínim del 50% amb un patró difús o motejat moderats o intensos. El resultat va ser que aquestes pacients amb l'expressió de la p16 augmentada tenien un major risc de progressar a CIN-3 en comparació amb les que no expressaven aquests nivells de p16 (p 0,001).

Caldria remarcar el diferent plantejament d'aquests dos estudis, on els criteris de positivitat de la p16 són molt distants. Mentrestant el grup de Guedes dona per positiu qualsevol intensitat d'expressió en tot l'epiteli, el grup de Miyamoto és molt més exigent a l'hora de donar per positiu per p16 una biòpsia de CIN-2, i només ho fa amb una intensitat moderada o forta en gruixos de més del 50% de l'epiteli cervical biopsiat. El nostre estudi no va determinar uns criteris de positivitat tan exigents com el de Miyamoto, però va discriminar entre els diferents graus d'intensitat d'expressió de la p16, per tal d'evitar confondre amb altres tipus de teixits com atròfia o metaplàsia que estiguin expressant la proteïna.

De la mateixa manera que nosaltres hem valorat l'expressió de p16 en les lesions de CIN-2, altres autors han estudiat la relació entre les lesions CIN-1 i l'expressió de la p16 (157,160). Els resultats també suggeririen que lesions tipus CIN1 amb expressió en bloc o motejada moderada o severa de la p16 estarien en risc de progressar a una lesió d'alt grau i en conseqüència a un CCU.

El grup de Quint van dissenyar un estudi retrospectiu incloent 584 pacients amb biòpsia de LSIL, per a trobar una relació entre l'edat, el genotip del VPH i marcadors biològics (p53, pRb, p16 i Ki-67) que poguessin informar sobre la capacitat de progressió de les lesions. La positivitat per a p16 era dividida en terços com en el nostre estudi. Les dades sobre la p16 no van orientar sobre l'evolució de les lesions LSIL estudiades.

Com hem anotat anteriorment, un 60% de les lesions CIN-2-p16 positiva van regressar a un grau inferior. És possible que en aquests casos els canvis biològics causats per la interacció de les proteïnes E6 i E7 del VPH, uns defectes necessaris i aviat en la cadena de la carcinogènesi, no siguin suficients per a una transformació neoplàstica real fins que no apareguessin més alteracions genètiques i moleculars tals com

inestabilitat cromosòmica i acumulació de mutacions. En aquest sentit podrien entrar en joc altres cofactors com podria ser el mateix sistema immune de la pacient hoste, que podria tenir una influència significativa en l'eliminació de la infecció i regressió en els passos oncogènics donats. Potser caldria afegir altres marcadors de vies oncogèniques més profundes que ajudessin a identificar les lesions amb errors superficials de les que contenen errors oncogènics definitius com ara la proteïna L1 de la càpside del VPH (155,160).

6.4.2. PREVALENÇA DE LA Ki-67

El ki-67 va ser el segon marcador biològic indicatiu de l'activitat proliferativa cel·lular i secundàriament gravetat de la infecció de l'HPV, que vam considerar. El Ki-67 si que ha estat provat com a bon indicador de lesió tipus CIN, amb correlació directa amb el grau de displàsia segons el grau d'expressió immunohistoquímica(163,191–193). Cal senyalar que aquesta relació no és causal, ja que no està relacionada amb la carcinogènesi sinó en la proliferació de la lesió, és a dir, un reflex de l'activitat biològica de les lesions, ja que la infecció del HPV no és causa directa de l'augment del Ki-67(163,178).

El fet que el Ki67 fos un indicador de l'activitat biològica de les lesions de CIN, ens va fer hipotetitzar que podria ser un indicador indirecte de la capacitat de l'evolució de les lesions de CIN2. Per tant i de igual manera que amb la p16 vam intentar correlacionar l'expressió immunohistoquímica de Ki67 a les lesions CIN2 amb la seva posterior evolució.

Aquest treball, és l'estudi prospectiu amb més seguiment del que tenim coneixement sobre l'avaluació de la relació entre el Ki-67 i l'evolució de les lesions CIN-2. De manera consistent amb el paper com a marcador de proliferació cel·lular de Ki67, totes les lesions amb CIN2 que no expressaven Ki67, van curar o regressar parcialment en només un any de control ($p=0.010$). Aquestes troballes van a favor per a utilitzar el Ki-67 com a marcador de l'activitat i predictiu de les lesions CIN 2, que permetria tractar de manera conservadora aquelles pacients amb lesions CIN2 on no s'identifiqués expressió de Ki-67.

En canvi, les lesions CIN2 que van presentar expressió de Ki67 van mantenir-se com a tals en un 30,2% o bé van evolucionar a un CIN-3 en un 9.3% dels casos. Tot i així, de les 86 pacients amb CIN2- Ki67 positiu, la majoria (el 60,5%) també van regressar a CIN-1 o es van curar en els 12 mesos de seguiment ($p=0,010$). Tot i que la positivitat per a Ki67 no es va demostrar com a predictora de l'evolució favorable de les lesions, cal insistir en aquesta dada, ja que si només es considerés aquest marcador, el 60% de les pacients amb lesions de CIN2 i expressió de Ki-67 serien tractades amb una conització segons la pràctica clínica actual, el que comportaria una significativa taxa de sobretractament donat que només el 39,5% persistiria o bé evolucionaria a un CIN-3 segons les nostres dades de l'estudi.

Amb l'objectiu de diferenciar les lesions amb Ki-67 positiu que regressaven de les que evolucionaven, vam estratificar-les segons els terços d'epiteli cervical que expressaven el Ki-67, tal i com vam fer amb la p16. Totes aquelles lesions que només expressaven Ki-67 en el terç basal (intern) de l'epiteli es van comportar clínicament de manera idèntica a les lesions que tenien una expressió negativa del Ki-67, de manera que les vam seleccionar en un grup de Ki-67 de baix risc, on el 100% regressaven a CIN-1 o a curació ($p=0,005$). En les pacients que expressaven el Ki-67 en els 2 i en els 3 terços basals, no es va trobar una distribució capaç de diferenciar les pacients que regressen de les que evolucionen a un grau superior. Però cal destacar que el 51,6% de les pacients amb tot el gruix de l'epiteli positiu per a Ki-67 van mantenir-se en CIN-2+, tot i que només el 6,1% van evolucionar a un CIN-3 ($p=0,005$). D'aquesta manera hauríem identificat un subgrup de lesions CIN 2 de baix risc de persistència i/o progressió que expressarien Ki-67 o l'expressen només al 1/3 basal de l'epiteli, i un altre d'alt risc que presentarien expressió Ki67 en tot l'espessor de l'epiteli cervical de forma similar a altres grups.

El primer autor que va investigar la relació entre la Ki-67 i les lesions CIN va ser *Kruse i col.* (194). El seu grup va estudiar 44 pacients amb biòpsies de CIN-1 i de CIN-2 que van ser sotmeses a seguiment clínic durant 18,8 mesos. Amb les dades obtingudes a partir del seu estudi, el grup va crear un model de risc de progressió del Ki-67, que incloïa el càlcul de l'índex d'estratificació i el percentatge de cèl·lules positives per a Ki-67 en l'epiteli cervical biopsiat. A partir d'aquí classificaven les pacients en 2 categories: "alt risc" o "baix risc de progressió. Aquest estudi requeria un sistema d'anàlisi d'imatges interactiu per a mesurar paràmetres morfològics del tall de la mostra cervical. La conclusió va ser que el percentatge de cèl·lules positives per a Ki-67 en el terç mig de l'epiteli i un índex d'estratificació a partir del percentil 90, eren un bon predictor de progressió de la lesió a CIN-3. En canvi en el nostre estudi prospectiu

es va categoritzar el resultat de l'expressió del Ki-67 en 2 mètodes: segons fos positiu o negatiu, i dividint en 3 terços l'epiteli cervical per a posteriorment agrupar-los segons el seu comportament en un grup de baixa positivitat i un altre d'alta positivitat. El nostre VPN, tal i com passa a l'estudi de *Kruse i col.*, també és del 100%, però amb un VPP massa baix com a per a prendre decisions de maneig invasiu, només considerant aquestes variables. Algo més recentment que els anteriors, *Baak i col.* (195) també van estudiar la relació existent entre la positivitat del Ki-67 en lesions CIN de tipus 1 i 2, i van demostrar que les característiques pronòstiques més fortes del Ki-67 eren el seu índex d'estratificació (amb el llindar a 0,57) i el percentatge de nuclis positius per a Ki-67 en el terç mig de l'epiteli cervical, indicant una activitat biològica augmentada i un alt risc per a evolucionar a CIN-3. No vam tenir en compte l'índex de proliferació cel·lular, ni vam comptar el percentatge de nuclis positius per a Ki-67 en el terç mig de l'epiteli com per a poder comparar-lo amb el realitzat per Baak i col. Tot i així, vàrem observar que les pacients amb lesions CIN-2 amb positivitat en bloc en l'epiteli per a Ki-67 tenien una tendència a la persistència o progressió de la lesió ($p=0,005$).

El grup de Miyamoto i col també arriba a les mateixes conclusions quan afirmen que les pacients amb biòpsies de CIN-2 on s'expressa el Ki-67 en més del 50% del gruix de l'epiteli tenen un risc elevat de mantenir-se en un CIN-2 i també de progressar a un CIN-3(191). El seu nivell de tall de l'expressió del Ki-67 és diferent al nostre estudi, però es pot extrapolar que de manera similar a les nostres dades, les pacients amb l'anomenat per nosaltres Ki-67 de baix risc (o en el cas de Miyamoto classificat amb menys del 50% del gruix de l'epiteli cervical) tenen una tendència a disminuir la seva gradació i poder resoldre la lesió CIN sense necessitat de cirurgia.

