



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

PATOLOGÍA CERVICAL “Valor predictivo de la
técnica inmunocitoquímica p16/ki67 para detectar
lesión CIN2+ subyacente”

D^a. María Amparo Torroba Carón

2015

**PATOLOGÍA CERVICAL “VALOR PREDICTIVO DE LA TÉCNICA DUAL
P16/KI-67 PARA DETECTAR LESIÓN CIN2+ SUBYACENTE”**

Tesis doctoral presentada por:

M^a Amparo Torroba Carón

Tutor doctorado:

Dr. Anibal Nieto Díaz

Directores de tesis:

Dr. Anibal Nieto Díaz

(doctor en Ginecología y Obstetricia)

Dr. Enrique Poblet Martínez

(doctor en Anatomía Patológica)

AGRADECIMIENTOS

Aún hoy me pregunto...¿tenía necesidad ahora, después de que hace 20 años comencé mi residencia y trabajo en Anatomía Patológica, que tengo plaza en propiedad hace 10 años y que además desarrollo una gran parte del trabajo diario sobre todo en el área de la Ginecopatología (que me encanta) para ahora dedicar un tiempo largo y tedioso a la consecución de la TESIS DOCTORAL?

Tengo claro que muchas han sido mis motivaciones, que nunca debemos dejar de tenerlas, pero que principalmente ha sido mi familia: por un lado, mi PADRE, al que dicen que soy idéntica, y que aún hoy inmerso en su proceso neurodegenerativo todavía me dice..”un día de estos vas a darnos una sorpresa..”, y por eso a él se la dedico; y cómo no, a mis tres HIJAS (M^a Amparo, María y Paula) que sepan que la vida es esfuerzo y trabajo y que ojalá se preparen y puedan desarrollarse en aquello que les haga felices, para que trabajen con ilusión y cada día sea un regalo.

Por eso, quiero empezar agradeciéndole a mi tutor-director dr. Anibal Nieto su apoyo cuando le comenté que quería hacer la tesis, y sus palabras de ánimo y de admiración que siempre me ha dedicado; y cómo no a mi otro director y “colega” dr. Enrique Poblet, que siempre me ha contestado, ayudado y corregido, tanto en contenido como en forma de la tesis.

Y mil gracias a mi compañero y amigo dr. Antonio Moreno Docón por su involucración en mi tesis, por su hasta “impertinente” insistencia en que debía hacerla ya, por su trabajo desinteresado en el genotipado viral de mis muestras en parafina, y por su apoyo documental en todo lo referente al proceso de preparación-defensa de tesis doctoral. Espero que el resultado haya sido de tu agrado y que no te haya defraudado.

También agradezco al resto del tribunal que hayan aceptado compartir conmigo el final del proceso del doctorado. Para mi es un honor que doctores tan renombrados hayan podido evaluar mi trabajo.

No quiero dejar de agradecer a todos mis compañeros del servicio de Anatomía Patológica del HCUVA, a las citotécnicas que han hecho la lectura de todas y cada una

de las citologías y, sobre todo, a mis técnicos y amigas Pilar Vicente y Charo Martínez, por su trabajo desinteresado, rápido y eficaz que para mis muestras han tenido. A mi gran maestro en la citología cérvico-vaginal dr. Joaquín Sola, mil gracias.

Por último, agradecer a mi marido José Antonio su paciencia conmigo todo este último año, su apoyo tecnológico-informático, y sus palabras siempre acertadas para cuando yo decía:..¿para qué esto?.

Muchas gracias DIOS MÍO, todo te lo debo a tí.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	XIII
RESUMEN DE LA TESIS.....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Importancia del cáncer de cérvix uterino.....	3
I.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)	5
I.2.1.Etiología, patogenia y oncogénesis.....	5
I.2.2.Epidemiología e historia natural.....	10
I.2.3.Diagnóstico de VPH.....	15
I.3. Diagnóstico de lesiones preneoplásicas. BETHESDA 2001.....	16
I.3.1.Historia.....	16
I.3.2.Criterios mínimos de celularidad.....	20
I.3.3.Células escamosas atípicas.....	20
I.4. Métodos de cribado del cáncer de cuello uterino	25
I.4.1.Citología cervicovaginal: convencional y líquida	34
I.4.2.Métodos de detección de VPH	38
I.4.3.Técnicas moleculares	43
I.5. Histopatología de la infección VPH cervical	55
I.6. Variables estadísticas a evaluar	60
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	63
II.1.Hipótesis de trabajo	65
II.2.Objetivos de la tesis	65

III.MATERIAL Y MÉTODOS	67
III.1. Población de nuestro estudio	69
III.2. Objetivo principal	73
III.2.1. Pacientes incluídas en el estudio	73
III.2.2. Muestras citológicas	74
III.2.2.1. Recogida de las muestras	75
III.2.2.2. Procesamiento:enriquecimiento	76
III.2.2.3. Preparación y tinción	77
III.2.2.4. Lectura y diagnóstico citológico	79
III.2.3. Realización de la técnica dual p16/ki-67	79
III.3. 2º OBJETIVO.....	85
III.3.1. Pacientes incluidas en el estudio.....	85
III.3.2. Detección de ADN viral	86
III.4. 3º OBJETIVO	89
III.4.1. Diseño del estudio	89
▪ Consideraciones previas para extracción de ácidos nucleicos	89
▪ Extracción manual del ADN del VPH	91
III.5. Análisis estadístico de los casos	99
IV.RESULTADOS	101
▪ Distribución de diagnósticos citológicos	103
▪ Estudios realizados con técnica dual p16/ki67	104
▪ Estudios de VPH realizados	106
IV.1. OBJETIVO PRINCIPAL	108
IV.1.1. Relación técnica dual-resultado citológico	108
IV.1.2. Relación técnica dual-biopsia	
Evaluación diagnóstica para determinar CIN2+	114
IV.1.2.1. Según grupos de edad	117
IV.1.2.2. Según diagnóstico citológico (ASC o LSIL)	119
IV.1.2.3. Según resultado citológico y edad	122

IV.2. 2° OBJETIVO	124
IV.2.1. Determinación viral VPH-AR y resultado citológico	125
IV.2.2. Relación entre determinación viral-biopsia.	
Evaluación diagnóstica de la determinación VPH-AR	127
IV.2.2.1. Por grupos de edad	130
IV.2.2.1. Según diagnóstico citológico	132
IV.2.2.2. Según resultado citológico y grupo de edad	134
IV.2.3. Comparación entre ambas técnicas: DUAL Y VPH-AR	137
IV.2.4. Resultados de concordancia entre los métodos evaluados	141
IV.3. 3° OBJETIVO	143
IV.3.1. Prevalencia de VPH-AR en infección única o múltiple	143
IV.3.2. Frecuencia de los distintos genotipos en biopsias CIN2+	144
IV.3.3. Relación genotipo viral y positividad para la técnica dual	146
V. DISCUSIÓN	149
▪ Distribución de las muestras totales según resultado citológico	151
V.1. OBJETIVO PRINCIPAL	155
V.1.1. Tasa de positividad de lesiones ASC/LSIL para lesiones CIN2+	155
V.1.2. Tasa de positividad de la técnica dual para lesiones CIN2+:	
global, para LSIL y para ASC, respectivamente	157
V.1.3. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la técnica dual para lesiones	
CIN2+, para LSIL y para ASC	160
V.1.4. Discusión sobre falsos negativos (F.N.)	163
V.1.5. Discusión sobre falsos positivos (F.P.)	165
V.2. 2° OBJETIVO	168
▪ Prevalencia del VPH en nuestro estudio	168
V.2.1. Tasa de positividad de la determinación viral para CIN2+	169
V.2.2. Comparativa de ambas técnicas (dual y determinación viral)	170
V.2.3. Concordancia entre los dos métodos evaluados	173

V.3.	3° OBJETIVO	174
	V.3.1. Prevalencia de genotipos en las biopsias CIN2+	174
	V.3.2. Relación entre técnica dual y los diferentes genotipos	181
VI.	CONCLUSIONES	183
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187

INDICE DE TABLAS

- * Tabla 1. Recomendaciones de cribado de las Guías de la ASCCP, ACS y ASCP, 2012 (65)
- * Tabla 2. Pruebas para la detección de VPH aprobadas por la FDA para su utilización en el cribado poblacional (18)
- * Tabla 3. Procedencia de las pacientes
- * Tabla 4. Número de pacientes según nº estudios con técnica dual p16/ki-67
- * Tabla 5. Casos de ASC/LSIL seleccionados
- * Tabla 6. Resultados de técnica dual según resultado citológico
- * Tabla 7. Clasificación riesgo oncogénico según Dunne et al (185)
- * Tabla 8. Número de pacientes y muestras incluidas en cada uno de los estudios realizados en el presente trabajo
- * Tabla 9. Distribución de las muestras según resultado citológico
- * Tabla 10. Distribución de las muestras en T.T. o C.L.
- * Tabla 11. Criterios de selección de las pacientes en el estudio
- * Tabla 12. Tabla de contingencia Tinción dual vs Citología
- * Tabla 13. Odds ratio y Riesgo Relativo
- * Tabla 14. Tabla de contingencia Tinción dual vs Citología por grupos de edad
- * Tabla 15. Odds ratio y Riesgo Relativo por grupos edad
- * Tabla 16. Tabla de contingencia Biopsia vs Citología
- * Tabla 17. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual
- * Tabla 18. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+
- * Tabla 19. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual por grupos de edad
- * Tabla 20. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+ por grupos de edad
- * Tabla 21. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual por diagnósticos citológicos
- * Tabla 22. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+ por diagnósticos citológicos

- * Tabla 23. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual por grupos de edad y por diagnósticos citológicos
- * Tabla 24. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual por grupos de edad y por diagnósticos citológicos
- * Tabla 25. Tabla de contingencia VPH-AR vs Citología
- * Tabla 26. Odds ratio y Riesgo Relativo
- * Tabla 27. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR
- * Tabla 28. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+
- * Tabla 29. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR
- * Tabla 30. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ por grupos de edad
- * Tabla 31. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR para ASC y para LSIL
- * Tabla 32. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ para ASC y para LSIL
- * Tabla 33. Tabla de contingencia biopsia vs tinción dual por diagnósticos citológicos y por edad
- * Tabla 34. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ para ASC y LSIL, por edad
- * Tabla 35. Comparación técnica dual p16/ki-67 y VPH para detección de CIN2+
- * Tabla 36. Concordancia entre técnica dual p16/ki-67 y determinación de VPH-AR de manera global
- * Tabla 37. Concordancia entre técnica dual p16/ki-67 y determinación de VPH-AR , en los diagnósticos ASC
- * Tabla 38. Concordancia entre técnica dual p16/ki-67 y determinación de VPH-AR , en los diagnósticos LSIL
- * Tabla 39. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR
- * Tabla 40. Frecuencia de los distintos genotipos en biopsias CIN2+
- * Tabla 41. Positividad de la tinción dual (%) según genotipos
- * Tabla 42. % de categorías anómalas en CML en distintas series
- * Tabla 43. Tasas de positividad de ASC/LSIL para lesión CIN2+ de las principales series

- * Tabla 44. Tasas de positividad de la tinción dual en ASC/LSIL en las series más importantes
- * Tabla 45. Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN de la tinción dual p16/ki-67 para la detección de neoplasia cervical intraepitelial de grado 2 o más en las series publicadas
- * Tabla 46. Sensibilidad y Especificidad según ASC/LSIL en las series principales
- * Tabla 47. N^o de ASC/LSIL de Falsos positivos (FP) según resultado de biopsia
- * Tabla 48. N^o de casos de VP, FN, FP, VN, sensibilidad y especificidad en las principales series
- * Tabla 49. Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN de la determinación viral VPH-AR para la detección de neoplasia cervical intraepitelial de grado 2 o más en las series publicadas
- * Tabla 50. Comparación de sensibilidades y especificidades entre la técnica dual y la determinación viral VPH-AR en las distintas series

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismos de la carcinogénesis cervical por VPH (modificado de 6)
- Figura 2. Genoma del VPH
- Figura 3. Modelo de oncogénesis (modificado de 25)
- Figura 4. Prevalencia de VPH en mujeres con citología normal, con CI95% (tomada de 2)
- Figura 5. Carga de enfermedad cervical asociada al VPH en España (18)
- Figura 6. Incidencia del cáncer cervical comparado con otros cánceres en mujeres de todas las edades en España (2)
- Figura 7. Historia natural de la infección por VPH (modificado de 27)
- Figura 8. Clasificación de ensayos para determinación de VPH (13)
- Figura 9. Cuadro comparativo de clasificaciones de anomalías del epitelio cervical
- Figura 10. Clasificación de Bethesda 2001 (46)
- Figura 11. ASCUS (x20) y criterios morfológicos
- Figura 12. ASC-H (x20) y criterios morfológicos
- Figura 13. ASC-H
- Figura 14. HSIL
- Figura 15. LSIL (x20): “coilocitos”(47)
- Figura 16. LSIL (x20)(47)
- Figura 17. Estrategia de cribado Consenso 2014 SEGO, AEPCC y SEAP.
- Figura 18. Método de recogida en CTT y en CML
- Figura 19. Mecanismo molecular de acción de la p16
- Figura 20. Célula positiva para tinción dual p16/ki67
- Figura 21. Algoritmo de actuación clínica en mujeres con prueba de detección del virus del papiloma humano positiva y citología negativa (18)
- Figura 22. Base científica o principio de procedimiento CINtec® PLUS
- Figura 23. Oncogénesis por VPH (modificada de 27)
- Figura 24. Probable manejo clínico de lesiones citológicas ASC+ con la introducción de test inmunocitoquímicos (modificada de 109)

- Figura 25. Cambios en la terminología y grados de lesiones precancerosas cervicales a lo largo de la historia (modificado de 165)
- Figura 26. Esquema de gradación de lesiones precursoras cervicales
- Figura 27. Displasia epitelial leve (CIN1)
- Figura 28. Displasia epitelial moderada (CIN2)
- Figura 29. Displasia epitelial severa (CIN3)
- Figura 30. Zona de transformación (1) y Unión Escamocolumnar (2) del epitelio cervical (modificado de 171)
- Figura 31. Áreas de Salud de la Región de Murcia (www.murciasalud.es/planificacion) (182)
- Figura 32. Mapa sanitario 2009 en áreas de Salud y zonas básicas de salud (www.murciasalud.es/planificacion)
- Figura 33. Método de recogida de la muestra cérvicovaginal (tomada de www.civagen.com)
- Figura 34. Recogida de la muestra y procesamiento. Esquema representativo que describe el método “BD Surepath” (modificado de www.bd.com)
- Figura 35 y 36. Controles positivos de la técnica dual
- Figura 37 y 38. Controles negativos de la técnica dual
- Figura 39. Célula positiva para la tinción dual p16/ki-67
- Figura 40. Resultados de la determinación de VPH-AR en las 146 pacientes
- Figura 41. Descripción de la técnica de captura híbrida
- Figura 42. Algunos oligonucleótidos usados como primers para PCR de VPH (modificado de 103)
- Figura 43. Esquema de las tres fases de la PCR (modificado de 184)
- Figura 44. Diagnósticos citológicos (n) ASC y LSIL a los que se les realiza la técnica dual p16/ki67
- Figura 45. Selección final de diagnósticos citológicos en las 306 pacientes
- Figura 46. % de estudios VPH realizados
- Figura 47. Ratio de positividad de la tinción dual p16/ki67 según resultado citológico
- Figura 48. Ratio de positividad de la tinción dual según edad y resultado citológico
- Figura 49. Diagnósticos histológicos (%) según resultados ASC/LSIL