Per contra, *Baak i col.* en un altre estudi limitat de 28 pacients no va trobar cap associació entre l'expressió de Ki-67 i la regressió de les lesions CIN d'alt grau(196).

Ja s'ha comentat anteriorment les conclusions de l'estudi del grup de Quint, en el que tampoc es va aconseguir establir una relació entre l'edat, el genotip del VPH i marcadors biològics (p53, pRb, p16 i Ki-67) que pogués informar sobre la capacitat de progressió de lesions CIN 1. La positivitat per a Ki-67 era dividida en terços com en el nostre estudi, però la intensitat de l'expressió es dividia segons el percentatge de nuclis positius. Les dades de l'expressió del Ki-67 no van informar de l'evolució de les lesions LSIL estudiades.

El principal problema d'utilitzar el Ki-67 és la manca de treballs homogenis a l'hora de llegir la seva expressió, ja que s'han utilitzat diferents punts de tall en els diferents

estudis i és difícil de trobar un consens. Per això el més important seria trobar un consens per a definir correctament la positivitat per a Ki-67, per tal d'estandaritzar diagnòstics i per tant també els procediments.

6.4.3. CITOLOGIA PRÈVIA

La citologia cervical ha estat el mètode de cribratge per a patologia cervical per antonomàsia. De fet el diagnòstic citològic estableix també una probabilitat de lesió de baix o alt grau segons els casos, i obliga a la confirmació histològica de la sospita de patologia. Hi ha nombrosa evidència científica al respecte, i de fet s'accepta que les lesions provinents d'un H-SIL tenen una major probabilitat de correspondre una lesió tipus CIN-3 que la resta de diagnòstics citològics(18). D'altra banda, el diagnòstic citològic no només pot orientar sobre el diagnòstic histològic si no que també podria orientar sobre el comportament posterior de les lesions tipus CIN. De la mateixa manera en estudis de CIN-1 s'ha demostrat que hi ha un major risc de CIN-3 en aquelles pacients que provenen d'un H-SIL (160).

En el nostre estudi, el 45% de lesions CIN-2 s'havien diagnosticat després d'una d'H-SIL. D'aquestes, més de la meitat, el 55,6%, van mantenir-se en CIN-2+ al finalitzar l'any de seguiment, en canvi només el 28,6% de les lesions diagnosticades a partir d'una citologia de L-SIL van mantenir el CIN-2+ ($p=0,001$).

Si valorem el risc de les citologies H-SIL en comparació amb la resta de citologies juntes com a no H-SIL, veiem que encara es posa més de manifest tan l'augment de risc de les lesions CIN-2 provinents d'H-SIL de mantenir-se en CIN-2 o progressar a CIN-3 (55,6%) , comparada amb la probabilitat de regressar per part de les lesions no H-SIL (82,4%) ($p<0,001$).

Hi ha pocs estudis anteriors al nostre que analitzin l'evolució de lesions intraepiteliales partint d'un H-SIL previ. La majoria d'estudis inclouen pacients amb citologies de base de L-SIL. Com el cas de Discacciati i col. en el seu estudi sobre la regressió de les lesions CIN-2, on observen una taxa de regressió del 74%(182). Aquest grup va entendre que una de les raons per la qual tenia taxes de regressió superiors a altres estudis, era que les H-SIL comportaven un menor risc de regressió i major risc de

progressió que les L-SIL. És el cas del grup de Guedes i col. que el 2010 van obtenir una regressió del 44% de les lesions CIN-2 provinents de tot tipus de citologies(117).

Un dels estudis que va incloure lesions H-SIL va ser el del grup de Castle que a partir de dades de l'estudi ALTS (sobre el comportament de les lesions ASC-US i LSIL)(118), van observar que en casos en els que s'havia repetit la citologia per a la inclusió a l'estudi havia aparegut un HSIL, tenien una major probabilitat d'evolució a un CIN-3 que no pas les altres pacients incloses a l'estudi però amb citologia ASC-US o LSIL. De manera que van hipotetitzar que quan es provenia d'una lesió HSIL, el risc de tenir un CIN-3 era més elevat. Aquest estudi, també amb citologies H-SIL, va obtenir una regressió del CIN-2 del 44%, similar a Guedes i col.

Recentment, estudis com el de Lee i col. han observat una major regressió, de fins a 74,7% i de les lesions quan la citologia de base era un L-SIL (125).

6.4.4. INFECCIÓ PER VPH

La prevalença d'infecció per VPH en L-SIL i en H-SIL és molt elevada, superior a un 80%. L'estudi ALTS(167) va fer que la identificació de la presència de HR-HPV es descartés com a mètode per a triar les lesions ASC-US i L-SIL amb potencial de progressar a una lesió d'alt grau. Posteriorment, amb l'aparició de mètodes com el Test COBAS 4800 o el Cervista HPV 16/18, que permeten identificar el genotip del virus present en la lesió, van obrir noves estratègies a l'hora de definir i entendre el comportament de les lesions CIN.

Del total de 96 pacients que finalment van entrar en el nostre estudi, 82 eren positives per a HR-VPH i 14 eren negatives. Vam considerar q tot i la diferència de mostra amb altres estudis era suficient per a descriure la nostra població.

Existeix una important heterogeneïtat sobre la distribució de genotips de VPH a nivell mundial, però el que es manté com a genotip més freqüent a tot arreu sempre és el VPH-16, tan en pacients sanes com en pacients amb patologia cervical(197,198) En la resta de genotips, la distribució varia molt segons l'àrea geogràfica(199,200).

Segons quin genotip provoca la infecció, la pacient tindrà menor o major risc d'infecció persistent, i per tant d'una possible lesió de tipus CIN. Per això creiem que conèixer el

genotip causant de les lesions aportaria coneixement sobre el maneig individualitzat de les pacients.

Vam trobar que 39 pacients de 96 eren VPH-16 positives, 6 pacients eren VPH-18 positives, i 40 pacients tenien infecció per un HR-VPH diferents al 16 i al 18. 14 pacients van ser negatives en el test de detecció COBAS 4800®. Aquest test ha representat un gran avenç ja que és molt important conèixer la prevalença dels genotips 16 i 18 perquè sabem que el 70% dels CCU estan causats per la seva infecció (201).

Segons l'estudi CLEAR (Clinical Evaluation of APTIMA mRNA, sobre la presència de VPH en citologies de tipus ASC-US) les lesions CIN-2 trobades a partir d'un ASC-US que tenien VPH-16/18 eren el 39,5%. Segons l'estudi ATHENA (Adressing The Need for Advanced HPV Diagnosis, estudi per a la validació del mètode COBAS 4800® i analitzar el risc de lesions pre-invasives i carcinoma en pacients ASC-US segons el HR-HPV) s'informava d'una presència de VPH-16/18 del 44% de les lesions ASC-US amb VPH positiu biopsiades com a CIN-2. També es diferenciaven mínimament per al percentatge de HR-HPV en el CIN-3, amb 65,5% i 61% respectivament. Tot i ser unes dades força similars, les diferències trobades amb el nostre estudi serien probablement degudes a que ells partien només sobre citologies de menor grau com el ASC-US, i nosaltres hem partit de citologies de tot tipus que han resultat ser un CIN-2, i això afectaria a l'hora de VPH més agressiu com el VPH-16 i el VPH-18.

Segons les dades del nostre estudi, les pacients portadores d'infecció per VPH tindrien un risc major de mantenir-se en un CIN-2 i estar en risc de desenvolupar una lesió CIN-3. Al contrari, aquelles pacients negatives per al VPH, tindrien una alta probabilitat de regressar total o parcialment. Això ens pot fer plantejar si realment aquestes lesions CIN-2 amb un VPH negatiu s'han de considerar realment tal lesió CIN-2, o bé podem classificar-les com a lesions de baix risc amb una alta tendència a la regressió.

D'acord amb els estudis publicats, el virus més prevalent a les lesions de CIN2 estudiades va ser el VPH-16. Aquest és el genotip s'ha demostrat com el de major risc de persistència de la infecció, i amb major capacitat oncogènica en tots els estudis realitzats al respecte. De fet el RR per a persistència o progressió de les lesions CIN2 amb VPH-16 de la nostra serie va ser de 2,36 (IC 95%; 1,350 - 4,129).

Malgrat l'afirmació anterior, la presència de VPH-16 no va predir una evolució de la malaltia, ja que el 46% de les pacients amb lesions CIN2 positives per a VPH-16 van regressar .

Un total de 6 pacients del nostre estudi eren portadores de VPH-18. Tot i la baixa quantitat de pacients positives per a VPH-18, el 66,7% van mantenir-se en CIN-2 o evolucionar a CIN-3 i el 33,3% van regressar total o parcialment. Aquestes diferències no van assolir la significança estadística (p 0,309) probablement pel tamany mostral insuficient. El 2013 Gage i col. van publicar que les lesions L-SIL causades per VPH-18 tenien un risc augmentat en comparació a les pacients amb detecció de HR-HPV negativa

El 70% de les lesions CIN 2 causades per un VPH-no16no18 havien regressat de manera parcial o total al finalitzar el seguiment. Tot i no assolir la significació estadística, aquests genotips podrien indicar una tendència a una menor progressió de la malaltia.

Tal i com s'ha demostrat en els estudis publicats, veiem com el màxim responsable de l'augment de risc de progressió es el VPH-16. L'estudi de Castle i col. de l'any 2005 mostra un augment del risc del 32,5% de les pacients amb L-SIL de desenvolupar un CIN-3 a l'estudi de 2 anys de seguiment(89). I Khan i col. va més enllà i remarca que aquest risc està augmentat de fins a 10 anys de seguiment (202). Hi ha més estudis, com ara el de Gage i col. que van mostrar un risc major al 50% de CIN-2+ als 2 anys d'una infecció persistent per VPH-16 en la població de LSIL(203). Cal tenir en compte que aquests estudis citats parteixen de citologies de baix grau, i que a més es diferencien per les edats incloses en els seus estudis, factor que faria variar substancialment el nivell de risc acumulat, tot i que la idea general del risc augmentat per culpa de la infecció de VPH-16 es manté en tots. Un estudi recent de Solé i col. justifica aquesta diferència de risc entre les infeccions i diferent genotip per a proposar un maneig diferent per als L-SIL(167). En cas que fossin negatius per a VPH, podrien beneficiar-se d'un maneig conservador amb controls a llarg plaç, si fossin positius per a VPH-16 o VPH-18 que necessitarien un maneig més estret, i en cas de VPH-no16no18 un maneig més conservador.

En els estudis sobre l'evolució de les lesions CIN-2 comentats en apartats anteriors, alguns també relacionaven l'estat de la infecció del VPH i l'evolució de la lesió. Tots ells estan en d'acord que un dels factors de risc més important per a la persistència de la lesió és la presència d'infecció per VPH, i alguns en particular citen el VPH-16. Moscicki i col. (119) va trobar que la presència de VPH de qualsevol tipus i encara més

el VPH-16/18 estava associat a la no regressió de la lesió, i que sobretot la presència de VPH-16/18 en l'última visita (no pas en la visita del diagnòstic) estava associat a la progressió a CIN-3. De manera similar, Castle i col (118) van trobar que les lesions amb infecció per VPH-16 tenien menys probabilitat de regressar, probablement per la seva major tendència a persistir i al seu major poder oncogènic, i de manera més significativa que a altres infeccions per HR-HPV.

En l'estudi de Chan i col. (114) en un treball prospectiu sobre l'evolució CIN-2 i CIN-3 van valorar l'estat de la infecció del VPH, i van concloure que regressaven més les lesions amb test de VPH negatiu, i que les que eren positives i després negativitzaven el VPH també tenien més taxes de curació que les que no l'eliminaven.

En un altre estudi prospectiu, Ho i col (122) estudiant factors de risc per a la persistència de lesions CIN-1 i CIN-2 afirmaven que la presència de múltiples genotips de VPH augmentaven el risc de persistència, i que sobretot el subgrup de VPH-16/18 tenien el risc més elevat, però no aconseguien predir l'evolució de les lesions. I cal destacar l'estudi de Wang i col (148) on afirmaven que una càrrega augmentada de VPH era predictor de progressió de les lesions CIN-2.

Els nostres resultats, tot i ser a partir de lesions de CIN2, mostren comportaments similars a les lesions de baix grau. Una de les propostes per al seu maneig seria que les pacients amb VPH negatiu fossin seguides donat el seu nul risc de progressió, mentre que es pacients amb VPH positiu, no16/no18 podrien tenir un seguiment cada sis mesos, amb un període màxim de 1-2anys, i finalment les lesions amb VPH 16 i/o 18 serien tributàries de tractament escisional donat l'elevat risc de progressió a CIN-3.

6.5. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

El nostre estudi té diferents limitacions. Una de les principals és el nombre de pacients incloses en la mostra, que tot i ser similar a alguns estudis amb els que ens hem comparat i donar taxes de regressió i evolució de les lesions similars a la literatura, podria no ser suficient per a calcular les probabilitats i riscos. També fora bo seguir

aquestes pacients que la seva lesió no s'ha modificat i no tenen factors de risc per a una progressió en l'àmbit d'assajos clínics per tal de veure realment la seva història natural, donat que les recomanacions de les guies de practica clínica limiten el seguiment d'aquetes lesions a un màxim de 2 anys.

Tot i que es va intentar homogeneïtzar criteris i terminologia i es va mapejar les lesions colposcòpiques, no podem assegurar que les lesions seguides durant tot el període de l'estudi siguin les mateixes, és a dir que no s'hagin resolt abans i n'hagin pogut aparèixer de diferents. La solució seguint les pacients cada poques setmanes no seria factible i tot i així no estariem segurs de si es tractaria de la lesió antiga o d'una de nova.

Tot i que les citologies i colposcòpies amb biòpsies dirigides no varen ser realitzades pel mateix especialista, podria existir un biaix ja que són proves diagnòstiques dependents del seu realitzador, totes van ser fetes per especialistes amb més de 10 anys d'experiència. Tot i que estudis comentats anteriorment com el ATHENA, on tota pacient rebia una biòpsia tot i tenir colposcòpia normal, o el CLEAR, on sempre es realitzaven 5 biòpsies en totes les pacients, nosaltres vam seguir la pràctica clínica habitual i no realitzàvem biòpsia en cas de tenir una colposcòpia normal i se les citava per a control en 4 mesos.

6.6. LÍNIES DE FUTUR

L'objectiu de la tesi era veure si les proteïnes p16 i Ki-67 servien de marcadors biològics de manera aïllada per a identificar lesions CIN-2 que podien regressar o bé evolucionar. LA seva determinació es podria realitzar de manera protocol·lària en tots els diagnòstics de CIN-2 per tal de poder establir un diagnòstic més acurat i sobretot establir una previsió de l'evolució biològica de la lesió, tot formant part de l'algoritme terapèutic de les lesions CIN-2.

Malgrat no haver realitzat una anàlisi multivariant, probablement lesions CIN-2 que provenen d'una citologia H-SIL, d'una infecció amb VPH-16, i p16/Ki-67 positives en tot l'espessor de l'epiteli cervical, tindrien molt poca probabilitat de regressar o curar, i que per tant serien tributàries de rebre tractament excisional en el moment diagnòstic.

7. CONCLUSIONS

1. En finalitzar l'any de seguiment de les pacients amb CIN 2 s'han registrat unes taxes de regressió completa del 28.1%, regressió parcial a CIN 1 del 36.5%, persistència del CIN 2 del % i progressió a CIN 3 del 8%., fet que fa el maneig conservador una opció segura en la pràctica clínica.
2. Les lesions CIN-2 amb p16 negativa han regressat en el 100% dels casos. El 43% de les lesions CIN-2 amb p16 positiva s'han mantingut com a CIN-2 o bé han evolucionat a CIN-3 després d'un any de seguiment. Per contra, el 57% d'aquestes lesions han regressat de manera parcial (35,4%) o bé han curat (21,5%) .
3. Les lesions CIN2 en les que no es va demostrar Ki-67 han regressat en el 100% dels casos. Les lesions CIN2 amb Ki-67 positiu, s'han mantingut com a CIN-2 o bé han evolucionat a CIN-3 en el 39,5%. El 60% ha regressat de manera parcial cap a CIN 1 (25,6%) o bé han curat (34,9%).
4. Les lesions de CIN2 que colposcòpicament corresponien a canvis majors es van relacionar amb 2.7 vegades més risc de persistència i progressió de manera independent. Les lesions de CIN2 que colposcòpicament ocupaven >50% del cèrvix es van relacionar amb 3.9 vegades més risc de persistència i progressió de manera independent. Les lesions CIN2 amb patró acetoblanc intens i mosaic irregular presenten 3.7 i 8.8 vegades més de risc de persistència i progressió respectivament.
5. Totes les pacients amb VPH negatiu van regressar. En canvi el 41.5% de les pacients amb VPH positiu, van progressar. Destaquem el VPH-16, que amb en un 53,8% de les pacients es manté o progressa a CIN-3. Les lesions CIN2 amb VPH-16 presenten 2,3 vegades més de risc de persistir o progressar a CIN3.

6. El 66,7% de les pacients amb infecció pr a VPH-18 van resultar CIN-2+ després dels 12 mesos de seguiment ($p=0,115$). El VPH-no16no18 té una tendència a la regressió, amb un 70% de pacients positives que regressen als 12 mesos de seguiment ($p=0,231$). Probablement per la baixa representació de la nostra mostra les dades no arriben a la significació estadística.

7. Les lesions CIN 2 que provenen d'una citologia diagnòstica amb resultat d'H-SIL tenen 3.1 vegades més de risc de persistir o d'evolucionar a CIN-3.

8. L'ús del tabac, el mètode anticonceptiu, la paritat, l'edat d'inici de relacions sexuals, i el nombre mig de parelles sexuals no han estat demostrats ser factors de risc de CIN-2+, tot i que la literatura ho indiqui.

8. BIBLIOGRAFIA

1. SEGO-Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. 2014;28. Available from: https://www.ocez.net/archivos/vocalia/313-prevencion-2014.pdf%5Chttp://www.sego.es/Content/pdf/oncoguias/Cervix_2013.pdf
2. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010;46(4):765–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.014>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
4. Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer* [Internet]. 2009;45(15):2640–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.07.018>
5. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2016;2:16086. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201686>
6. Bladé AT, Saladrigues M del P, Gimferrer MC, Quittlet FA, Ortiz DA, Piqué XC, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. Vol. 57, *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2014. 1-53 p.
7. Pelea C. *Citlogía ginecológica: de Papanicolau a Bethesda*. Editorial Complutense; 2003.