- Figura 50. Distribución de biopsias según resultado de técnica dual
- Figura 51. N° de biopsias (%) según resultado de la técnica dual
- Figura 52. N° de biopsias (%) según técnica dual, para ASC y LSIL
- Figura 53. Distribución de biopsias por edad y citología LSIL según resultado de técnica dual (%).
- Figura 54. Prevalencia de VPH en nuestro estudio (%)
- Figura 55. Ratio de positividad de la determinación VPH-AR según resultado citológico (%)
- Figura 56. Distribución de biopsias según resultado de la determinación viral VPH-AR
- Figura 57. Distribución de biopsias según determinación VPH-AR, para <30 años y para ≥ 30 años
- Figura 58. Distribución de biopsias según determinación VPH-AR, para ASC y LSIL
- Figura 59. Distribución de biopsias por edad y citología LSIL según resultado de VPH-AR (%)
- Figura 60. Comparativa de evaluaciones diagnósticas entre técnica dual y determinación VPH-AR de manera global (ASC+LSIL)
- Figura 61. Comparativa de evaluaciones diagnósticas entre técnica dual y determinación VPH-AR para ASC
- Figura 62. Comparativa de evaluaciones diagnósticas entre técnica dual y determinación VPH-AR para LSIL
- Figura 63. Curva Roc
- Figura 64. Prevalencia de VPH-AR en infección única o múltiple
- Figura 65. Frecuencia de los distintos genotipos en biopsias CIN2+
- Figura 66. Frecuencia de tipos de VPH en lesión intraepitelial de alto grado (HSIL) (modificada de ICO Information centre on HPV and Cancer, fact sheet 2013)

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ACOG: Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos
- ACG+: atipia de células glandulares indeterminada o mayor
- AIS: Adenocarcinoma in situ
- ASC: atipia de células escamosas
- ASC+: atipia de células escamosas o mayor
- ASCUS: atipia de células escamosas de significado incierto
- ASC-H: atipia de células escamosas, no se puede descartar lesión de alto grado
- AEPCC: Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia
- ALTS: estudio para el triaje de las lesiones ASCUS-LSIL (ASCUS-LSIL Triage Study)
- ARC: agencia para la investigación del cáncer (Agency for Research of Cancer)
- ASCCP: Sociedad Americana de Patología cervical y colposcopia
- CAP: colegio americano de patólogos
- CCU: cáncer de cuello uterino
- CI: Intervalo de confianza
- CML: citología en medio líquido
- CIN: Neoplasia intraepitelial cervical
- CIN1: neoplasia intraepitelial cervical leve, grado 1
- CIN2: neoplasia intraepitelial cervical moderada, grado 2
- CIN2+: neoplasia intraepitelial cervical grado 2 o superior
- Ck7, ck17, ck18: citokeratinas de bajo peso molecular
- CTT: citología triple toma
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- E6: gen de expresión temprana 6 del virus del papiloma humano
- E7: gen de expresión temprana 7 del virus del papiloma humano
- FDA: agencia de drogas y alimentos (Food and Drug Agency)
- FN: falsos negativos (de la técnica dual, en realidad positivos)
- FP: falsos positivos (de la técnica dual, en realidad negativos)
- HC2: captura de híbridos 2
- HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- HRP: HorseRADish Peroxidase, peroxidasa de rábano

ICQ: inmunocitoquímica

KA: atipia coilocítica

LAST: Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization

LCR: long control region, o región reguladora

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

LSIL+: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado o mayor

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: razón de posibilidades (odds ratio)

Pg: picogramos

p53: proteína p53

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

pRB: proteína del retinoblastoma

RLU: unidades relativas de luz

Screening: cribado

SEC: Sociedad Española de Citología

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

TBS: Sistema de Bethesda

TEP: tejido embebido (incluido) en parafina

TEAP: técnico especialista en Anatomía Patológica

UGA: Las UGAs, ubicadas de forma descentralizada, están constituidas por ginecólogos, personal auxiliar de enfermería y en algunas ocasiones por enfermeras. En algunos casos, un edificio con centro de especialidades alberga varias UGAs y cada una de ellas depende funcionalmente del hospital de referencia.

VN: verdaderos negativos (en la técnica dual)

VP: verdaderos positivos (en la técnica dual)

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

WHO: OMS

**R
E
S
U
M
E
N**

El carcinoma de cérvix representa la tercera neoplasia más frecuente en el mundo en las mujeres y todavía constituye una de las causas principales de muerte en países en vías de desarrollo.

El virus del papiloma humano (VPH) es causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de esta neoplasia, puesto que casi todos los casos diagnosticados (99%) resultan positivos. Concretamente, el cáncer cervical está producido por un subtipo de VPH ano-genital conocido como VPH-AR, y hasta un 70% se debe a un subtipo especial: 16 y 18.

Está totalmente asumido que el screening periódico con el test de Papanicolau es efectivo en reducir la incidencia y mortalidad del cáncer cervical, aunque en ocasiones puede presentar baja sensibilidad.

Esta es la causa de que se emplee, como técnica alternativa o complementaria a la citología, la determinación de VPH-AR.

Sin embargo, la determinación de VPH-AR aporta baja especificidad, dado que la mayoría de infecciones por VPH son transitorias (hasta un 90% de las infecciones se aclaran en los dos primeros años). Debido a la alta prevalencia de infecciones por VPH en mujeres jóvenes, los tests de VPH no están recomendados para screening en menores de 30 años.

Nuestro estudio versará de cómo un marcador dual inmunocitoquímico (p16/ki67) puede indicar la desregulación del ciclo celular causado por oncoproteínas del VPH: E6 y E7. La proteína E7 que actúa bloqueando al gen del retinoblastoma (pRb) lo que hace aumentar mucho la sobreexpresión de p16, y la E6 que estimula la actividad proliferativa ki67 mediante la interferencia con p53.

OBJETIVOS:

El objetivo principal de esta tesis es:

- Comprobar si la tinción dual con biomarcadores p16^{INK4a} y Ki-67 que se expresan en las células de las citologías diagnosticadas de ASC y LSIL se asocia
 - ✓ Bien con lesión CIN2+ subyacente, o
 - ✓ Progresión en un período determinado a CIN2+

Una vez analizado el principal objetivo, podemos valorar también los siguientes objetivos secundarios:

- Comparar la tasa de positividad, sensibilidad y especificidad para citología con tinción dual versus determinación VPH-AR, para detectar lesiones CIN2+
- Ver qué relación guarda la positividad de la técnica dual p16/ki-67 con los distintos genotipos virales de alto riesgo, en los casos confirmados histológicamente como CIN2+. Asimismo determinaremos la frecuencia de los distintos genotipos en estas lesiones

METODOLOGÍA GENERAL

- **OBJETIVO PRINCIPAL:** Se seleccionaron 306 pacientes a las que se les realizó técnica dual inmunocitoquímica p16/ki-67. Tras su realización se valoró como positiva o negativa, existiendo algunos casos de no valorables. Se realizó siempre con controles positivos, interpretándose siempre por los mismos citopatólogos.

De las 306 muestras citológicas, el 50% de ellas se siguió de toma biopsica (estudios histológicos a 153 pacientes), con tres posibles diagnósticos: negativo para displasia (16), CIN1 (80) y CIN2+ (57).

- El “gold standard” es el diagnóstico histológico de CIN2+
- El seguimiento de las pacientes fue de 1 día hasta 30 meses en algún caso

- OBJETIVO N°2: A 146 pacientes de las 306 se les realizó además tests de VPH.

Desde la consulta de Ginecología se mandaba cepillo cervical para determinación de VPH por el método de captura híbrida (HC2), que de ser positivo para VPH-AR se seguía de un método de genotipado por PCR (Clart® HPV2). Estos estudios se llevaron a cabo en la Unidad de Virología del HCUVA.

- OBJETIVO N°3: De las 57 pacientes en las que se confirmaron histológicamente lesiones de CIN2+ se enviaron cortes de tejidos embebidos en parafina (TEP) a la unidad de virología para genotipado con PCR (método Clart®).

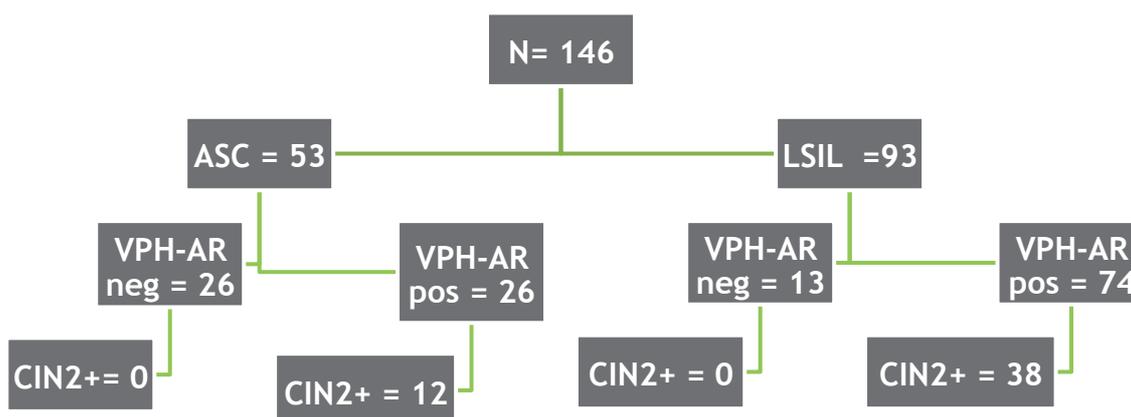
RESULTADOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

- Se realizaron 349 estudios de técnica dual ki67/p16 en 306 pacientes con diagnóstico de ASC y LSIL, resultando en general un aumento significativo de la sensibilidad para detectar lesión CIN2+ subyacente, manteniendo la alta especificidad que ya aportaba el test de papanicolaou por sí solo.
- Se observan leves diferencias en sensibilidad/especificidad entre los ASC y los LSIL

OBJETIVO N° 2:

Los resultados obtenidos en las 146 pacientes a las que se les realizó la determinación de VPH se resumen en la siguiente tabla:



Se observa, tanto en ASC como en LSIL, una similar sensibilidad entre ambos tests (técnica dual y determinación de VPH) para detectar lesión CIN2+

subyacente cercana al 90%, existiendo sin embargo una especificidad mayor para la técnica dual, estadísticamente significativa.

OBJETIVO N°3:

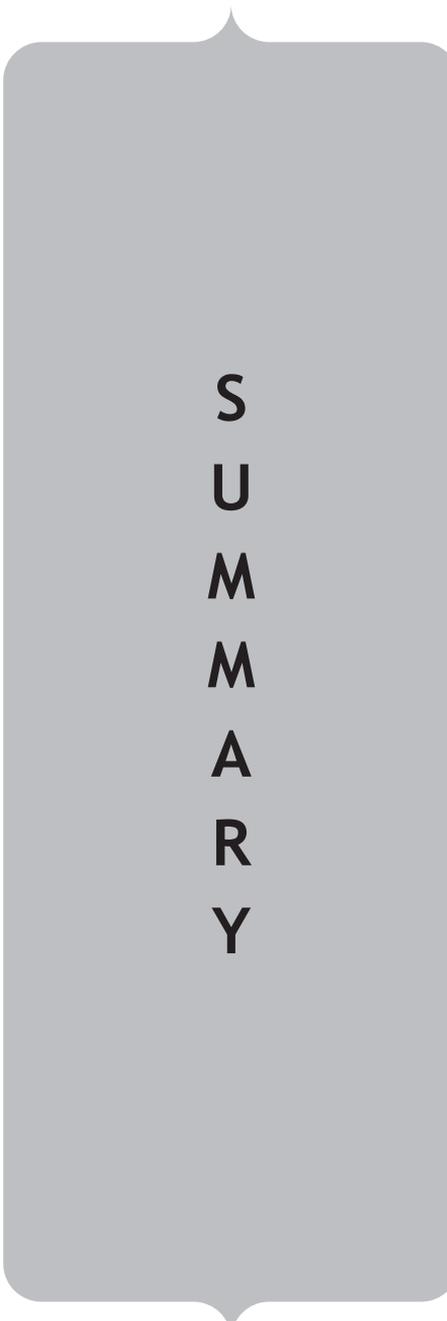
Se diagnosticó CIN2+ en 57 pacientes de las 306 incluídas en el estudio (18,6%).

En 50 pacientes se detectó VPH.AR en el tejido embebido en parafina (TEP); en 6 pacientes no se detectó ADN viral, y en otro paciente no se detectó VPH-AR.

En más de la mitad de los casos (28 casos, el 56%) la infección fue por un único genotipo, siendo el más frecuente el 16 (en 14 pacientes, el 50% de los casos positivos para VPH-AR), seguido del 31, y después con la misma frecuencia el 18, 45, 51 y 58.

En los casos de infección múltiple también es el genotipo 16 el que más frecuentemente se asocia con otros genotipos (hasta en un 59% de los casos). El VPH 18 sólo aparece asociado en un 18% con otros genotipos.

La frecuencia absoluta, de mayor a menor, ha sido para el VPH16, seguido del 31 y posteriormente del 18.



**S
U
M
M
A
R
Y**

Cervical cancer is the third most common neoplasia in women and still is one of the main causes of death in less developed countries.

Human papillomavirus (HPV) is necessary but not sufficient cause for this neoplasia as almost all the diagnosed cases (99%) were positive for cervical cancer. To be more precise, cervical cancer is produced by an anogenital HPV subtype known as HR-HPV and up to 70% of the cases are caused by specific HPV subtypes: 16 and 18.

Regular screening together with the performance of a Pap test are believed to be effective in lowering cervical cancer incidence and mortality rates, although it can show low sensitivity.

This is the reason why HR-HPV tests are performed as an alternative to the Pap test or in conjunction with it.

However, these tests have a low specificity as most HPV infections are temporary (up to 90% of the infections resolve within the first two years). Due to the high prevalence rate of HPV infections in young women, HPV tests are not recommended for screening in women under 30.

Our study will deal with how immunocytochemistry involving dual staining for p16 and Ki-67 can show cell cycle deregulation caused by HPV oncoproteins: E7 inactivates pRb, so p16 overexpression increases dramatically, and E6 stimulates the proliferative activity of Ki-67 by interfering with p53.