8. Reagan J. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of uterine cervix. *Cancer*. 1953;6((2)):224.
9. National Cancer INstitute Workshop. The Bethesda System for reporting carvical/vaginal cytological diagnosis. *J Am Med Assoc*. 1989;262(7):931–4.
10. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA [Internet]*. 2002 Apr 24 [cited 2017 Dec 4];287(16):2114–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11966386>
11. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-associated Lesions. *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 2013 Jan [cited 2017 Dec 4];32(1):76–115. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202792>
12. Cheung ANY, Szeto EF, Leung BSY, Khoo U-S, Ng AWY. Liquid-based cytology and conventional cervical smears. *Cancer [Internet]*. 2003 Oct 7 [cited 2017 Dec 4];99(6):331–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681939>
13. Karnon J, Peters J, Platt J, Chilcott J, McGoogan E, Brewer N. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess [Internet]*. 2004 May [cited 2017 Dec 4];8(20):iii, 1-78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147611>
14. Bulk S, Bulkman NWJ, Berkhof J, Rozendaal L, P. Boeke AJ, Verheijen RHM, et al. Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on

- cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Jul 15 [cited 2017 Dec 4];121(2):361–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17354241>
15. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: A meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998;91(4):626–31.
 16. Moscicki A, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for Incident Human Papillomavirus in Young Females. *Jama*. 2001;285(23):2995–3002.
 17. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2013;
 18. Olson A. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 12(2):186–92.
 19. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1998 Oct [cited 2017 Dec 4];92(4 Pt 2):727–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9764690>
 20. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. [cited 2017 Dec 4];3(7):619–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7827594>
 21. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1984 Oct

- [cited 2017 Dec 4];64(4):451–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6483293>
22. Park J, Sun D, Genest DR, Trivijitsilp P, Suh I, Crum CP. Coexistence of low and high grade squamous intraepithelial lesions of the cervix: morphologic progression or multiple papillomaviruses? *Gynecol Oncol* [Internet]. 1998 Sep [cited 2017 Dec 4];70(3):386–91. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825898951009>
 23. Larson AA, Liao SY, Stanbridge EJ, Cavenee WK, Hampton GM. Genetic alterations accumulate during cervical tumorigenesis and indicate a common origin for multifocal lesions. *Cancer Res* [Internet]. 1997 Oct 1 [cited 2017 Dec 4];57(19):4171–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331069>
 24. Chung TK, Cheung TH, Lo WK, Yu MY, Hampton GM, Wong HK, et al. Loss of heterozygosity at the short arm of chromosome 3 in microdissected cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Lett* [Internet]. 2000 Jun 30 [cited 2017 Dec 4];154(2):189–94. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806307>
 25. Villiers E De. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. 2017;445(2013):2–10.
 26. Villiers E De, Fauquet C, Broker TR, Bernard H. Classification of papillomaviruses. 2004;324:17–27.
 27. Egawa N. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*. 2017;231:119–27.
 28. IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 2007;90:1–636.
 29. Doorbar J. Human papillomavirus molecular biology and disease

- association. *Rev Med Virol.* 2015;25(1):2–23.
30. Clifford G. Human papillomavirus genotype distribution in Low-grade cervical lesions: Comparison by geographic regions and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol.* 2005;14(5):1157–64.
 31. Bosch F, Burchell A, Schiffman M, Giuliano A, de Sanjosé R, Bruni L. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and Type-specific implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine.* 2008;Aug(26):k1–6.
 32. Delgado D, Marin J, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios J. Human papillomavirus genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;May 30(5):230–5.
 33. Alemany L, Perez C, Tous S, Llombart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. *Gynecol Oncol.* 124(3):512–7.
 34. Stubenrauch F, Laimins L. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(6):379–86.
 35. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses: epithelial tropism and the development of neoplasia. *Viruses.* 2015;7(7):3863–90.
 36. Yang E, Quick M, Hanamornroongruang S, Lai K, Doyle L, McKeon F. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Mod Pathol.* 2015;28(7):994–1000.
 37. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk

- B. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:16086.
38. Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human papillomavirus vaccines - immune responses. *Vaccine* [Internet]. 2012;30(SUPPL.5):F83–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.106>
 39. Kanodia S, Fahey L. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr cancer drugs targets.* 2007;7(1):79–89.
 40. Psyrri S, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008;5(1):24–31.
 41. McBride A, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathog.* 2007;13(4):e1006211.
 42. Kjaer S, Chakerian B, van der Brule A, Svare E, Paull G, Walbomers J. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(2):1001–6.
 43. Winer R, Feng Q, Huigues J, O'Reilly L. Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. *J Infect Dis.* 2008;197(2):279–82.
 44. Moscicki A, Ma Y, Jonte J, Miller-Benningfield S, Hanson E, Jay J. the role of sexual behavior and human papillomavirus persistence in predicting repeated infections with new papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19(8):2055–65.
 45. Baussano I, Diaz M, Tully S, Muñoz N, de Sanjosé S, Bosch F. Effect of age-difference between heterosexual partners on risk of cervical cancer

- and human papillomavirus infection. *Papillomavirus Res.* 3:98–104.
46. Bruni L, Mendez F, Posso H, Molano M, van der Brule A, Ronderos M. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 190(12):2077–87.
 47. Oakeshott P, Aghaizu A, Reif F, Howell-Jones R, Hay P, Sadiq S. Frequency and risk factors of prevalent, incident and persistent genital carcinogenic human papillomavirus in sexually active women: community based cohort study. *BMJ.* 344:e4168.
 48. Winer R, Hughes J, Feng Q, Stern J, Xi L, Koutsky L. Incident detection of High-Risk Human papillomavirus infection in a cohort of High-risk women aged 25-65 years. *J Infect Dis.* 214(5):665–75.
 49. Rodriguez A, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman M. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst.* 102(5):315–24.
 50. Winer R, Hughes J, Feng Q, Xi L, FCherne S, O'Reilly L. Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexual active young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20(4):699–707.
 51. Shannon B, Yi T, Perusini S, Gajer P. HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. *Mucosal Immunol.*
 52. Ronco G, Dillner J, Elfström K, Tunesi S, Snijders P, Arbyn M. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet.* 383(9916):524–32.

53. International collaboration of epidemiological studies of cervical cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16563 women with cervical carcinoma and 33542 women without cervical carcinoma from 25 . *Int J Cancer*. 119(5):1108–24.
54. Appleby B, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Francheschi S, Goodhill A. International collaboration of epidemiological studies of cervical cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 16563 women with cervical carcinoma and 33542 women without cervical carcinoma from 24 e. *Lancet*. 2007;370(9599):1609–21.
55. Castellsagué X, Bosch F, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 89(2):191–9.
56. Safaeian M, Quint K, Schiffman M, Rodriguez A, Wacholder S, Herrero R. Chlamydia Trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. *J Natl Cancer Inst*. 102(23):1794–804.
57. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia Trachomatis infection-Associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Med*. 95(13):e3077.
58. Kelly H, Mayaud P, de Sanjosé S. Concomitant infection of HIV and HPV: What are the consequences? *Curr Obstet Gynecol Rep*. 4(4):213–9.
59. Kelly H, Weiss H, Benavente Y, de Sanjosé S, Mayaud P. ANtiretroviral therapy, high-risk human papillomavirus, cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*

(accepted).

60. Moscicki A-B, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* [Internet]. 2004 Nov [cited 2018 May 13];364(9446):1678–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530628>
61. Elfgren K, Kalantari M, Moberger B, Hagmar B, Dillner J. A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2018 May 13];183(3):561–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937800561250>
62. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* [Internet]. 2001 Jun 9 [cited 2018 May 13];357(9271):1831–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410191>
63. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2002 Apr [cited 2018 May 13];55(4):244–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
64. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013;49(6):1374–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
65. Benard VB, Watson M, Castle PE, Saraiya M. Cervical carcinoma rates

- among young females in the United States. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 May 13];120(5):1117–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090530>
66. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, et al. Five-Year Risk of Recurrence After Treatment of CIN 2, CIN 3, or AIS. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2018 May 13];17(5 Suppl 1):S78–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519309>
67. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J cancer* [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2018 May 13];118(6):1481–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21493>
68. Szarewski A, Maddox P, Royston P, Jarvis M, Anderson M, Guillebaud J, et al. The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. *BJOG* [Internet]. 2001 Mar [cited 2018 May 13];108(3):295–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281472>
69. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2018 May 13];135(2):453–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338632>

70. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1997 Jun 18 [cited 2018 May 14];89(12):868–73. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196253>
71. Ishi K, Suzuki F, Saito A, Kubota T. Prevalence of Human Papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and *Neisseria gonorrhoeae* in Commercial Sex Workers in Japan. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. 2000 [cited 2018 May 14];8(5–6):235–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11220484>
72. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* [Internet]. 2001 Jun 20 [cited 2018 May 14];285(23):2995–3002. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410098>
73. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* [Internet]. 2000 Dec [cited 2018 May 14];83(11):1565–72. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1054/bjoc.2000.1523>
74. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, Costa MC, Sobrinho JS, Prado JCM, et al. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2018 May 14];70(21):8569–77. Available from:

- <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-0621>
75. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJC, Ronderos M, et al. Incidence, Duration, and Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Colombian Women with Normal Cytological Results. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Dec 15 [cited 2018 May 14];190(12):2077–87. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551205>
 76. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2014 Apr 18 [cited 2018 May 14];289(4):715–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346121>
 77. 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* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2018 May 14];111(3):431–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15221973>
 78. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* [Internet]. 2002 Nov [cited 2018 May 14];89(2):191–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445659>
 79. Hinkula M, Pukkala E, Kyyrönen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J, et al. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *Br J Cancer* [Internet]. 2004 Mar 8 [cited 2018 May

- 14];90(5):1025–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/6601650>
80. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, de Britton RC, Gaitan E, et al. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1989 Sep [cited 2018 May 14];130(3):486–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2763994>
81. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* [Internet]. 2002 Nov [cited 2018 May 14];29(11):725–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438912>
82. Tokudome S, Suzuki S, Ichikawa H, Hosono A, Maeda K, Marumoto M, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J cancer* [Internet]. 2004 Oct 20 [cited 2018 May 14];112(1):164; author reply 165. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.20385>
83. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jun 22 [cited 2018 May 14];354(25):2645–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790697>
84. Massad LS, Xie X, D'Souza G, Darragh TM, Minkoff H, Wright R, et al. Incidence of cervical precancers among HIV-seropositive women. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 May [cited 2018 May 14];212(5):606.e1-8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937814023801>
85. Clifford G, Smith J, Aguado T, Francheschi S. Comparison of HPV type

- distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;89(1):101–5.
86. Zuna R, Allen R, Moore W, Mattu R, Dunn S. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod Pathol*. 2004;17(11):1314–22.
87. Muñoz N, Bosch F, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518–27.
88. Khan M, Castle P, Lorincz A, Wacholder S. The elevated 10-year risk of cervical pre-cancer and cancer in women with human papillomavirus type 16 or 18 and the possibly utility of type specific HPV testing in clinical practice. *JNCI J Natl cancer Inst*. 2005;97(14):1072–9.
89. Castle P, Solomon D, Schiffman M, Wheeler C for the A group. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytological abnormalities. *JNCI J Natl cancer Inst*. 2005;97(14):1066–71.
90. Berkhof J. Human papillomavirus type specific 18-month risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with a normal or borderline/mildly dyscaryotic smear. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(7):1268–73.
91. Hubbard R. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol lab Med*. 127(8):940–5.
92. Ordi J, Puig-Tintore L, Torne A, Sanz S, ESteve R, Romagosa C. Contribution of human papillomavirus testing to the management of

- malignant and premalignant lesions of the uterine cervix. *Med Clin (Barc)*. 2003;121:441–5.
93. Ordi J, Alonso I, Torné A, EStevé R, Sierra E, Campo E. Human papillomavirus load in Hybrid Capture II assay: does increasing the cutoff improve the test. *Gynecol Oncol*. 2005;99:313–9.
 94. Arney A, Bennet K. Molecular diagnostics of human papillomavirus. *Lab Med*. 41(9):523–30.
 95. Ramirez A, Musset M, Vilamala M, Laso-Perez E, Serrano L, Alameda F. Hybrid capture II high risk human papillomavirus test: should “grey zone” results justify repeating the test? *Anal Quant Citol Histol*. 2013;(35):152–6.
 96. Herraiz-Hernandez E, Preda O, Alonso S, Pardo RS, Olmo A. Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens with the HPV Direct Flow CHIP System. *Open Virol J [Internet]*. 2013 Oct 18 [cited 2017 Nov 20];7(1):91–5. Available from: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOVJ-7-91>
 97. Lloveras B, Gomez S, Alameda F, Bellosillo B, Mojal S, Muset M, et al. HPV Testing by cobas HPV Test in a Population from Catalonia. Scheurer M, editor. *PLoS One [Internet]*. 2013 Mar 6 [cited 2017 Nov 20];8(3):e58153. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483984>
 98. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJLM, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence Regarding Human Papillomavirus Testing in Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Vaccine [Internet]*. 2012 Nov 20 [cited 2017 Nov 20];30:F88–99. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199969>
99. Giménez J, Sanz I, Alfaro J. Evaluación de dispositivos automatizados para el diagnóstico citológico en la prevención del cáncer de cérvix. *Rev española Patol.* 2002;35(3).
 100. Bernstein SJ, Sanchez-Ramos L, Ndubisi B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 Aug [cited 2017 Nov 20];185(2):308–17. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518884>
 101. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* [Internet]. 2003 [cited 2017 Nov 20];(31):80–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807950>
 102. Ogilvie GS, van Niekerk D, Kraiden M, Smith LW, Cook D, Gondara L, et al. Effect of Screening With Primary Cervical HPV Testing vs Cytology Testing on High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia at 48 Months. *Jama* [Internet]. 2018;320(1):43. Available from:
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2018.7464>
 103. Departament de Salut, De G, D'Oncologia IC. Avaluació del protocol de les activitats de cribratge de càncer de coll uterí a l'atenció primària a Catalunya. 2012;
 104. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2003 Aug [cited 2017 Nov 26];127(8):946–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873166>

105. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Nov 26];17(5 Suppl 1):S1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519301>
106. O'Connor DM. A Brief History of Lower Genital Tract Screening. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2007 Jul [cited 2017 Nov 26];11(3):182–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596765>
107. Zamudio A, Zepeda J, Rodriguez B, Tenorio R. Evaluación del Papanicolau y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus del papiloma humano. *Rev la Fac Med UNAM*. 2001;44:1–7.
108. Hammes LS, Naud P, Passos EP, Matos J, Brouwers K, Rivoire W, et al. Value of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) Terminology in predicting cervical disease. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2007 Jul [cited 2017 Nov 26];11(3):158–65. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00128360-200707000-00007>
109. Shastri SS, Mitra I, Mishra GA, Gupta S, Dikshit R, Singh S, et al. Effect of VIA Screening by Primary Health Workers: Randomized Controlled Study in Mumbai, India. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2014 Mar 26 [cited 2017 Nov 26];106(3):dju009-dju009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24563518>
110. Castle PE, Gage JC, Wheeler CM, Schiffman M. The Clinical Meaning of a Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 1 Biopsy. *Obstet Gynecol*

- [Internet]. 2011 Dec [cited 2017 Dec 14];118(6):1222–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105250>
111. Elit L, Levine MN, Julian JA, Sellors JW, Lytwyn A, Chong S, et al. Expectant management versus immediate treatment for low-grade cervical intraepithelial neoplasia : a randomized trial in Canada and Brazil. *Cancer* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2017 Dec 14];117(7):1438–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.25635>
 112. Katki HA, Gage JC, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, et al. Follow-up Testing After Colposcopy. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Dec 14];17(5 Suppl 1):S69–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519308>
 113. Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data. *BMJ* [Internet]. 2009 Jul 28 [cited 2017 Dec 14];339:b2968. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638651>
 114. Chan JK, Monk BJ, Brewer C, Keefe KA, Osann K, McMeekin S, et al. HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for “natural” regression of CIN 2 and 3. *Br J Cancer*. 2003;89(6):1062–6.
 115. Moore K, Cofer A, Elliot L, Lanneau G, Walker J, Gold MA. Adolescent cervical dysplasia: histologic evaluation, treatment, and outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(2):1–6.
 116. Fuchs K, Weitzen S, Wu L, Phipps M, Boardman L. Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 in Adolescent and Young Women. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2012;v(2):265–75.

117. Guedes AC, Zeferino LC, Syrjänen KJ, Brenna SMF. Short-term outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: Considerations for management strategies and reproducibility of diagnosis. *Anticancer Res.* 2010;30(6):2319–23.
118. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for Frequent Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia–Grade 2. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2017 Nov 12];113(1):18–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104355>
119. Moscicki A, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh T, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and Risks for Regression of CIN-2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol.* 2011;116(6):1373–80.
120. McAllum B, Sykes PHH, Sadler L, MacNab H, Simcock BJ, Mekhail AK. Is the treatment of CIN 2 always necessary in women under 25 years old? *Am J Obstet Gynecol.* 2011;
121. Discacciati MG, de Souza CAS, d’Otaviano MG, Ângelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH, et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Nov 26];155(2):204–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211510005737>
122. Ho GYF, Einstein MH, Romney SL, Kadish AS, Abadi M, Mikhail M, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2: Managed by watchful waiting. *J Low Genit Tract Dis.* 2011;15(4):268–75.
123. Wang S, Colombara D, Shi J, Zhao F, Li J, Qiao Y. Six-year regression

- and progression of cervical lesions of different HPV viral loads in varied histological diagnoses. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;23(4):716–23.
124. Bleecker E, E, Koehler E, Smith J, Budwit D, Rahangdale L. Outcomes after management of young women with cervical intraepithelial neoplasia 2 with a 6-month observation protocol. *J Low Genit Tract Dis*. 2014;18(1):46–9.
125. Lee MH, Finlayson SJ, Gukova K, Hanley G, Miller D, Sadownik LA. Outcomes of Conservative Management of High Grade Squamous Intraepithelial Lesions in Young Women. *J Low Genit Tract Dis [Internet]*. 2018 Jul [cited 2018 Jul 16];22(3):212–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29762428>
126. Sykes P, Innes C, Harker D, Whitehead M, van der Griend R, Lawton B, et al. Observational Management of CIN 2 in Young Women. *J Low Genit Tract Dis [Internet]*. 2016 Oct [cited 2018 Jul 17];20(4):343–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27482796>
127. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: Systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2006;367(9509):489–98.
128. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, Raifu a O, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ*. 2008;337(September 2008):a1284.
129. Naleway AL, Weinmann S, Krishnarajah G, Arondekar B, Fernandez J, Swamy G, et al. Pregnancy after treatment for cervical cancer precursor