OBJECTIVES:

The main objective of this thesis is to:

- Check that dual staining of ASC and LSIL cytology with p16^{INK4a} and Ki-67 biomarkers
 - ✓ is associated with an underlying CIN2+ lesion, or
 - ✓ progress to CIN2+ over a specific period of time.

Once our main objective has been studied, we can do further research into the following secondary objectives:

- Comparing positivity, sensitivity and specificity rates for positive, dual stained results for dual staining cytology to determination of HR-HPV, in order to detect CIN2+ lesions.
- Observing the connection of positive dual-stained results for p16 and Ki-67 with the different high-risk viral genotypes in histologically confirmed cases of CIN2+. Frequency with which different genotypes appear in these lesions.

MATERIALS AND METHODS

- MAIN OBJECTIVE: 306 selected patients underwent p16/Ki-67 dual immunostaining testing. The tests were positive, negative or inconclusive

and always performed with positive controls as well as always interpreted by the same cytopathologists.

Out of the 306 cytology samples, 50% were followed by bioptic sampling (histological analysis of 153 patients), with three possible diagnoses: negative for dysplasia (16), CIN1 (80) and CIN2+ (57).

- The gold standard is the histologic diagnosis of CIN2+.
- The Clinical Follow-up of patients took from 1 day up to 30 months in some cases.

- OBJECTIVE No.2: 146 patients underwent HPV testing as well.

At the Gynecology consultation, a cervical smear test was performed for the determination of HPV using Digene Hybrid Capture (HC 2) test. In the case of this test being HR-HPV-positive, it was followed by a PCR-based genotyping assay (Clart® HPV2).

These tests were performed at the Department of Virology of the HCUVA.

- * OBJECTIVE No.3: Sections of paraffin-embedded tissues from the 57 patients were sent to the Department of Virology for a PCR-based genotyping assay (Clart® HPV2).

RESULTS

MAIN OBJECTIVE:

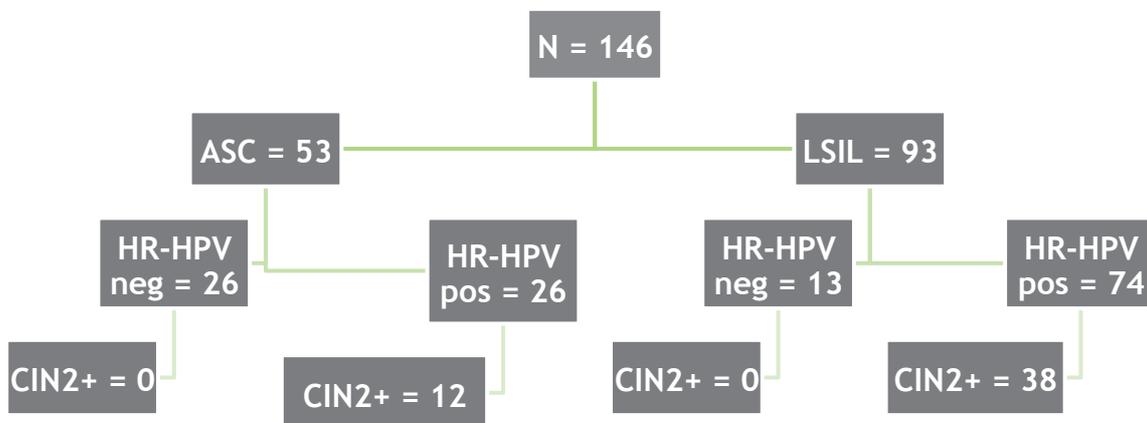
- Three hundred and forty-nine p16/Ki-67 dual-stained cytology tests were performed in 306 patients with ASC and LSIL diagnoses, resulting in a

general and important rise in sensitivity for the detection of an underlying CIN2+ lesion, maintaining the same high specificity given only by the Pap test.

- Some minor differences in sensitivity and specificity are found in ASC and LSIL.

OBJECTIVE No. 2:

The results obtained in the 146 patients who underwent the determination of HPV are summarized in the following table:



In ASC and LSIL, both tests (dual staining and determination of HPV) have a similar sensitivity of 90% when detecting any underlying CIN2+ lesion, although a statistically significantly higher specificity of dual stained cytology has been observed.

OBJECTIVE No. 3:

CIN2+ has been diagnosed in 57 patients out of the 306 patients who participated in this study (18,6%).

HR-HPV was found in paraffin-embedded tissues extracted from 50 patients. Viral DNA was not found in 6 patients and neither was HR-HPV in another patient.

In more than half of the cases (56% or 28 cases), the infection was due to only one genotype, the most common being genotype 16 (in 14 patients or 50% of the HR-HPV-positive cases), followed by genotype 31 and then genotypes 18, 45, 51 and 58 with the same frequency.

In cases of multiple infection, it is also genotype 16 which is most frequently associated with other genotypes (in up to 59% of the cases). HPV-18 is only associated with other genotypes in 18% of the cases.

In order, from highest to lowest, the following absolute frequency was observed: HPV-16, 31 and finally 18.

I N T R O D U C C I Ó N

I.1. Importancia del cáncer de cérvix uterino

El cáncer de cérvix uterino (CCU) es la tercera neoplasia más frecuente en el mundo en las mujeres y la quinta causa de las muertes relacionadas con cáncer. En España es el 10º cáncer en frecuencia de la población femenina y el 2º más frecuente entre mujeres de 15 a 44 años (1).

Se estima que cada año se diagnostican en España unos 2511 casos de carcinoma de cérvix infiltrante (1). De estos, aproximadamente morirán en un año 848 mujeres. El cáncer de cuello uterino se sitúa en el 10º lugar en importancia (2) y se considera pues que España es un país de incidencia moderada-baja cuando se compara con otros países. Sin embargo, la detección de casos nuevos (incidencia) por año es de 8 por 100.000 mujeres, siendo el doble de la incidencia registrada en países nórdicos, donde la actividad de prevención secundaria es muy importante desde hace más de 40 años (3).

En las dos últimas décadas múltiples estudios han aportado una sólida evidencia que confirman al virus del papiloma humano (VPH) como agente causal de la práctica totalidad de CCU y de sus lesiones precursoras. Se estima que de la totalidad de mujeres sexualmente activas en España, aproximadamente un 14%, presentan una infección detectable por VPH (4). La evidencia científica acumulada a partir de estudios virológicos, moleculares, clínicos y epidemiológicos ha permitido demostrar y describir de forma inequívoca que el cáncer de cuello de útero es, en realidad, una secuela a largo plazo de una infección persistente por ciertos genotipos de VPH, un virus de transmisión primordialmente sexual (5). De esta manera, podemos afirmar que **EL CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO ES EL RESULTADO FINAL DE UNA ENFERMEDAD VENÉREA NO RESUELTA.**

Sin embargo, sólo una minoría de las infecciones por el VPH acaban en lesiones neoplásicas (6). Es bien sabido que la mayoría de las infecciones por el VPH acaban resolviéndose o “aclarándose” por el sistema inmune (6), y que ciertos tipos de VPH, los de alto riesgo, son los responsables de las lesiones de alto grado y los carcinomas.

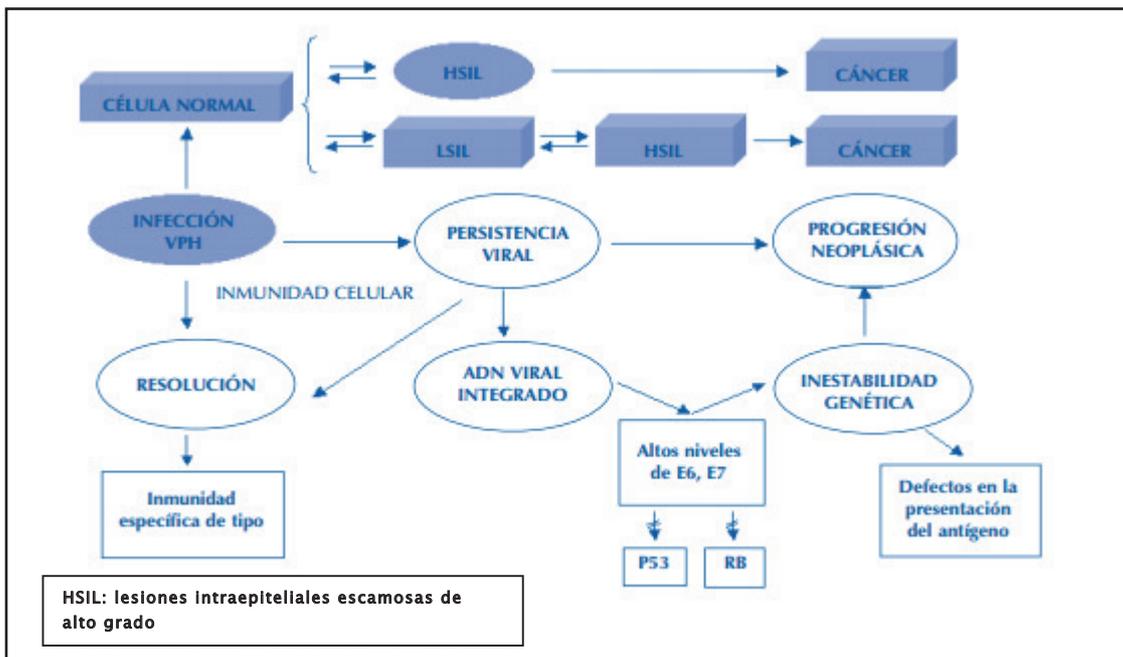


Figura 1. Mecanismos de la carcinogénesis cervical por VPH (modificado de 6)

El factor más importante y necesario para que la infección progrese hacia lesión intraepitelial cervical (CIN) de alto grado es la integración de las secuencias del VPH en el genoma del huésped con la pérdida de E2 del gen supresor. E2 regula fisiológicamente la expresión de los oncogenes E6 y E7. Se conoce que la integración es común en los CIN de alto grado y en el cáncer, pero es infrecuente o inexistente en los CIN de bajo grado (*figura 1*).

Por tanto, la integración de VPH junto a la desregulación del ciclo celular y la alteración del sistema inmune inducirían al acúmulos de aberraciones genéticas que conllevarían al desarrollo del CIN (7).

Gran parte de estos mecanismos de la carcinogénesis producida por el VPH así como de los factores que predisponen a la persistencia viral y a la transformación celular, fueron estudiados por el dr. Harald Zur Hausen (8), lo que le llevó a la obtención del premio Nobel de Medicina en el año 2008.

I.2. Virus del papiloma humano (VPH)

Ya en 1955 Koss y Durfee (9) observaron que algunas atipias escamosas exhibían atipia nuclear sólo en las células superficiales, y ya lo denominó “atipia coilocítica”. Veinte años después, la patogénesis viral de las lesiones cervicales precursoras fue imponiéndose al demostrarse el virus del papiloma humano en la atipia coilocítica.

Los primeros tipos conocidos y aislados fueron el VPH 6 y el 11, los cuales no se asociaban con las lesiones precursoras de alto grado con afectación de todo el espesor parietal, como se sabía de la clasificación CIN tradicional.

Posteriormente se conocería VPH16, y con él, un alto porcentaje de lesiones precursoras (CIN) y carcinomas escamosos.

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a un grupo diverso de virus ADN. Se han descrito cerca de 150 tipos de virus del papiloma que afectan a humanos; 40 de ellos se localizan en el tracto ano-genital (10,11).

Muchas de las infecciones de VPH son transitorias y asintomáticas, y se solucionan sin tratamiento, mientras que otras persisten en el tiempo (12). La infección persistente por VPH se asocia al desarrollo de cáncer de cérvix, por lo que la determinación de la presencia del mismo se ha incluido en los programas de cribado de cáncer de cérvix (13).

I.2.1. Etiología, patogenia y oncogénesis:

I.2.1.1. Clasificación y bases moleculares:

Los VPH son un conjunto de virus pertenecientes a la familia de los Papilomaviridae que infectan piel y mucosas. Aproximadamente unos 45 tipos de VPH infectan a las mucosas (14,15).

Según su capacidad oncogénica se subclasifican en virus de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), grupo integrado por unos 15 tipos que se detectan en los

carcinomas invasores, y virus de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR) (16). Los tipos VPH de bajo y de alto riesgo pertenecen al género Alpha-papillomavirus (14), que son los que causan las verrugas genitales (los bajo riesgo) y las neoplasias cervicales (los alto riesgo):

- * VPH-AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,68,73,82
- * VPH “posiblemente” de AR: 26,69,82,30,53,66,70,85,67
- * VPH-BR: 6,11,13,44,74,90,106,32,28,29,77,61,62,72,81,83,84,86,87, 89,2,27,57,7,40,91

Tanto los VPH-AR como los VPH-BR pueden detectarse en las lesiones intraepiteliales. La detección de tipos de VPH-AR en una lesión intraepitelial, supone un cierto riesgo de desarrollar una neoplasia invasora. Aunque los VPH-BR pueden causar algún cáncer (17), la asociación es tan infrecuente que desde el punto de vista clínico, únicamente interesa detectar los VPH-AR.

Un número limitado de genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) está causalmente implicado. Concretamente el VPH 16 y 18 explican el 70% de los CCU y otros 10 tipos (VPH 45, VPH 31, VPH33, VPH 52, VPH 58, VPH 35, VPH 59, VPH 56, VPH 51, VPH 39) explican el 25-35% de los casos restantes (18). Esta información ha permitido establecer un nuevo modelo de carcinogénesis basado en la persistencia de la infección VPH como elemento necesario para el desarrollo de lesiones precursoras y CCU. Sin embargo, más del 90% de las infecciones por VPH son transitorias y por tanto irrelevantes desde el punto de vista oncogénico.

Otros autores han confirmado que junto al 16 y al 18, otros 12 genotipos explican más del 85% de los CIN 3/AIS, algo menos del 70% de los CIN 2 y casi el 50% de los CIN 1, por lo que se cree que si se implantase la nueva vacuna nonavalente podrían evitarse la mayoría de los CIN2 y CIN 3 y casi la mitad de los CIN1 (19).

I.2.1.2. Estructura básica del genoma:

Como característica común, todos los VPH están constituidos por una cápside proteica y una doble cadena circular de ADN de alrededor de 8.000 pares de bases que se divide en una **región L** (o de expresión tardía, “late”) que codifica las proteínas de la cápside, una **región E** (o de expresión temprana, “early”), que codifican diversas proteínas con papel en la replicación y en la transcripción (20), y una **región reguladora LCR** (figura 2).

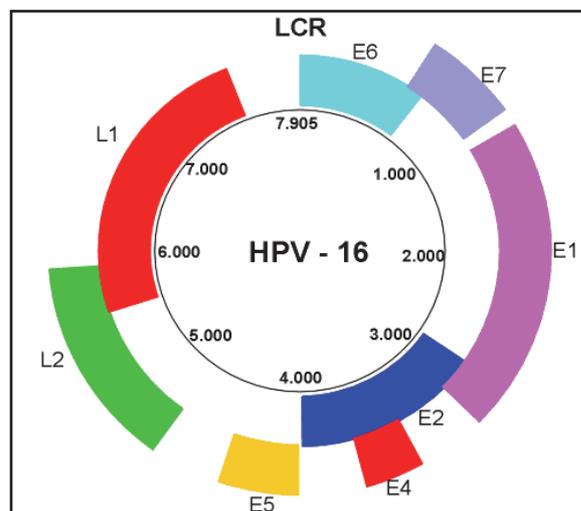


Figura 2. Genoma del VPH

Genoma del VPH:

Genoma circular de ADN doble cadena (aproximadamente 8000 pares de bases).

Dividido en tres regiones:

- Región tardía (GENES ESTRUCTURALES), que codifican las proteínas de la cápside:
 - L1 o proteína mayor (72 pentámeros)
 - L2 o proteína menor, 12 moléculas (21)

- “Long control region” (LCR) ó región reguladora (11)

- Región temprana (GENES NO ESTRUCTURALES):
 - E6 y E7 oncoproteínas transformadoras (22)
 - E4: maduración y replicación
 - E5: estimula la proliferación
 - E2: activador transcripcional
 - E8-E2C: papel en el mantenimiento de la latencia viral en las células basales del epitelio infectado (23)
 - E1: necesaria para la replicación del ADN.

I.2.1.3. Carcinogénesis cervical:

Dos de los genes virales E (E6 y E7) codifican para oncoproteínas. La oncoproteínas E6 y E7 están reguladas por otra proteína E2. La acción oncogénica de E6 se realiza mediante la interferencia con p53, lo que impide que la célula revise su ADN antes de la siguiente división y entre en apoptosis en caso de anomalías. E7 interfiere con pRb, de forma que la célula está en constante división.

Por tanto, las células infectadas por tipos de VPH-AR son susceptibles de adquirir un fenotipo neoplásico ya que la división constante y ausencia de revisión de su ADN favorecen la acumulación de mutaciones. Si además existe integración del ADN viral con el ADN de la célula huésped, es más probable que dicha célula adquiera el fenotipo proliferativo ya que con la integración se produce la rotura del ADN viral por la zona de E2, con lo que E2 deja de sintetizarse y, por tanto, se pierde por completo el control de la acción de E6 y E7 (*figura 3*).

En definitiva, en el proceso de carcinogénesis cervical son necesarios al menos tres eventos (24):

- * Infección del VPH
- * Progresión de la infección a lesión preneoplásica, para lo que es necesario la INTEGRACIÓN viral
- * Invasión

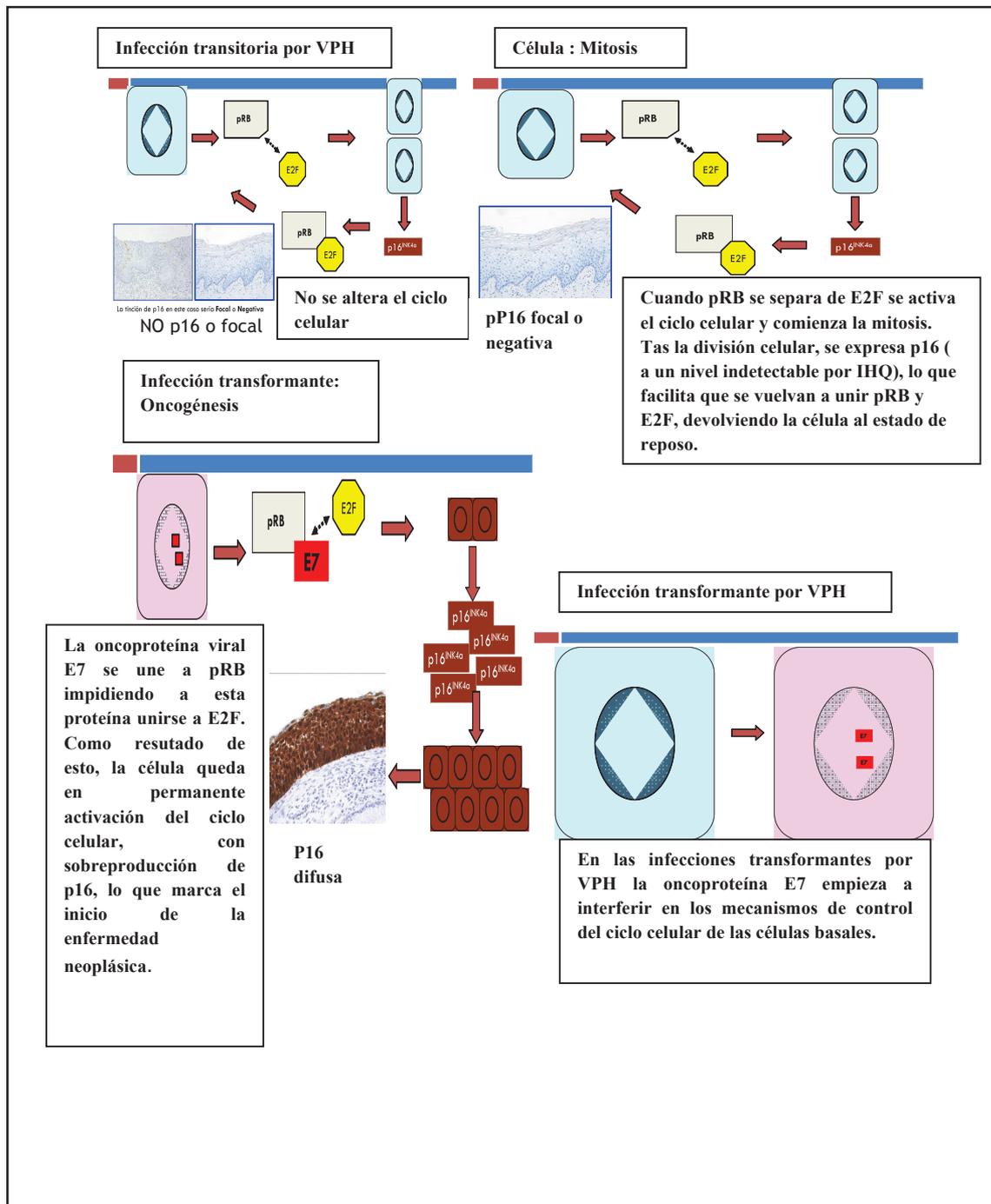


Figura 3. Modelo de oncogénesis (modificado de 25)

I.2.2. Epidemiología e historia natural del VPH:

I.2.2.1. Epidemiología y Prevalencia:

Se estima que la prevalencia de VPH cervical en la población general española oscila entre el 3 y el 6%, siendo una de las más bajas de Europa (26). Este dato concuerda con la baja incidencia de cáncer de cérvix en España que es también una de las más bajas del mundo (27,28,29). Se estima que de la totalidad de mujeres sexualmente activas en España, aproximadamente un 14% presentan una infección detectable por VPH (30).

Durante los primeros años de vida sexual se observa una elevada incidencia de infección, generalmente múltiple (31) pero la mayoría de estas infecciones son transitorias y desaparecen espontáneamente. Las mujeres mayores de 30 años experimentan una clara disminución de la prevalencia de la infección VPH, pero un porcentaje más elevado de las infecciones en dichas mujeres son persistentes, lo que explica el mayor riesgo e incidencia de lesiones precursoras a partir de esta edad. Por tanto, aunque las pruebas de detección del VPH constituyen un marcador muy sensible y precoz del riesgo de cáncer o lesiones precursoras, especialmente en mujeres mayores de 30 años, no puede discriminar entre las frecuentes infecciones transitorias y las verdaderas lesiones premalignas, mucho menos prevalentes (32).

La detección de VPH es más elevada en mujeres hasta los 25 años (*figura 4*) para descender progresivamente hasta alcanzar una meseta que se sitúa entre el 5-6% a partir de los 40 años (26).

Estos datos varían sensiblemente en poblaciones de alto riesgo de cáncer de cuello uterino (inmunodeprimidas, prostitutas,..) según estudios en estas poblaciones (33).

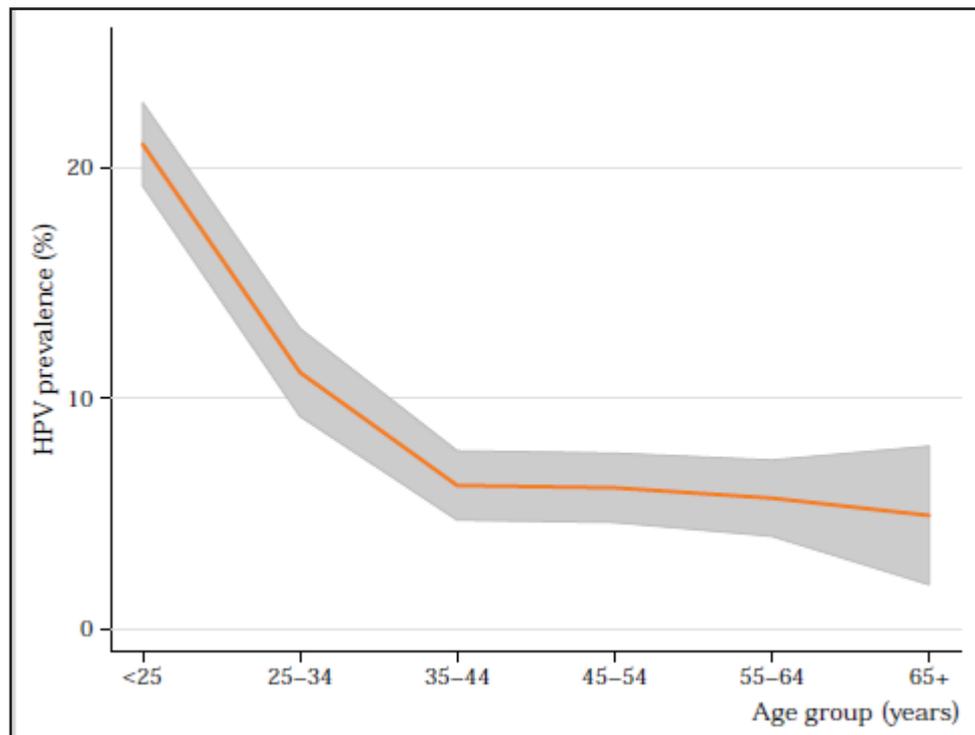


Figura 4. Prevalencia de VPH en mujeres con citología normal, con CI 95% (tomada de 2)

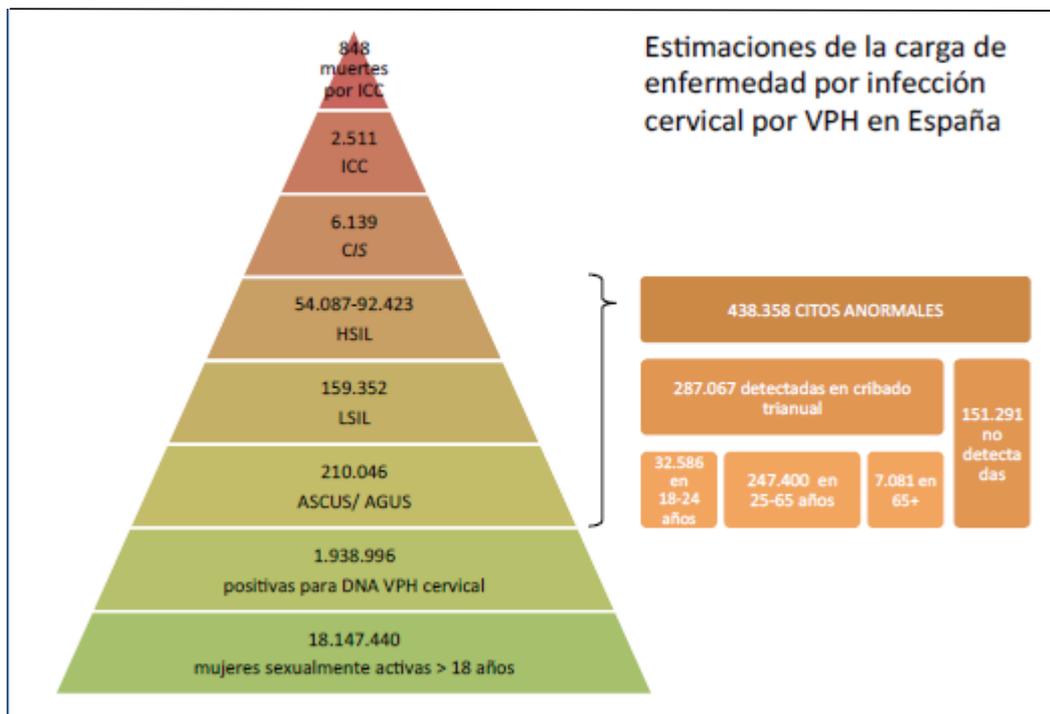


Figura 5. Carga de enfermedad cervical asociada al VPH en España (18)

Se estima que cada año se diagnostican en España unos 2.511 casos de carcinoma de cérvix infiltrante (*figura 5*). De estos, aproximadamente morirán en un año 848 mujeres. El cáncer de cuello uterino se sitúa en el 10º lugar en importancia (*figura 6*) y se considera pues que España es un país de incidencia baja-moderada cuando se compara con otros países. Sin embargo, la detección de casos nuevos (incidencia) por año es de 10,6 por 100.000 mujeres (2).