- lesions in a retrospective matched cohort. *PLoS One*. 2015;10(2):1–11.
130. Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaidi M, Mitra A, Kalliala I, Martin-Hirsch P, et al. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *Bmj* [Internet]. 2016;i3633. Available from: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.i3633>
131. Pils S, Eppel W, Seemann R, Natter C, Ott J. Sequential cervical length screening in pregnancies after loop excision of the transformation zone conisation: A retrospective analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2014;121(4):457–62.
132. Crane JMG, Delaney T, Hutchens D. Transvaginal ultrasonography in the prediction of preterm birth after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*. 2006;107(1):37–44.
133. L. S, A. S, W. W, M. E, J. W, L. M. Treatment for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Risk of Preterm Delivery. *J Am Med Assoc* [Internet]. 2004;291(17):2100–6. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&N EWS=N&AN=2004197108>
134. Jin G, Lanlan Z, Li C, Dan Z. Pregnancy outcome following loop electrosurgical excision procedure (LEEP) a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;289(1):85–99.
135. Bevis KS, Biggio JR. Cervical conization and the risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2011;205(1):19–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2011.01.003>
136. Jakobsson M, Gissler M, Paavonen J, Tapper A-M. Loop electrosurgical

- excision procedure and the risk for preterm birth. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2009;114(3):504–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701027>
137. Jančar N, Mihevc Ponikvar B, Tomšič S. Cold-knife conisation and large loop excision of transformation zone significantly increase the risk for spontaneous preterm birth: A population-based cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;203:245–9.
138. Mittal S, Ghosh I, Banerjee D, Singh P, Biswas J, Nijhawan R, et al. Reproducibility of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis on histological review of cervical punch biopsies from a visual inspection with acetic acid and HPV detection-based screening program. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2014;126(3):227–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2014.03.037>
139. Gage J, Schiffman M, Hunt W, Joste N. Cervical Histopathology Variability Among Laboratories: A Population-Based Statewide Investigation Julia. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(3):330–5.
140. Palma PD, Rossi PG, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B, Gilioli E, et al. The Reproducibility of CIN Diagnoses Among Different Pathologists: Data From Histology Reviews From a Multicenter Randomized Study. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2017 Dec 3];132(1):125–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864243>
141. ANA CLAUDIA GUEDES¹, LUIS CARLOS ZEFERINO² KJS and SMFB. Short-term Outcome of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2: Considerations for Management Strategies and Reproducibility of Diagnosis.

142. Stoler MH, Ronnett BM, Joste NE, Hunt WC, Cuzick J, Wheeler CM, et al. The Interpretive Variability of Cervical Biopsies and Its Relationship to HPV Status. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2015;39(6):729–36. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25602796>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4428379>
143. De Freitas AC, Coimbra EC, Leitão M da CG. Molecular targets of HEPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2014.
144. CINtec Histology Interpretation guide for.
145. Roche. CINtec® Plus: Interpretation Guide. Available from:
http://www.ventana.com/documents/CINtecPLUSCytology_IG_6.pdf
146. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16^{INK4a} immunocytochemistry in cervical histopathology and cytology: An update of recent developments. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2017 Dec 3];136(12):2741–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740700>
147. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*. 2009.
148. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2004

- Aug [cited 2017 Nov 12];13(8):1355–60. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298958>
149. Finegan MM, Han AC, Edelson MI, Rosenblum NG. p16 expression in squamous lesions of the female genital tract. *J Mol Histol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2017 Nov 12];35(2):111–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328914>
150. Kurshumliu F, Thorns C, Gashi-Luci L. p16INK4A in routine practice as a marker of cervical epithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2017 Nov 12];115(1):127–31. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825809004582>
151. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, von Knebel Doeberitz M, Arbyn M. p16INK4a Immunohistochemistry in Cervical Biopsy Specimens: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Interobserver Agreement. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2017 Nov 20];142(6):767–72. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCP3TPHV4TRIZEK>
152. Genovés J, Alameda F, Mancebo G, Solé JM, Bellosillo B, Lloveras B, et al. Human papillomavirus detection and p16INK4a expression in cervical lesions: A comparative study. *Hum Pathol*. 2014;
153. Cortecchia S, Galanti G, Sgadari C, Costa S, De Lillo M, Caprara L, et al. Follow-up Study of Patients With Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 1 Overexpressing p16 Ink4a.
154. Bastos L, Da Costa E, De R, Triglia M, Franc MC, Junior A, et al. p16 INK4a expression as a potential marker of low-grade cervical intraepithelial neoplasia progression.

155. Negri G, Bellisano G, Zannoni GF, Rivasi F, Kasal A, Vittadello F, et al. p16ink4a and HPV L1 Immunohistochemistry is Helpful for Estimating the Behavior of Low-grade Dysplastic Lesions of the Cervix Uteri. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2017 Nov 12];32(11):1715–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769337>
156. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, et al. P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* [Internet]. 2004 Dec 9 [cited 2017 Nov 12];445(6):616–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480761>
157. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, et al. Immunohistochemical expression of p16INK4a is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* [Internet]. 2006 Mar 13 [cited 2017 Dec 3];19(3):384–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415792>
158. Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Hum Pathol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2017 Nov 12];42(7):1007–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315414>
159. Nishio S, Fujii T, Nishio H, Kameyama K, Saito M, Iwata T, et al. p16INK4a immunohistochemistry is a promising biomarker to predict the outcome of low grade cervical intraepithelial neoplasia: comparison study with HPV genotyping. *J Gynecol Oncol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2017 Nov 12];24(3):215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23875070>

160. del Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A, et al. Value of p16INK4a as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;
161. Hariri J, ??ster A. The Negative Predictive Value of p16INK4a to Assess the Outcome of Cervical Intraepithelial Neoplasia 1 in the Uterine Cervix. *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 2007 Jul [cited 2017 Nov 12];26(3):223–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581402>
162. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol [Internet]*. 2000;182(3):311–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653597><http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4652%28200003%29182%3A3%3C311%3A%3AAID-JCP1%3E3.0.CO%3B2-9>
163. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, et al. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol [Internet]*. 2008;19(3):162. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3802/jgo.2008.19.3.162>
164. Kruse AJ, Baak JPA, De Bruin PC, Van De Goot FRW, Kurten N. Relationship between the presence of oncogenic HPV DNA assessed by polymerase chain reaction and Ki-67 immunoquantitative features in cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol*. 2001;195(5):557–62.
165. Bulten J, van der Laak JA, Gemmink JH, Pahlplatz MM, de Wilde PC, Hanselaar AG. MIB1, a promising marker for the classification of cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol [Internet]*. 1996 Mar [cited 2017 Dec

3];178(3):268–73. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-9896%28199603%29178%3A3%3C268%3A%3AAID-PATH482%3E3.0.CO%3B2-4>

166. Kruse A-J, Baak JP a, Janssen E a, Kjellefold K-H, Fiane B, Lovslett K, et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol [Internet]*. 2004;26(1–2):13–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371653>
167. Solé-Sedeno JM, Mancebo G, Miralpeix E, Lloveras B, Bellosillo B, Alameda F, et al. Utility of Human Papillomavirus Genotyping in the Management of Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. *J Low Genit Tract Dis [Internet]*. 2018 Jan [cited 2018 Jul 25];22(1):13–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29271851>
168. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2012 Aug 1 [cited 2017 Dec 3];18(15):4154–62. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-12-0270>
169. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, European CINtec Cytology Study Group. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol [Internet]*. 2011 Jun 25 [cited 2017 Dec 3];119(3):158–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncy.20140>

170. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2017 Dec 3];121(3):505–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825811001533>
171. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer AL, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of P16INK4a and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma pilot studies. *Cancer Cytopathol*. 2012;
172. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. p16^{INK4a} immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2012 Oct 25 [cited 2017 Dec 3];120(5):294–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700382>
173. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, Fraschini M, Senes G, Faa G, et al. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2017 Dec 3];138(5):652–6. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCP00INMGIFYFNQ>
174. Waldstrøm M, Christensen RK, Ornskov D. Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol*. 2013;
175. Carozzi F, Confortini M, Palma PD, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco

- L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2017 Dec 3];9(10):937–45. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783988>
176. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Dec 3];14(2):168–76. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261355>
177. Uijterwaal MH, Witte BI, Kemenade FJ Van, Rijkaart D, Ridder R, Berkhof J, et al. Triaging borderline and mild dyskaryotic Pap cytology with p16 and Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. 2014;
178. Calil LN, Edelweiss MIA, Meurer L, Igansi CN, Bozzetti MC. P16INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract*. 2014;
179. Ostor A. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Int Society Gynecol Pathol*. 1993;
180. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, Aaltonen R, Cárdenas J, Hernández, et al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-