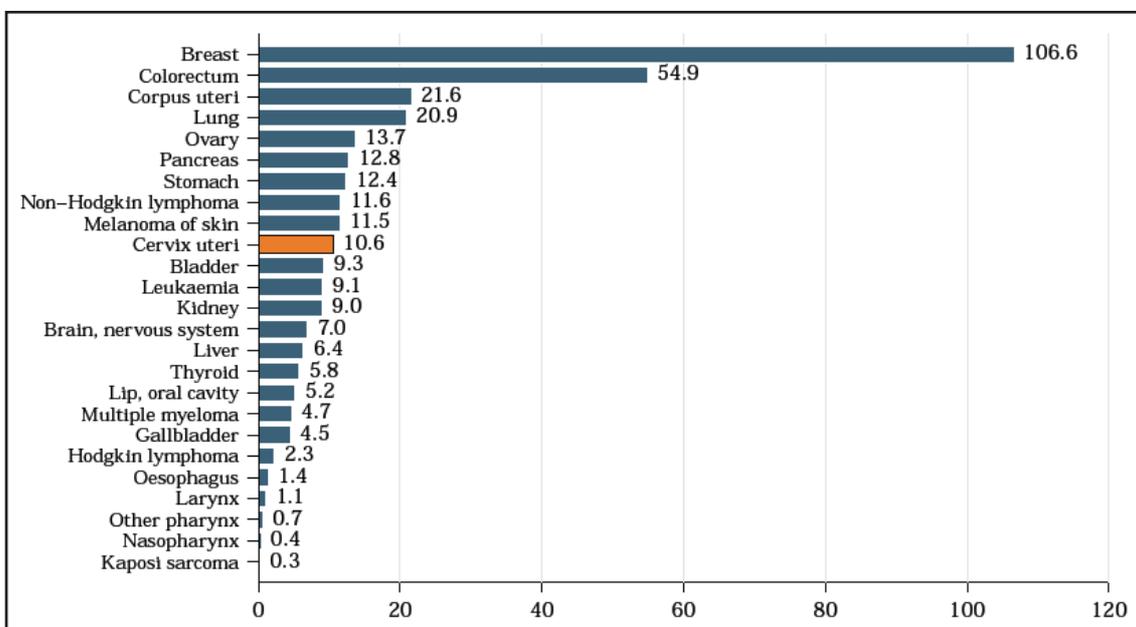


Figura 6. Incidencia del cáncer cervical comparado con otros cánceres en mujeres de todas las edades en España (2)

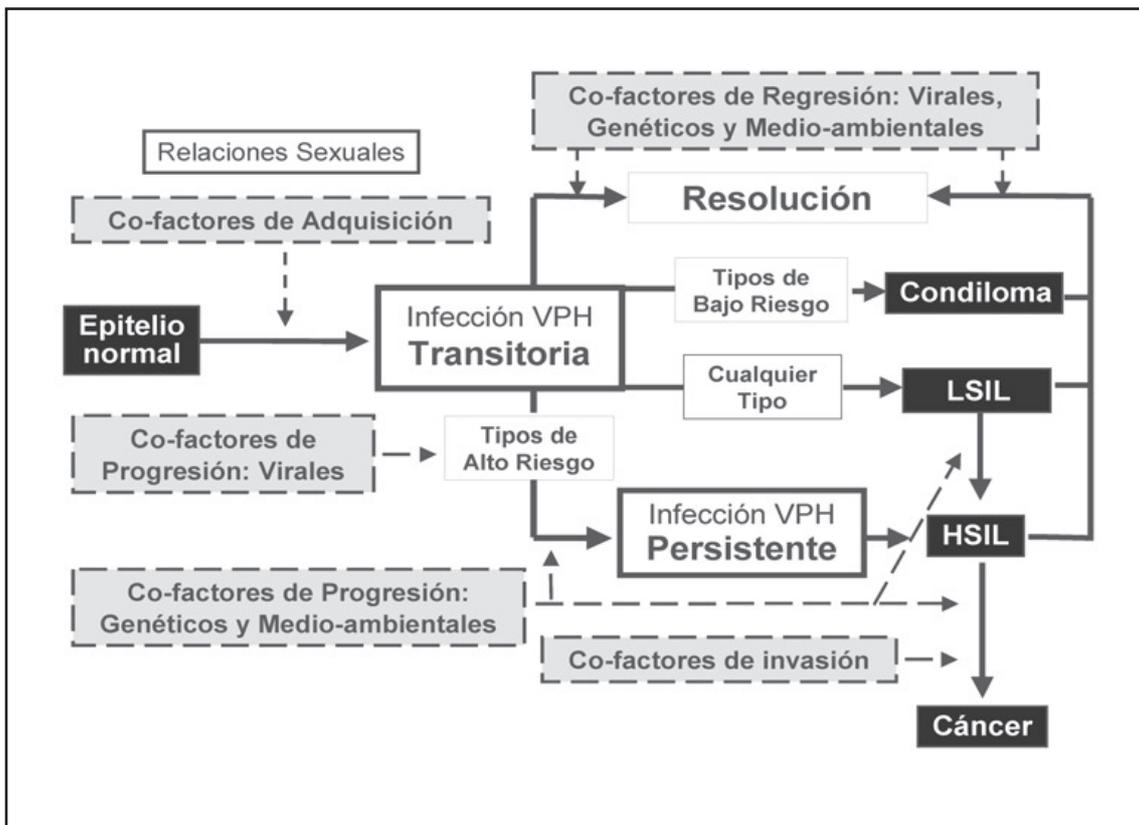
I.2.2.2. Historia natural de la infección por VPH:

Al iniciar su actividad sexual, la mujer puede ser contagiada por un virus de alto riesgo, que en la gran mayoría de los casos dará lugar a una infección transitoria, haciéndose indetectable en 6-12 meses. Ocasionalmente, esta infección desarrollará una lesión CIN visible mediante el microscopio óptico (34).

Estas lesiones regresan espontáneamente en la mayor parte de casos. Cuando el virus no es eliminado y persiste la infección por VPH de alto riesgo, la lesión precursora se mantiene y cierto número de estas lesiones progresarán hasta CIN 3 (35), la lesión más grave con mayores posibilidades de progresar a cáncer invasor. Algunos autores han propuesto un modelo alternativo de progresión neoplásica. Según esta nueva propuesta, las lesiones CIN 1 y, en gran parte, CIN 2 serían manifestaciones morfológicas auto-limitables, atribuibles mayoritariamente a infecciones por VPHs de bajo riesgo o de alto riesgo transitorias.

Algunas lesiones CIN 3 y los carcinomas invasivos tendrían una historia natural distinta atribuida a aspectos mal definidos de la interacción huésped/VPH. En ciertas circunstancias este tipo de lesiones podrían inducirse directamente, sin progresar a través de estadios intermedios. A la luz de estas propuestas se podría redefinir la historia natural de las lesiones precursoras (*figura 7*).

Al contrario que los virus de bajo riesgo, los cuales permanecen en el núcleo de la célula infectada en situación episómica, los VPHs de alto riesgo ejercen su actividad oncogénica, aunque no exclusivamente, tras integrarse en el genoma celular. El mecanismo mejor conocido de inducción neoplásica por VPH se produciría a partir de la síntesis de las proteínas virales E6 y E7. Estas proteínas se ligan a las proteínas producidas por los genes supresores de tumores p53 y Rb respectivamente, degradándolas e inutilizándolas funcionalmente. Esta interacción en células proliferativas, como son las del cuello uterino y especialmente de la zona de unión escamo-cilíndrica con un epitelio inestable, probablemente identificada por autores como “célula cervical madre o stem” (36), que tiene una marcación inmunohistoquímica característica para p63 y ck17, impide la correcta reparación del ADN, conduce a una inestabilidad genómica y aumenta la probabilidad de desarrollar mutaciones específicas, esenciales para la progresión a cáncer invasor. Ocasionalmente, hay lesiones malignas en las que el virus no está integrado en el genoma celular sugiriendo la presencia de mecanismos oncogénicos múltiples.



CO-FACTORES

De Adquisición:

1. Conducta sexual de riesgo: Edad 1er coito. Promiscuidad. No preservativo.
2. Varones de riesgo elevado: Promiscuos. No circuncidados. Falta de higiene.

De Progresión / Regresión:

1. Virales: Genotipos y variantes. Integración. Carga viral.
 2. Genéticos: Respuesta inmunitaria. Susceptibilidad genética.
 3. Medio-ambientales: Edad. Tabaco. Contraceptivos orales. Paridad.
- Inmunosupresión y VIH. Otras ETS: Chlamydia, Herpes.

De Invasión: Factores angiogénicos

Figura 7. Historia natural de la infección por VPH (modificado de 27)

I.2.3. Diagnóstico del virus del papiloma humano (VPH):

La presencia de VPH se puede deducir de hallazgos morfológicos, serológicos y clínicos. Sin embargo, el diagnóstico de VPH se basa en técnicas de biología molecular que permiten su detección y tipificación. La detección de VPH tiene una elevada sensibilidad en la detección de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado y un elevado valor predictivo negativo (13).

Existe una gran variedad de ensayos que permiten la detección del VPH (37). En función de la metodología en la que se basan, estos pueden clasificarse en 3 grupos (*figura 8*):

- ensayos basados en hibridación de ácidos nucleicos
- ensayos basados en amplificación de la señal, y
- ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

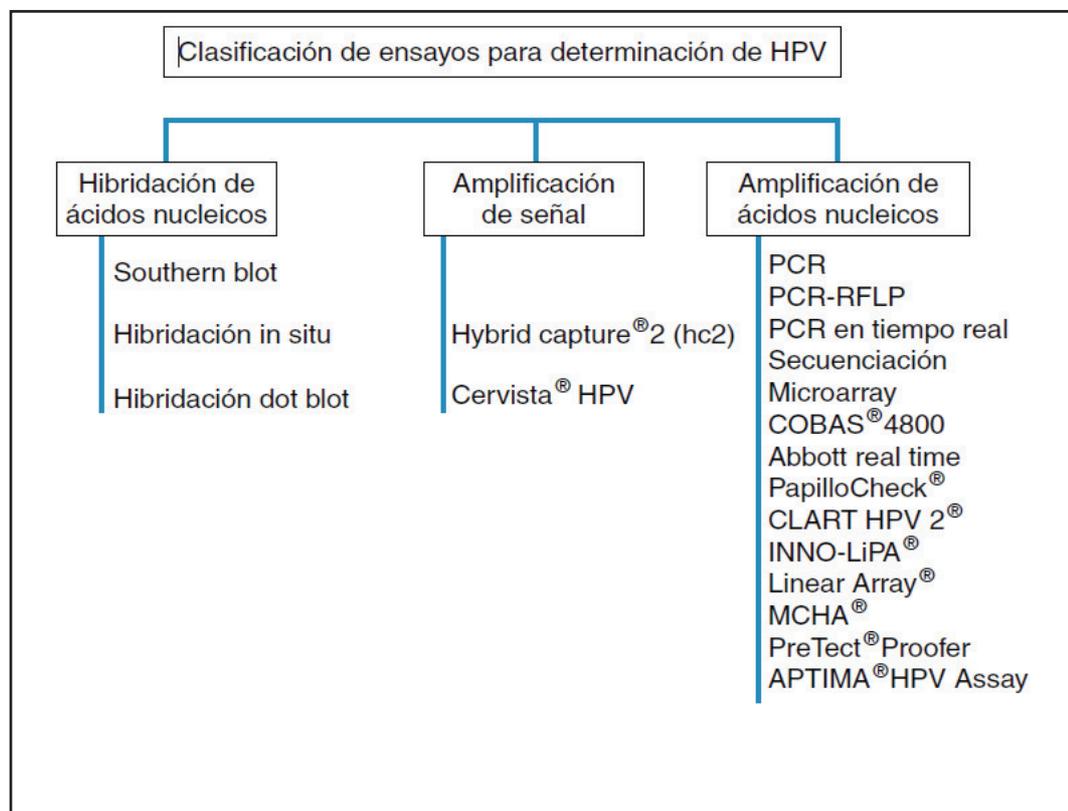


Figura 8 . Clasificación de ensayos para determinación de VPH (13)

I.3. Diagnóstico de lesiones preneoplásicas: SISTEMA BETHESDA 2001

I.3.1. Historia

El concepto de que el carcinoma invasor de cérvix está precedido por lesiones precursoras, bien identificadas por citología o por histología, es algo asumido desde hace más de 50 años (9). Hay datos ya en 1886 de la primera lesión intraepitelial descrita como “cambio epitelial no invasivo” próximo a un carcinoma de células escamosas (38). De hecho, ya Papanicolau observó y publicó que esas lesiones precursoras podían ser detectadas citológicamente tras el estudio de frotis vaginales (39). Sin embargo, a pesar de la aceptación generalizada de la existencia de lesiones precursoras, la terminología ha variado y al menos se han propuesto, a lo largo de los años, tres sistemas de clasificación (40) (*figura 9*):

- * Displasia-carcinoma in situ (CIS)
- * Neoplasia cervical intraepitelial (CIN)
- * Lesiones intraepiteliales escamosas (SILs), también conocidas como Sistema Bethesda (sistema binario)

Con la progresiva introducción de la citología y biopsias sistemáticas se vio con claridad que el espectro de anomalías del epitelio cervical era mucho más amplio, siendo frecuentes otros cambios epiteliales menos severos que el CIS (41). En 1949 , Papanicolau introduce los términos de “displasia” en histopatología y “discariosis” en citología para designar dichos cambios. Posteriormente, en 1953, Reagan consagra el término en histopatología cervical al denominar a estas lesiones, menos severas que el CIS, hiperplasia atípicas o displasias, señalando que la mayoría de ellas, dejadas a su evolución, regresan o permanecen inalteradas por mucho tiempo. En 1961, en el Primer Congreso Internacional de Citología celebrado en Viena, se acuerda que los términos

para designar citológicamente las tres lesiones cervicales mayores sean: carcinoma invasor, carcinoma in situ y displasia. Esta última fue graduada como leve, moderada, y severa o grave, a las que habría que añadir el CIS ya definido (42).

Sin embargo, se produjo gran desacuerdo respecto a cuándo una lesión debía ser considerada displasia grave o CIS.

Para solventar estos problemas Richart en 1967 propuso el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC-CIN) con tres grados progresivos (CIN1, CIN2, CIN3), incluyéndose en el grado 3 la displasia grave y el CIS de la clasificación anterior. Esta clasificación ha sido considerada bastante adecuada durante más de 20 años y por lo tanto la más utilizada internacionalmente. No obstante, se le atribuyó el hecho de la sorprendentemente baja seguridad diagnóstica en un número creciente de publicaciones, tanto en citología como en biopsias (41). Se sugirió, por lo tanto, que este sistema de gradación debía ser modificado y sustituido por un sistema binario que segregara los procesos con atipia celular muy discreta de aquellos con atipia franca.

Esto motivó una reunión de representantes de organismos internacionales, científicos y profesionales, en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, en Bethesda (Maryland). Fruto de dicha reunión fue un nuevo sistema de nomenclatura para informes citológicos ginecológicos (Sistema o Clasificación de Bethesda), basado en un sistema binario para catalogar las anomalías celulares preneoplásicas en el extendido citológico, denominándolas lesiones intraepiteliales escamosas de alto o bajo grado (LIP-SIL):

- LIP de bajo grado: CIN 1 y las alteraciones celulares producidas por papilomavirus (VPH) de la clasificación de Richart.
- LIP de alto grado: CIN 2 y CIN 3 de la clasificación de Richart

Esta clasificación fue difundida en 1988, minimamente modificada en 1991 (43), y actualizada en 2001 (41).

DISPLASIA (CIS)	¿HPV?	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA GRAVE	CARCINOMA "IN SITU" CIS
CIN-NIC (Richard)	HPV	CIN-NIC I	CIN-NIC II	CIN-NIC III	
SIL-LIP (Bethesda)	SIL-LIP BAJO GRADO (L(ow)-SIL)		SIL-LIP ALTO GRADO (H(igh)-SIL)		

Figura 9. Cuadro comparativo de clasificaciones de anomalías del epitelio cervical

La Sociedad Española de Citología (SEC), consciente de la necesidad de unificar criterios y considerando que son más las ventajas que aporta que los inconvenientes que suscita, adoptó esta clasificación como su nomenclatura oficial aconsejando su utilización a todos sus miembros (44).