- analysis. *BMJ* [Internet]. 2018 Feb 27 [cited 2018 Jul 25];k499. Available from: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.k499>
181. Wright Jr. TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women With Abnormal Cervical Screening Tests. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2007;11(4):201–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17917566
182. Discacciati MG, De Souza CAS, D’Otaviano MG, Ângelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH, et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;155(2):204–8.
183. Bory J-P, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, et al. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: A longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* [Internet]. 2002 Dec 10 [cited 2018 Jul 25];102(5):519–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432556>
184. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, for the ALTS Group. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2004 Nov [cited 2018 Jul 25];191(5):1590–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547529>

185. Louwers JA, Kocken M, Van Der Bijl JC, Berkhof J, Snijders PJF, Meijer CJLM, et al. Colposcopic Characteristics of High-Risk Human PapillomavirusYRelated Cervical Lesions.
186. Del Pino M, Torne A, Alonso I, Mula R, Masoller N, Fuste V, et al. Colposcopy Prediction of Progression in Human Papillomavirus Infections With Minor Cervical Lesions.
187. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies.
188. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16(INK4a) immunocytochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J cancer* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2017 Nov 12];136(12):2741–51. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28900>
189. Guedes A, Brenna S, COELHOy S, MARTINEZz E, Syrj Nen K, ZEFERINOk L. p16 INK4a Expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2.
190. Miralpeix E, Genovés J, SoléSedeño JM, Mancebo G, Lloveras B, Bellosillo B, et al. Usefulness of p16 INK4a staining for managing histological highgrade squamous intraepithelial cervical lesions. *Mod Pathol Adv online Publ*. 2016;doi(10):1–7.
191. Miyamoto S, Hasegawa J, Morioka M, Hirota Y, Kushima M, Sekizawa A. The association between p16 and Ki-67 immunohistostaining and the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2016;134(1):45–8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.12.005>

192. al-Saleh W, Delvenne P, Greimers R, Fridman V, Doyen J, Boniver J. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1995 Aug [cited 2018 Apr 30];104(2):154–60. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7639189>
193. Portari E a, Russomano FB, de Camargo MJ, Machado Gayer CR, da Rocha Guillobel HC, Santos-Rebouças CB, et al. Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2013;32(5):501–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896712>
194. Kruse A-J, Skaland I, Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2018 Jul 25];23(2):100–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084837>
195. Baak JPA, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EAM, Van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol*. 2006;59(10):1017–28.
196. Baak JPA, Kruse A-J, Janssen E, van Diermen B. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cell Oncol* [Internet]. 2005 [cited 2018 Jul 25];27(5–6):277–80. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373961>
197. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2007 Jul [cited 2018 Jul 25];7(7):453–9. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309907701585>
 198. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Jul 25];53 Suppl 1:S12-21. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091743511003069>
 199. OTERO-MOTTA AP, ORDÓÑEZ JL, GONZÁLEZ-CELADOR R, RIVAS B, GARCÍA MACÍAS MDC, BULLÓN A, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *APMIS* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Jul 25];119(3):204–15. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284738>
 200. Mateos Lindemann ML, Sánchez Calvo JM, Chacón de Antonio J, Sanz I, Diaz E, Rubio MD, et al. Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain: Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Adv Prev Med* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jul 25];2011:1–4. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/apm/2011/269468/>
 201. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE,

- Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2018 Jul 25];11(11):1048–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952254>
202. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2005 Jul 20 [cited 2018 Jun 17];97(14):1072–9. Available from: <http://academic.oup.com/jnci/article/97/14/1072/2521312/The-Elevated-10Year-Risk-of-Cervical-Precancer-and>
203. Gage JC, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Castle PE, et al. Risk of precancer determined by HPV genotype combinations in women with minor cytologic abnormalities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2018 Jun 17];22(6):1095–101. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-12-1455>

9. ANNEXES

ANNEXE 1: APROVACIÓ DEL COMITÈ ÈTIC



Informe del Comitè Ètic de Investigació Clínica

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

CERTIFICA

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

Que adjunta documento de consentimiento informado.

Y que considera que:

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

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

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

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

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

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

Firmado 
Doña M^a Teresa Navarra Alcrudo

ANNEXE 2: CONSENTIMENT INFORMAT

Consentimiento Informado para la participación en el estudio CIN2 - NK

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

Apellidos y nombre de la paciente	Fecha Nacimiento	Código

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

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

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

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

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

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

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

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

Firma del médico responsable	Fecha (escrita a mano)

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

La paciente recibe un duplicado firmado

Consentimiento Informado para la participación en el estudio CIN2 - NK

<p>Médico responsable:</p> <p>Dirección:</p>

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

Estimada paciente:

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

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

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

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

Ejecución del estudio

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

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

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

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

Ventajas y riesgos de la participación en el estudio

Basándose en los resultados de este estudio clínico existe la posibilidad de desarrollar nuevos y mejores métodos de tratamiento conservador de las lesiones cervicales CIN-2. Usted como participante podría tener la ventaja de ahorrarse una intervención quirúrgica, que como hemos dicho anteriormente es sencilla y rápida, pero no deja de tener unas complicaciones agudas (sangrado, infección, estenosis de canal, perforación uterina y vesical) y a largo plazo (complicaciones obstétricas como parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, complicaciones neonatales), que podrían evitarse.

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

Sus derechos como paciente

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

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

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

Confidencialidad de los datos

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

ANNEXE 3: FULL DE RECOLLIDA DE DADES



FORMULARI DE RECOLLIDA DE DADES: CIN2-NK

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

?

NOM	
NHC	EDAT
ID	TELÈFON
PROFESSIÓ	ESTUDIS
RAÇA	ESTAT

?

ANTECEDENTS MÈDICS

MLT	
Imm.Supr.	TTX Imm.Supr.

ANTECEDENTS FAMILIARS

SEROLOGIES: Lues, Chlamidia, Herpes, VHB, VIH, CMV
--

?

HÀBITS TÒXICS

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

?

ANTECEDENTS GINECO-OBSTÈTRICS

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

?

EXPLORACIÓ FÍSICA 1ª VISITA

GE		VAGINA
CERVIX: Polip, Naboth, Eritroplasia, Leucoplaquia, Condiloma, Lesions violàcies, Leucorrea, atrofia, Erosió, Queratosi		
Data	Cito/Colposcopia/Bx	Resultat
?	?	?
?	?	?
?	?	?



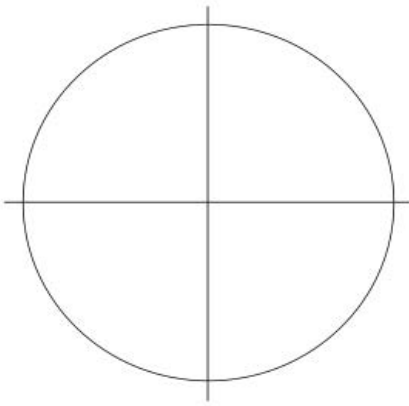
FORMULARI DE RECOLLIDA D'ADES: CIN2-NK

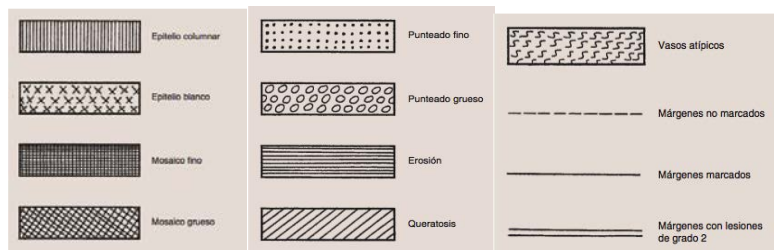
?

GE	VAGINA
CERVIX: Polip Naboth Britroplasia Leucoplaquia Condiloma Lesions Violàcies Leucorrea atrofia Erosió Queratosi	

?

COLPOSCÒPIA

<input type="checkbox"/> Colposcopia satisfactoria <input type="checkbox"/> Unió escamocolumnar <input type="checkbox"/> Exocervical <input type="checkbox"/> Endocervical Observacions normals <input type="checkbox"/> Epiteli escamoso originari <input type="checkbox"/> Trófico <input type="checkbox"/> Distrófico <input type="checkbox"/> Epiteli columnar <input type="checkbox"/> Zona de transformació normal Observacions anòmals <input type="checkbox"/> Epiteli fin blanc en reacció al àcid acètic <input type="checkbox"/> Mosaico regular <input type="checkbox"/> Punteado regular <input type="checkbox"/> Positivitat parcial al iodo <input type="checkbox"/> Àrea negativa al iodo <input type="checkbox"/> Epiteli gros blanc en reacció al àcid acètic <input type="checkbox"/> Mosaico irregular <input type="checkbox"/> Punteado irregular <input type="checkbox"/> Vasos atípicos <input type="checkbox"/> Sospecha de neoplasia invasiva <input type="checkbox"/> Pólipo <input type="checkbox"/> Endometriosis <input type="checkbox"/> Herpes <input type="checkbox"/> Queratosi <input type="checkbox"/> Fina <input type="checkbox"/> Gruesa <input type="checkbox"/> Inflamació <input type="checkbox"/> Condilomatosis <input type="checkbox"/> Tejido de granulación <input type="checkbox"/> Resultados terapéuticos <input type="checkbox"/> Erosión <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Atrófia	<input type="checkbox"/> Colposcopia insatisfactoria <input type="checkbox"/> Unió escamocolumnar no completament visible <input type="checkbox"/> Cuello uterino no visible <input type="checkbox"/> Inflamación grave <input type="checkbox"/> Atrófia grave  Biopsia <input type="checkbox"/> Exocérvix <input type="checkbox"/> Endocérvix <input type="checkbox"/> Vagina Fotograma <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> Cuello uterino <input type="checkbox"/> Vagina
--	--



Impressió Diagnòstica	?
Biòpsia	?