Después de su implementación y tras estudios posteriores se comprueba con la aplicación del sistema Bethesda 2001 (*figura 10*) una disminución de los diagnósticos de ASC y también una disminución de la relación ASC/LSIL (45).

SISTEMA BETHESDA 2001

CALIDAD DE LA MUESTRA

Satisfactoria para evaluación

- Agregar un “indicador” de calidad (presencia de material de la zona de transformación, flora, etc.).

Insatisfactoria para evaluación

- Muestra rechazada (especificar causa)
- Muestra procesada y examinada pero insatisfactoria por... (especificar causa)

CATEGORÍA GENERAL (OPCIONAL)

Negativo para lesión intraepitelial o malignidad

Anomalías de células epiteliales : Ver diagnósticos descriptivos

Otros : Ver resultados/interpretación (vg, presencia de células endometriales en una mujer de más de 40 años)

LECTURA AUTOMATIZADA

En caso de realizar lectura automatizada especificar aparato y resultado.

TÉCNICAS AUXILIARES

Breve descripción de las técnicas auxiliares empleadas e informe del resultado de manera que sea fácilmente comprensible para el clínico

RESULTADO/INTERPRETACIÓN

Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad

Se utiliza esta categoría cuando no hay evidencia de neoplasia, independientemente de si se observan o no microorganismos u otros hallazgos neoplásicos

Microorganismos

- Tricomonas Vaginalis
- Organismos micóticos morfológicamente compatibles con Cándida
- Cambio en la flora sugestivo de vaginosis bacteriana
- Bacterias morfológicamente compatibles con Actinomicetes
- Cambios celulares compatibles con virus herpes simplex

Otros hallazgos no neoplásicos (es opcional el informarlos)

- Cambios reactivos celulares asociados con
 - Inflamación (incluye reparación típica)
 - Radiación
 - Dispositivo intrauterino (DIU)

- Células glandulares en estado posthisterectomía
- Atrofia

Anomalías celulares epiteliales

En células escamosas

- Células escamosas atípicas:
 - De significado indeterminado (ASC-US)
 - No puede excluirse H-SIL (ASC-H)
- Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL), comprendiendo :
 - Displasia leve/CIN 1
 - VPH
- Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (H-SIL) comprendiendo:
 - Displasia moderada, severa y CIS/CIN 2 y 3
 - Con características sugestivas de invasión (si se sospecha invasión)
- Carcinoma epidermoide

En células glandulares

- Células atípicas:
 - Endocervicales (NOS o especificar)
 - Endometriales (NOS o especificar)
 - Glandulares (NOS o especificar)
- Células atípicas, sugestivas de neoplasia:
 - Endocervicales
 - Glandulares
- Adenocarcinoma endocervical in situ
- Adenocarcinoma:
 - Endocervical
 - Endometrial
 - Extrauterino
 - No específico (NOS)

Otras neoplasias malignas (especificar)

Otros

Células endometriales / en mujer mayor de 40 años)

Recomendaciones (opcional)

Las recomendaciones deben ser concisas, redactadas en forma de sugerencias y de acuerdo con las pautas de seguimiento clínico publicadas por las organizaciones profesionales. Pueden incluirse también referencias bibliográficas relevantes.

Figura 10. Clasificación de Bethesda 2001 (46)

CALIDAD DE LA MUESTRA

I.3.2. Criterios mínimos de celularidad escamosa, según Bethesda 2001 (46)

✓ Células escamosas:

Se considera que la citología líquida (CML, citología en medio líquido) es aceptable cuando contiene un mínimo aproximado de al menos 5000 células escamosas bien conservadas que se reconocen adecuadamente (a diferencia de la citología convencional, que es de mínimo 8000-12000 células).

El diámetro de nuestra muestra en medio líquido de SurePath® es de 13 mm, por lo que se acepta que 5000 células en la preparación equivalen a 8-9 células en un campo de gran aumento (40x).

Sin embargo, puesto que el criterio de la celularidad mínima adecuada es bastante bajo, está justificado tomar precauciones en los casos intermedios.

En la citología líquida, el cálculo de la celularidad es rápido y reproducible.

Un estudio preliminar dio a conocer que es mayor el porcentaje de detección de lesiones de alto grado cuando la celularidad de la citología líquida excede las 20000 células.

✓ Células endocervicales y de la zona de transformación:

El componente de la zona de transformación es aceptable si la muestra contiene al menos 10 células escamosas metaplásicas o endocervicales bien conservadas aisladas o en grupos (SE DEBE CONSIGNAR en el apartado de calidad de la muestra)

I.3.3. Células escamosas atípicas (39):

DEFINICIÓN
“ Cambios citológicos sugestivos de lesión intraepitelial escamosa que son cuantitativa o cualitativamente insuficientes para una interpretación definitiva”
<ul style="list-style-type: none"> ■ Esta categoría no debe exceder el 5% del total de muestras ■ La ratio ASC:SIL no debe superar 2:1, 3:1

✓ ASC-US:

Este término se refiere a cambios que pueden sugerir LSIL o SIL de grado indeterminado. Si bien la mayoría de las interpretaciones ASC-US sugieren LSIL, se prefiere el término de “significado indeterminado” debido a que se ha demostrado que en alrededor del 10% al 20% de las mujeres que presentan ASC-US se detectan CIN2 o CIN3 durante el seguimiento.

Se espera que la categoría ASC-US abarque más del 90% de todas las interpretaciones ASC en la mayoría de los laboratorios.

Criterios (*figura 11*):

- ❖ los núcleos tienen aproximadamente entre dos veces y media y tres veces el tamaño del área del núcleo de una célula escamosa intermedia normal
- ❖ leve aumento de la relación existente entre el área nuclear y el área citoplasmática (N:C)
- ❖ hiperchromasia nuclear mínima e irregularidad de la distribución cromatínica o de la morfología nuclear

- ❖ anomalías nucleares asociadas a citoplasma eosinófilo denso (“paraqueratosis atípica”)
- ❖ se comparan con las células escamosas intermedias o superficiales, y a veces también a células intermedias pequeñas o metaplásicas grandes (y ya es un tercio de su tamaño, representativo de SIL de grado intermedio, posible CIN1 o CIN2)

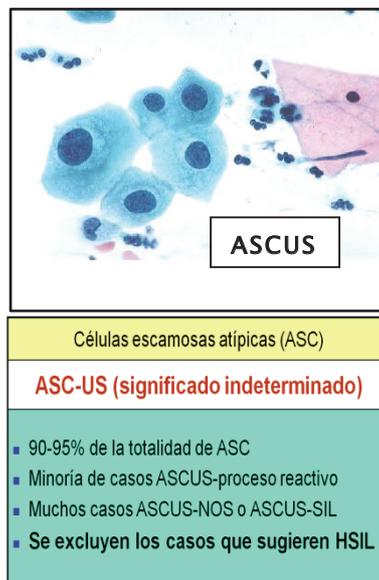


Figura 11. ASCUS (x20) y criterios morfológicos

✓ ASC-H:

Este término se reserva para una minoría de casos (menos del 10% de los diagnósticos de ASCUS) en los cuales los cambios citológicos sugieren HSIL.

Criterios (figura 12):

- ❖ Células pequeñas con relación N:C alta: “Metaplasia atípica (inmadura)”: las células suelen estar aisladas o agrupadas en pequeños fragmentos de

menos de 10 células. Las células tienen el tamaño de una célula metaplásica y un núcleo que es entre una vez y media y dos veces y media más grande de lo normal, con similar relación N:C a la de HSIL. La irregularidad cromatínica, la hiperchromasia y la morfología nuclear anómala con irregularidad focal apoyarían ya HSIL (*figura 13*).

- ❖ “Disposición en lámina densa”: microbiopsia de células en lámina densa cuyo núcleo puede mostrar pérdida de la polaridad o ser difícil de observar. En medio líquido las células de ASC-H pueden ser bastante pequeñas y tener el núcleo solo entre dos y tres veces más grande que el de un neutrófilo.



Figura 12. ASC-H (x20) y criterios morfológicos

La mayoría de las células ASC-US reflejan la dificultad de hacer la distinción entre los cambios reactivos y LSIL, mientras que la mayoría de las células ASC-H refleja la dificultad de distinguir entre la metaplasia reactiva (inmadura) y HSIL (*figura 14*).

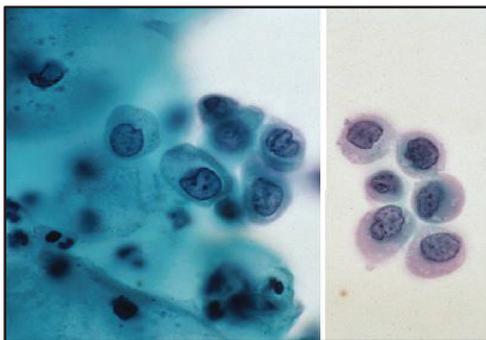


Figura 13. ASC-H

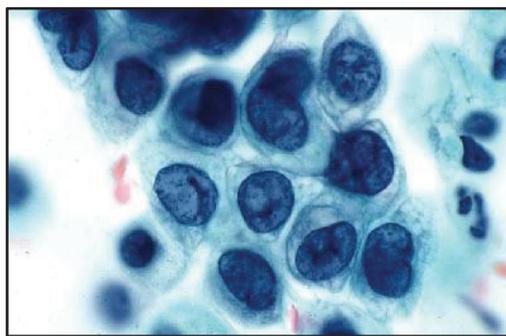


Figura 14. HSIL

- ✓ Lesión escamosa intraepitelial (SIL):
 - Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL)
 - Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL)
 - de características sospechosas de invasión (si se sospecha)
 - Carcinoma de células escamosas

El espectro de anomalías escamosas no invasoras del epitelio cervical asociadas al virus del papiloma humano (VPH), que incluye desde cambios celulares asociados a la infección transitoria hasta cambios celulares anómalos que representan precursores de alto grado hacia el carcinoma invasor de células escamosas, se denominan lesiones escamosas intraepiteliales (SIL)

Criterios (figuras 15 y 16):

- ❖ células aisladas o en láminas, de aspecto superficial, con agrandamiento nuclear superior a tres veces el núcleo de una célula intermedia
- ❖ frecuente bi o multinucleación
- ❖ grados variables de hiperchromasia nuclear, además de variaciones de tamaño, número y morfología nucleares
- ❖ cromatina uniforme y granular
- ❖ a veces “coilocitos”: zona clara perinuclear bien delimitada y un borde periférico de citoplasma densamente teñido

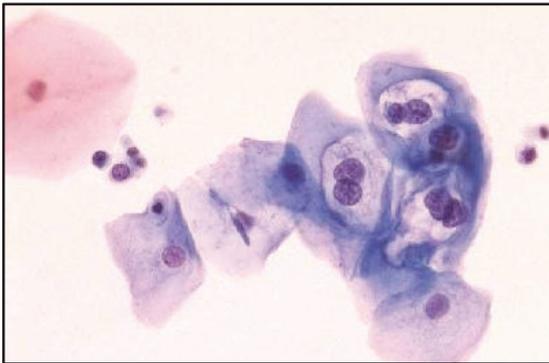


Figura 15. LSIL (x20): “coilocitos”(47)

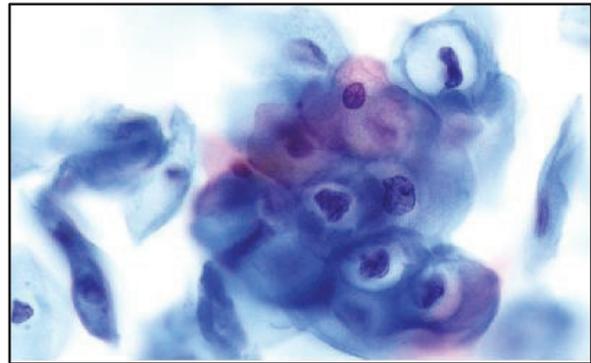


Figura 16. LSIL (x20)(47)

La dicotomía se conserva para SIL; el término “LSIL” implica cambios que reflejan principalmente la infección por HPV (de modo que queda eliminada la distinción entre KA-atipia coilocítica y CIN1), mientras que el término “HSIL” implica una lesión de mayor riesgo, incluidos los precursores del carcinoma (46).

TECNICAS AUXILIARES:

En el informe anatomopatológico y si las hubiere, habría que reseñar el resultado de la determinación viral VPH , especificando el método con el que se realiza (48).

I.4. Cribado del cáncer de cuello uterino. METODOS DE SCREENING

La actualización de la Estrategia en Cáncer del SNS (49) incluye entre sus objetivos la detección precoz de cáncer de cérvix, y para ello recomienda optimizar la realización de citologías en mujeres de riesgo medio-bajo para que se efectúen según los siguientes criterios:

- Población objetivo: mujeres asintomáticas que sean o hayan sido sexualmente activas, con edades comprendidas entre 25 y 65 años.
- Prueba de cribado: citología cervical.
- Intervalo entre exploraciones: el intervalo recomendado será de 3-5 años.

El diagnóstico precoz o cribado permite detectar lesiones premalignas y, por tanto, prevenir el desarrollo de un cáncer invasor, o bien diagnosticar neoplasias en estadio inicial cuyo tratamiento implica menor morbilidad y mejor supervivencia. Puesto que el objetivo de cribado para la prevención del cáncer infiltrante de útero es la detección de lesiones escamosas de alto grado (HSIL, CIN2/3) los programas existentes buscan hacer más sensible esa detección.

El objetivo final de un programa de cribado de un cáncer es disminuir la incidencia de cáncer invasor en estadios avanzados o sintomáticos, disminuyendo así la morbimortalidad por dicha enfermedad.

Los criterios de pertinencia para considerar una enfermedad susceptible de cribado fueron establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1968 y se han mantenido invariables desde entonces (50):

- problema de salud importante para la comunidad
- enfermedad bien definida y con historia natural conocida
- enfermedad con período de latencia detectable
- existencia de una prueba de cribado validada, simple (aceptable por quien la recibe y por quien la practica), segura, fiable (específica y sensible) y eficiente
- disponer de un tratamiento sencillo, seguro y eficaz de la enfermedad en fase precursora o inicial

Según las características de aplicación se pueden diferenciar dos modelos de cribado:

- cribado oportunista: sólo ofrece la prueba de cribado a las personas que consultan a los servicios sanitarios. La cobertura resulta desigual, beneficiándose las personas que acuden a consulta y penalizando a las mujeres que no consultan. Transcurre normalmente en el ámbito hospitalario. Se realiza en 15 de las 17 comunidades autónomas de España, entre ellas Murcia (18).

- cribado poblacional: dirigido a todas las mujeres de grupos de edad determinados basado en un CENSO POBLACIONAL, lo que garantiza la equidad. Su base asienta en la asistencia primaria.

Recientemente diversas publicaciones que analizan el cribado en los países europeos han concluido que los programas oportunistas son ineficaces, ineficientes y no equitativos, y deberían ser reconducidos a cribados poblacionales. La segunda edición de las *European Guidelines for quality assurance in cervical cancer screening* recomienda también instaurar programas de cribado poblacional (51).