?

ANNEXE 4: CHECK-LIST DEL FICOLL



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

Código paciente: CIN2-NK
Fecha
Operador
Lugar de trabajo

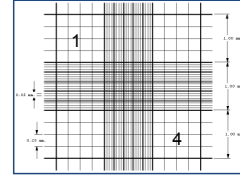
Check-list previo procedimiento:

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

Check-list real time:

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

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



$$\frac{\text{c\u00e9ls campo 1} + \text{c\u00e9ls campo 3}}{2} = \text{c\u00e9ls} / \text{campo} \cdot \text{dil. azul} \cdot 10^4 = \text{c\u00e9ls/mL} \cdot 10^6 \text{ mL} = \text{c\u00e9ls Totales}$$

- ❑ 22. Durante la centrifugación rotular los criotubos:
 - Lateral: CIN2-NK / Código pct / nº tubo / fecha
 - Tapón: Código pct / nº tubo
 - Tubo 1: CIN 2_NK 5·10⁶ céls – Ester (.....µL)
 - Tubo 2: CIN 2_NK ·10⁶ céls – Ester (.....µL)
 - Tubo 3: CIN 2_NK ·10⁶ céls – Ester (.....µL)
 - Tubo 4: CIN 2_NK ·10⁶ céls – Ester (.....µL)
 - Tubo 5: CIN 2_NK (Genética)
- ❑ 23. Resuspender pellet con 1mL suero FBS.
- ❑ 24. Introducir gota a gota 1mL suero con DMSO al 20% almacenado a 4°C.
- ❑ 25. Repartir muestra en los distintos microtubos según rotulación.
- ❑ 26. Colocar criotubos en “quesito” isopropanol. céls/campo
- ❑ 27. Colocar “quesito” en congelador “A” a -80°C (3ª planta PRBB, laboratorio UPF) durante un mínimo de 12 horas (-1°C/min).
- ❑ 28. Entrega de la check-list al supervisor.

Eventualidades a comentar:

.....

.....

.....

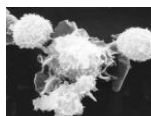
.....

.....

.....

.....

ANNEXE 5: CHECK-LIST DE LA CITOMETRIA DE FLUX



IMMUNOLOGIA

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

DESCONGELACIÓN-CITOMETRÍA DE FLUJO

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

Check-list previo procedimiento:

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

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

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

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

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

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

Eventualidades a comentar:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Evolució de la classificació de les lesions premalignes de cèrvix.	17
Taula 2. Sistema de classificació de la citologies cervical Bethesda 2001.	18
Taula 3. Evolució de les displàsies cervicals segons Olson (18)	28
Taula 4. Virus alt i baix risc. Lancet Oncol 2009 A review of human carcinògens. Bouvard V (29).	31
Taula 5. Incidència de CCU per edats segons Bernard (67).....	38
Taula 6. Risc acumulat en 5 anys de CIN3+ i càncer segons Katki 2013	39
Taula 7. distribució de genotips de VPH segons HSIL i CCU segons Cliffton i col.	43
Taula 8. distribució de VPH-16 i altres HR-HPV a lesions d'alt grau(86)	44
Taula 9. Distribució dels genotips de VPH en el SCC i Adenocarcinoma de Bosch i col.(31)	45
Taula 10. distribució de genotips en ASC-US i LSIL i Alt Grau segons Delgado i col.(32).	45
Taula 11. Risc de càncer invasor segons el tipus de VPH (87).....	46
Taula 12. Incidència acumulada de CIN-3+ als 10 anys. Cercles negres VPH-16, cercles blancs VPH-18, triangles negres VPH-no16-no18, triangles blancs VPH negatiu(88).	47
Taula 13. Risc acumulat als 18 mesos per a CIN-2+ segons genotip VPH i citologia (90).	48
Taula 14. Resum de de tests per a detecció VPH+.	49
Taula 15. Resum de tests aprovats per la FDA.....	53
Taula 16. Algoritme de criatge de càncer de cèrvix amb evidència científica.	58
Taula 17. Terminologia colposcòpica del coll uterí de IFCPC 2011	67
Taula 18. Resum estudis amb maneig conservador del CIN-2	70
Taula 19: Característiques socio-demogràfiques de la mostra a estudi	107
Taula 20. Tipus de ZT i de patró colposcòpic	108
Taula 21. Diagnòstic colposcòpic i tamany de la lesió	109
Taula 22. Tipus de citologia del criatge estratificada segons l'evolució de la seva lesió subjacent	110
Taula 23. Prevalença d'infecció per VPH en lesions CIN-2.....	110
Taula 24. Prevalença d'infecció de VPH-16 en lesions CIN-2	110
Taula 25. Prevalença d'infecció per VPH-18 en lesions CIN-2.....	111
Taula 26. Prevalença d'infecció per VPH-no16no18 en lesions CIN-2	111
Taula 27. Factors socio-demogràfics segons l'expressió de p16.....	112
Taula 28. Factors socio-demogràfics segons l'expressió de Ki-67.....	113
Taula 29. Evolució de les lesions CIN-2 a l'any de seguiment.	114
Taula 30. Evolució de les lesions CIN-2 segons variables epidemiològiques	115
Taula 31. Relacions estadístiques de les variables epidemiològiques respecte l'evolució del CIN- 2, per a persistència i evolució a CIN-3.	116
Taula 32. Relació entre factors colposcòpics i l'evolució de la lesió CIN-2	117
Taula 33. Relació entre el tipus de citologia de criatge i l'evolució del CIN-2.	118
Taula 34. Evolució de les lesions CIN-2 segons citologia d'alt risc o no alt risc.	118
Taula 35. Relació entre infecció per HR-HPV i evolució del CIN-2.	119
Taula 36. Relació entre infecció per VPH-16 i evolució del CIN-2.....	120
Taula 37. Relació entre infecció per VPH-18 i evolució del CIN-2.....	120
Taula 38. Relació entre infecció per VPH-no16-no18 i evolució del CIN-2.	121

Taula 39. Evolució de la lesió CIN-2 segons l'expressió de la p16.....	122
Taula 40. Distribució de l'expressió de p16 segons grups d'evolució de CIN-2	122
Taula 41. Distribució en terços de l'expressió de la p16 i la seva evolució.....	123
Taula 42. Expressió del Ki-67 i relació amb l'evolució a l'any de la lesió	124
Taula 43. Distribució de la Ki-67 amb simplificació de l'evolució de la lesió CIN-2	125
Taula 44. Distribució en terços de l'expressió de la Ki-67 i la seva evolució.....	125
Taula 45. Distribució de la Ki-67 segons alt o baix risc i amb simplificació de l'evolució de la lesió CIN-2	126
Taula 46. Estudis sobre l'evolució del CIN-2 fins el 2018.....	132

ÍNDIX DE GRÀFICS

Gràfic 1. Incidència i mortalitat de CCU mundial. CANCERTODAY. http://gco.iarc.fr	13
Gràfic 2. Incidència mundial de CCU en els anys. CANCERTODAY. http://gco.iarc.fr	14
Gràfic 3. Evolució de les lesions CIN-2 a l'any de seguiment	114

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Història Natural del VPH. AEPCC.	27
Figura 2. Arbre genealògic VPH (25).	32
Figura 3. estructura genètica VPH. (31)	33
Figura 4. Història natural de la infecció per VPH i el càncer de cèrvix per Schiffman.	37
Figura 5. Algoritme de cribatge de càncer de cèrvix. Oncoguías SEGO 2014(1).....	57
Figura 6. Algoritme actuació davant ASC-US (1).	60
Figura 7. Algoritme actuació davant ASC-H (1).	61
Figura 8. Algoritme actuació davant L-SIL (1).....	63
Figura 9. Algoritme actuació davant H-SIL (1).....	64
Figura 10. Algoritme actuació CIN-2/3 SEGO (1).....	74
Figura 11. Funció de p16, pRb i E2F en cicle cel•lular normal(143).....	81
Figura 12. Funció de p16, pRb i E2F en transformació oncogènica (143)(144)).	82
Figura 13. Diagrama de flux del reclutament de les pacients.	106

ÍNDEX D'IMATGES

Imatge 1. Citologia convencional normal amb tinció de Papanicolau. www.eurocytology.eu ..	21
Imatge 2. Aspecte citologia: a) LSIL, i b) c) HSIL. www.eurocytology.eu	23
Imatge 3 Aspecte cèrvix en aplicar àcid acètic i mostrar un patró acetoblanc.....	24
Imatge 4. Biòpsia de CIN-1. www.eurocytology.eu	25
Imatge 5. Imatge 3. Biòpsia de CIN-2. www.eurocytology.eu	26
Imatge 6. Biòpsia de CIN-3. www.eurocytology.eu	26
Imatge 7. Tècnica captura d'híbrids. www.papillomavirus.cz/eng/diagnosis_kits_hybrid.html	51
Imatge 8. Imatge d'una colposcòpia amb ZT normal amb aplicació d'àcid acètic (dreta) i de lugol (esquerra).	66
Imatge 9. Esquerra epiteli cervical amb tinció hematoxilina-eosina. Dreta tinció per a p16INK4a.	82
Imatge 10. Seccions de teixit cervical positiu per a immunohistoquímica per a Ki-67.....	84