El cribado de mujeres sanas mediante citología cervical ha demostrado claramente su eficacia, puesto que su aplicación de forma adecuada y sistemática en determinados países ha conseguido reducir en un 70-80% la incidencia y mortalidad por CCU. Este beneficio se debe a la detección de lesiones premalignas asintomáticas cuyo diagnóstico y tratamiento evita su progresión a carcinoma invasor (18).

Multitud de estudios prospectivos han demostrado que el cribado periódico con sólo citología es efectiva en la reducción de la incidencia de CCU y en la mortalidad. Múltiples revisiones bibliográficas sobre la exactitud del cribado con citología convencional, encuentran, sin embargo, notables diferencias en su sensibilidad y especificidad. Una revisión exhaustiva de 15 series procedentes de varios países europeos y americanos, hallan una sensibilidad para la detección de CIN2+ del 61,3%, con una considerable dispersión de los resultados (límites 18,6-94) y una especificidad del 93,5% (límites 77,8-99,5) (52,53). La baja reproducibilidad de la citología es lo que da lugar a la gran variabilidad en las cifras de sensibilidad. Es por ello que es necesario un control exhaustivo de calidad diagnóstica, además de la repetición de la toma citológica periódicamente.

El conocimiento del VPH como agente causal de casi la práctica totalidad de los CCU y de sus lesiones precursoras ha permitido establecer un modelo de carcinogénesis basado en la persistencia de la infección por VPH como elemento necesario para el desarrollo de lesiones precursoras y CCU. Por tanto, las pruebas de detección de VPH constituyen un marcador sensible y precoz del riesgo de dichas lesiones, especialmente

en mujeres mayores de 30 años, edad a partir de la cual la prevalencia de las infecciones disminuye, pero las infecciones tienden a ser más persistentes.

Ante la evidencia científica de que la determinación molecular del virus del papiloma humano (VPH) es más sensible, aunque menos específica, que el estudio citológico para el diagnóstico del cáncer de cérvix y de sus lesiones precursoras, algunos países europeos están considerando el cambio del cribado primario citológico al de la determinación de VPH (54,55,56).

Diversas publicaciones han demostrado que en mujeres de entre 30 y 65 años, la estrategia de cribado citológico cada 3 años o la combinación de citología con determinación de VPH cada 5 años obtiene similares resultados. Sin embargo, existen muchas cuestiones pendientes de analizar en los distintos países con algún tipo de cribado (oportunista o poblacional) basado en la citología, y hasta el momento ninguna de las guías nacionales o internacionales de recomendaciones o programas de prevención han implementado el cribado primario por VPH (57,58,59,60).

El equilibrio entre los beneficios (reducción de la incidencia y mortalidad del cáncer) y las desventajas (repetición de consultas, sobretratamientos, complicaciones terapéuticas,..) (61) se tienen en cuenta a la hora de determinar recomendaciones y guías clínicas, de modo que la implementación de cualquier estrategia nueva de cribado debe ir precedida de un diseño detallado con pruebas de factibilidad y estudios piloto que garanticen la sostenibilidad y el mantenimiento del mismo (62).

En la última década, la mayoría de sociedades científicas han incorporado en sus recomendaciones las pruebas de detección del VPH en diferentes ámbitos de la prevención secundaria del CCU (selección de conducta ante citologías anormales, seguimiento postratamiento y cribado):

1. En España, desde 2006, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC), la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y la Sociedad Española

de Citología (SEC) han incluido de forma opcional en sus recomendaciones la utilización de la prueba de VPH en mujeres mayores de 35 años, proponiendo dos posibles estrategias de cribado: combinación de citología y prueba de VPH (prueba conjunta o co-test) cada 5 años o citología exclusiva cada 3 años (63,64).

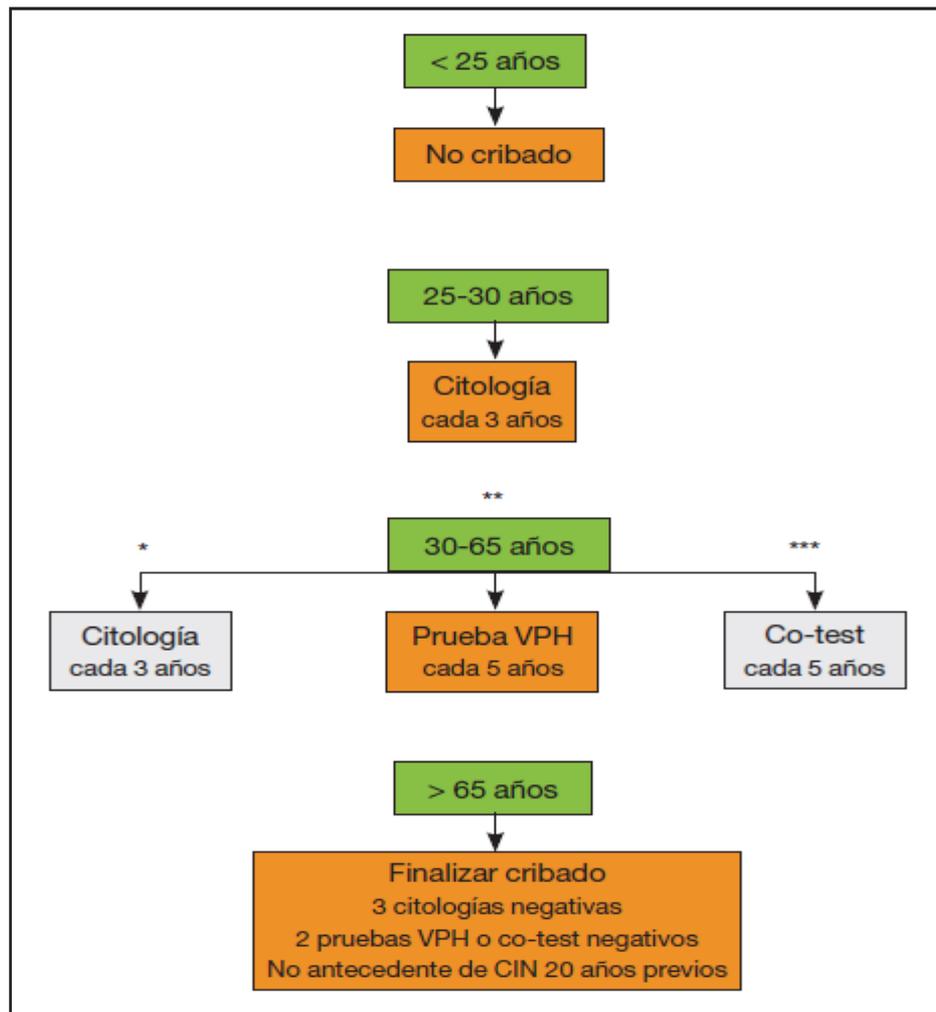


Figura 17. Estrategia de cribado Consenso 2014 SEGO, AEPCC y SEAP

Estas mismas sociedades, después de la última publicación de la GUÍA DEL CRIBADO DE CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO 2014 (18) y tras la

implementación del programa de vacunación contra VPH, recomienda las siguientes actitudes (*figura 17*):

- ✓ aunque la citología cervical exclusiva en el cribado primario continúa vigente, siempre que se cumplan los controles de calidad preceptivos, la transición a cribado con prueba VPH debería ser un objetivo alcanzable en el plazo de 3-5 años para todos los ámbitos del cribado primario del CCU
- ✓ ** La Sociedad Española de Epidemiología (SEE) considera aceptable comenzar la prueba VPH en el intervalo entre 30-35 años
- ✓ *** Globalmente, el co-test no añade mayor rendimiento y eficacia a la prueba VPH-AR como método único, y conlleva un mayor gasto de recursos. La elección del co-test debe tener una finalidad transitoria mientras se incorpora e implementa la tecnología para la detección del VPH. La SEE no favorece el co-test como opción aceptable de cribado

2. EUROPEAN GUIDELINES FOR QUALITY ASSURANCE IN CERVICAL CANCER SCREENING

Estas Guías Europeas, apoyadas por el Programa de Salud de la Unión Europea han sido revisadas nuevamente en 2010 recomendando la política de cribado que se describe a continuación (51):

- Se recomienda utilizar como prueba de cribado la citología. Iniciar el cribado entre los 20 ó 30 años, aunque preferiblemente no antes de los 25 ó 30 años, dependiendo de la carga de enfermedad de la población y de la disponibilidad de recursos. El intervalo de cribado debe oscilar entre 3-5 años hasta la edad de 60-65 años. La finalización del cribado es apropiada en mujeres mayores que tienen tres o más resultados citológicos consecutivos negativos. Se debe prestar atención a aquellas mujeres que no han sido cribadas nunca dado que este hecho es un factor de riesgo de padecer CCU.

- Por el momento, no se recomienda la utilización de nuevas técnicas de cribado que sustituyan a la citología hasta que no se haya demostrado su eficacia. Si bien una disminución en la incidencia de CIN3 es un marcador subrogado de prevención del cáncer de cérvix, la eficacia de estas técnicas de cribado debe estar basada preferentemente en la reducción de la incidencia y mortalidad asociada a esta neoplasia. Se recomienda realizar estudios piloto con pruebas VPH validadas y que se lleven a cabo en el seno de un programa organizado, con una cuidadosa monitorización y evaluación de los resultados, de sus efectos adversos y de sus costes y siendo realizados en mujeres mayores de 30 años para evitar el riesgo de sobrediagnóstico y sobretratamiento innecesarios.
- Ante un resultado citológico de H-SIL, L-SIL persistente o ASCUS con prueba VPH positiva se deberá remitir a la paciente para estudio colposcópico. La conducta ante una L-SIL es difícil de definir dado que ninguna opción en el manejo es óptima. Tanto repetir la citología como remitir a colposcopia son opciones válidas.

La prueba VPH-AR puede utilizarse en mujeres postmenopáusicas.

3. SCREENING GUIDELINES FOR THE PREVENTION AND EARLY DETECTION OF CERVICAL CANCER. AMERICAN CANCER SOCIETY, AMERICAN SOCIETY FOR COLPOSCOPY AND CERVICAL PATHOLOGY, AND AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL PATHOLOGY

Publicadas en el año 2012 (65), suponen una revisión y actualización de las últimas Guías para la detección precoz del CCU de la American Cancer Society publicadas en el año 2002. Los resultados, definidos en base al grado de evidencia disponible, han sido posibles gracias a la participación de seis grupos de trabajo, estando así mismo avalados por la American Cancer Society, la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology y la American Society for Clinical Pathology.

Tabla 1. Recomendaciones de cribado de las Guías de la ASCCP, ACS y ASCP, 2012 (65)

Población	Recomendación	Comentarios
< 21 años	No cribado en ningún caso	<ul style="list-style-type: none"> No evidencia de beneficio del cribado Incremento de sobre-diagnóstico y sobre-tratamiento Promover la prevención primaria mediante vacunación y fomentar medidas de salud (planificación familiar y prevención de enfermedades de transmisión sexual)
21-29 años	Citología cada 3 años	<ul style="list-style-type: none"> No utilizar nunca la prueba VPH-AR Aumentar el intervalo de cribado aumenta el riesgo Reducir el intervalo de cribado aporta un mínimo beneficio e incrementa el número de colposcopias
30-65 años	<ul style="list-style-type: none"> Co-test cada 5 años (opción preferida) Citología cada 3 años (opción válida) 	<ul style="list-style-type: none"> La menor especificidad de la prueba VPH se compensa con el aumento de intervalo de cribado a 5 años Permite aumentar el intervalo de cribado (5 años) con un porcentaje de cáncer incidente similar o más bajo que cuando el cribado se realiza con citología sola cada 3 años La prueba VPH permite incrementar la detección de adenocarcinoma y sus lesiones precursoras No utilizar la prueba VPH como prueba única por posible baja adherencia y dificultad en el manejo de casos VPH positivos Permite aumentar el intervalo de cribado (5 años) con un porcentaje de cáncer incidente similar o más bajo que cuando el cribado se realiza con citología sola cada 3 años
> 65 años	Finalizar el cribado si cribado previo adecuado y negativo	<ul style="list-style-type: none"> Cribado adecuado previo negativo: tres resultados citológicos consecutivos negativos, o dos co-test negativos en los diez años previos, (el último dentro de los cinco últimos años) Tras finalizar el cribado no debe reiniciarse por ningún motivo Antecedente de CIN: proseguir cribado 20 años
Tras histerectomía	No cribado	<ul style="list-style-type: none"> Aplicable a mujeres sin cérvix y sin antecedente de CIN 2+ los 20 años previos
Mujeres vacunadas	No recomendación específica	<ul style="list-style-type: none"> En el futuro el comienzo del cribado será más tardío y los intervalos de cribado mayores. Antes deberá tenerse en cuenta la reducción del riesgo de CIN3 a largo plazo, el impacto en los resultados de la citología y prueba VPH y el efecto en la adherencia al cribado

Las nuevas recomendaciones (*tabla 1*) establecen las estrategias de cribado adecuadas en función de la edad, como novedad incluyen como técnicas de cribado la citología y prueba VPH-AR (co-test), hacen referencia al seguimiento de las pacientes cribadas (conducta en caso de ser positivo el cribado, e intervalos de cribado en el caso de ser negativo), y la edad a la que debe finalizar el cribado, analizan el papel de la prueba VPH-AR como única técnica de cribado y evalúan las estrategias de cribado en población vacunada (66). En resumen, el inicio del cribado sería a los 21 años en todos

los casos, con control citológico cada 3 años hasta los 30 años y a partir de esta edad un estudio de VPH y citología combinado hasta los 65 años.

La ASCCP no recomienda utilizar la prueba VPH como técnica única de cribado como alternativa a la citología o al co-test en base a los siguientes argumentos:

1) falta de estrategias bien definidas para los casos positivos (citología en segunda línea o marcadores moleculares como genotipado viral para VPH 16 o VPH16/18, VPH mRNA o la p16) con tal de evitar el estudio sistemático mediante colposcopia de todos los casos VPH positivos,

2) estimación de un bajo cumplimiento y adherencia por parte de los profesionales ante un cambio tan radical en el protocolo de cribado con importantes implicaciones sanitarias y económicas.

Es a raíz de estas recomendaciones americanas que se publican unas guías de consenso para el manejo de citologías anómalas y de lesiones precursoras, amparadas por 23 sociedades profesionales en Bethesda, la ASCCP (67). Massad y cols. recogen detalladamente el consenso o puesta al día en el manejo de resultados del co-test anómalos, en citologías con inadecuado muestreo de la zona de transformación, en el manejo inicial de los resultados de screening anómalos, en el manejo postcolposcópico, en el manejo de las mujeres entre 21-24 años, y en otros puntos de controversia. En resumen, la mayoría de las estrategias que en este artículo se mencionan incorporan el co-testing para reducir el número de visitas de seguimiento. Las estrategias a base sólo de citología se limitan sólo a mujeres menores de 30 años, aunque según en qué circunstancias a veces el co-testing también se extiende a ese grupo de edad. Las mujeres entre 21-24 años serían manejadas conservadoramente.

4. El Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG), en su última revisión (68) sigue en la misma línea:
 - a. cribado desde los 21 a los 65 años
 - b. sólo citología cada 3 años hasta los 30 años
 - c. co-testing VPH+citología cada 5 años (alternativa: sólo citología cada 3 años)

d. el cribado no se debe realizar sólo y únicamente con determinación de VPH

e. este cribado es independiente de si han recibido la vacunación o no

En la mayor parte de las guías y en base a estudios realizados (69) se aconseja utilizar métodos moleculares ante un resultado citológico anómalo.

I.4. Métodos de cribado del cáncer de cuello uterino

I.4.1. Citología cervicovaginal: Convencional y medio líquido

Como es sabido, el cáncer de cérvix ha disminuido en los últimos años debido a la implementación más o menos sistemática de la citología cérvico-vaginal. Dada la relativa variedad en cuanto a sensibilidad de la citología para CIN2+, el éxito del cribado con citología se basa en la repetición trianual y en dos hechos importantes que hoy en día conocemos (13):

1. La mayoría de HSIL se desarrollan entre 5 y 10 años después de la infección por VPH (70), y
2. El tiempo entre HSIL y el cáncer invasivo es al menos de 10 años y, en algunos casos, más de 30.

Ello explica por qué el cribado ha sido efectivo (71).

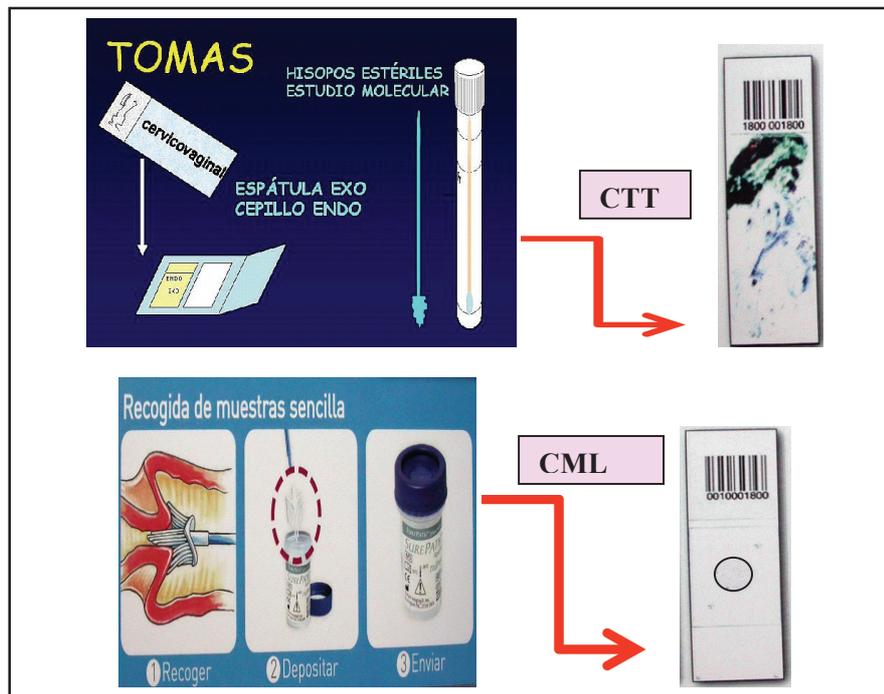


Figura 18. Método de recogida en CTT y en CML

En un intento de disminuir las muestras citológicas inadecuadas, así como la tasa de falsos negativos, se ha evaluado el papel de la citología en medio líquido (*figura 18*) como técnica de cribado frente a la citología convencional (72,73,74).

A) MEDIO LÍQUIDO:

En los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten obtener preparaciones en una sola capa celular, la llamada **citología en monocapa, capa fina o en medio líquido** (75). El material obtenido es conservado inmediatamente tras su extracción en un medio líquido, normalmente de base alcohólica, que permite su almacenaje y transporte y la extensión se realiza en el laboratorio. Los estudios publicados, incluyendo un metanálisis, coinciden en que este tipo de citología disminuye los casos inadecuados para diagnóstico, en los que hay que repetir la toma de

muestra, acorta el tiempo de lectura al microscopio y ofrece un discreto aumento de la sensibilidad (76,77,72,78,79,80,81,82). Para otros autores no se evidencia un aumento significativo en la tasa de detección de lesiones intraepiteliales y por tanto no mejora la sensibilidad de la citología convencional (83). Sí se ha visto que su utilización, junto a criterios de Bethesda, ha aumentado la tasa de diagnósticos de LSIL y ha disminuido el cociente ASC/LSIL (84).

Un valor añadido de la citología en medio líquido es que no se utiliza todo el material para la realización del estudio citológico: el material remanente conservado en el líquido de fijación (durante semanas a temperatura ambiente) permite realizar técnicas adicionales, moleculares, como la determinación de VPH, o de inmunocitoquímica como la detección de p16/KI67, o futuros nuevos marcadores, evitando así una nueva toma y por tanto una visita de la paciente, factor que debe tenerse en cuenta en el cálculo de coste-efectividad de esta técnica (79).

Un estudio reciente sobre la implementación de los programas de cribado en Europa, pone de manifiesto la gran variabilidad de resultados citológicos anómalos observada en diferentes países, oscilando de un 1,2% en Alemania a un 11,7% en la zona oeste de Irlanda, así como su distribución según grados lesionales (85). Por ello, en las European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (51) se insiste en la necesidad de llevar a cabo un adecuado control de calidad en cada uno de los aspectos relacionados con esta técnica (calidad de la toma, lectura e interpretación y procesamiento de la muestra) y utilizar una misma terminología, la Clasificación Citológica de Bethesda de 2001, con la finalidad de obtener un registro adecuado de datos que permita comparar y homogeneizar los resultados.

Existen al menos dos métodos de citología en medio líquido aprobados por la FDA: ThinPrep y Surepath. El test de Citología Líquida SurePath™ es un método alternativo a la citología convencional, basado en la recogida de muestras citológicas en medio líquido, con tecnología exclusiva de enriquecimiento celular para procesamiento y tinción simultáneos de citologías ginecológicas (86).

Este método incrementa notablemente la calidad del diagnóstico citológico, al ofrecer extensiones de elevada calidad morfológica y fácil lectura microscópica (87). Además ofrece la posibilidad de realizar, en una sola recogida, estudios complementarios de trascendencia diagnóstica, pronóstica y/o terapéutica.

El método SurePath™, incorpora un proceso de concentración o enriquecimiento celular (Cell Enrichement™), que consiste en la creación de un sedimento de células de interés diagnóstico. A través de este exclusivo procedimiento que combina la dispersión gravitatoria y la centrifugación, se separa por medio de un gradiente de densidad, el material diagnóstico, de los elementos enmascaradores frecuentes en muestras ginecológicas (88), como el moco y la sangre.

Características principales del SurePath® Pap Test (89):

- ✓ Recolección de la muestra en medio líquido
- ✓ 100% de la muestra obtenida se procesa en el laboratorio
- ✓ Procesamiento basado en concentración y purificación celular
- ✓ Muestras procesadas y teñidas en un mismo proceso
- ✓ Muestras representativas, bien fijadas y conservadas
- ✓ Extensiones homogéneas, células dispuestas en capa fina, fondo limpio, superficie de diámetro 13 mm
- ✓ Estructura celular intacta, buena visualización de los detalles nucleares
- ✓ Material remanente para repeticiones y técnicas complementarias (ICQ, PCR, CH, Citometría, etc) (90).

Se recomienda el uso de la citología en medio líquido sobre la citología convencional basado en que:

- ✓ Requiere menor tiempo de lectura citológica
- ✓ Reduce los errores interpretativos al disminuir el cansancio del observador
- ✓ Permite la lectura automatizada (91)
- ✓ Disminuye el número de muestras insatisfactorias. Si bien se confirma una disminución en el número de muestras inadecuadas, no se evidencia un aumento significativo en la tasa de detección de lesiones intraepiteliales y por tanto no mejora la sensibilidad de la citología convencional (85).

- ✓ Facilita la lectura por el fondo limpio y la disposición homogénea de las células
- ✓ Aunque el coste es mayor, la posibilidad de evitar una segunda consulta y toma de muestra para VPH, al permitir el estudio “réflex”, equilibra el gasto.
- ✓ Mejora la eficiencia.
- ✓ Disminuye la relación ASC/LSIL, al aumentar los diagnósticos de LSIL (92).

I.4.2. Métodos de detección del VPH:

La variabilidad observada en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad de la citología ha dado lugar a que en los últimos años se haya analizado el papel de la prueba VPH en la prevención secundaria del cáncer de cérvix (93,94), ya sea asociado a la citología (95)(co-test) o como técnica inicial de cribado. Múltiples ensayos randomizados demuestran que la prueba VPH es más sensible para la detección de CIN3, si bien la especificidad y por tanto el valor predictivo positivo demostrado son menores, sobre todo en mujeres jóvenes menores de 30 años, donde la prevalencia de infección transitoria es alta.

Una revisión sistemática llevada a cabo recientemente en la que se actualizan los datos disponibles (58), objetiva cómo combinando citología y prueba VPH (co-test) como técnica de cribado se incrementa ligeramente la sensibilidad a expensas de una pérdida en especificidad cuando cualquier prueba es positiva y se remite a la paciente a colposcopia, comparado con la realización única de la prueba VPH. La diferencia en el riesgo acumulado de CIN3+ o cáncer utilizando co-test versus prueba VPH sola es baja.

Por tanto, la evidencia disponible pone de manifiesto como, en caso de ser realizado con una técnica clínicamente validada, la prueba VPH-AR es más eficaz que la citología en el cribado primario en mujeres mayores de 30 años, y que en los casos en los que la prueba es negativa el intervalo de cribado se puede extender con seguridad a 5 años. En los casos en los que la prueba es positiva se puede utilizar para la selección bien la citología o bien el genotipado para VPH16/18. De cualquier forma las posibles

ventajas ofrecidas por la incorporación de la prueba VPH en el cribado serán objetivadas siempre y cuando exista un programa bien organizado, con buena cobertura poblacional y políticas de selección o evaluación bien establecidas en los casos en los que la prueba sea positiva.

Es esperable que en un futuro próximo la determinación de VPH-AR se implemente como método primero de screening (63). Sin embargo, sólo una fracción de las mujeres con VPH-AR desarrollarán una lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Una serie de factores han sido identificados como moduladores de esta persistencia/progresión de la infección por VPH (60), como es el tipo de VPH, ya que el tipo 16 presenta un riesgo acumulado de producir CIN2 o superior, a 10 años, de algo más del 20%; frente a un 17% del tipo 18. El resto de los tipos de alto riesgo de VPH, de entre el 1 y el 2%. Por eso, es urgente encontrar biomarcadores que sí puedan detectar esas lesiones y que puedan ser aplicados sobre los especímenes citológicos (96).

Tabla 2. Pruebas para la detección de VPH aprobadas por la FDA para su utilización en el cribado poblacional (18)

Hybrid Capture® 2 (HC2) HPV DNA Test (QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD; USA) US FDA (2003)
Cervista® HPV HR Test (Hologic, Madison, WI, USA) US FDA (2009)
Cobas® 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, USA) US FDA (2011)
APTIMA® HPV Test (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA) US FDA (2011)

A continuación se describen más detalladamente los métodos de detección de VPH aprobados por la FDA (*tabla 2*) como métodos de cribado del CCU junto con la citología (97,98,99).

- Métodos en los que no se realiza amplificación

- **CAPTURA DE HÍBRIDOS**

La Captura de Híbridos (Hibryd Capture 2 o HC2) es el método más contrastado y experimentado y que cuenta con mayor número de referencias en la literatura (unas 8.000). Esta técnica de hibridación utiliza una secuencia complementaria de ARN, en lugar de ADN, lo que le confiere una alta sensibilidad. Este método sólo se aplica sobre células en suspensión no permitiendo su uso en muestras tisulares. Se trata de un método no automatizado que permite detectar la presencia de 13 tipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) sin indicar el genotipo específico. El marcaje de los híbridos se realiza mediante un producto luminiscente, por lo que para la lectura se utiliza un luminómetro. El resultado es por tanto cualitativo (positividad o negatividad para VPH-AR) y también semicuantitivo (intensidad de la reacción medida en unidades relativas de luz o URL) lo que significa una estimación de la carga viral o cantidad de virus presente en una muestra determinada (18). Este método es muy adecuado para el cribado por su alta sensibilidad clínica. Debido a que es la técnica más contrastada, muchos autores recomiendan utilizar el HC2 como estándar de oro para realizar estudios comparativos de los nuevos métodos de cribado (97). Sin embargo es un método relativamente poco reproducible en la llamada “zona gris”, que afecta a los resultados alrededor del punto de corte (positivo/negativo). Parece que esto se debe, al menos en parte, a un número no despreciable de reacciones cruzadas con VPH-BR (100) que dan lugar a un pequeño número de falsos positivos. Sin embargo este aspecto parece ser poco importante desde la perspectiva del cribado poblacional (100,101).

- **CERVISTA**

Es una técnica automatizada de detección del VPH basada en la hibridación, que únicamente permite analizar muestras de citología líquida no pudiendo utilizarse en

muestras tisulares. Detecta la presencia de 14 tipos de VPH-AR en tres grupos diferentes (Mix 1: 51, 56, 66; Mix 2: 18, 39, 45, 59, 68 and Mix 3: 16, 31, 33, 35, 52, 58). Tras la extracción del ADN se aplica el test de Cervista™ que realiza la lectura mediante un método denominado “invader”, basado en una reacción luminiscente. El resultado informa de la positividad o negatividad para VPH-AR pero no informa de la carga viral. Es muy sensible y adecuado para el cribado. No existe experiencia en lo referente a la llamada zona gris, pero no se conocen reacciones cruzadas con VPHBR. Para tipificar los VPH presentes debe procederse a una segunda prueba (100).

- Métodos en los que se realiza amplificación del ADN vírico (métodos basados en la PCR)

Estos métodos se basan en la amplificación del ADN del virus (102) mediante la aplicación de unos cebadores (*primers* en inglés) complementarios de secuencias del ADN vírico que, en ciclos de altas y bajas temperaturas y gracias a la acción de polimerasas del ADN, permiten obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Estas técnicas pueden utilizarse en cualquier tipo de muestra, células en suspensión, células sobre portaobjetos o cortes de muestras histológicas (103).

Estos métodos son extraordinariamente sensibles pero pueden tener problemas de especificidad dado que ocasionalmente se detectan secuencias similares pero no exactas al ADN problema (falsos positivos).

El método más utilizado es la “PCR consenso”, en la cual se amplifica una región con secuencia muy similar entre todos los VPHs para, posteriormente, por métodos de hibridación específica, enzimáticos o de secuenciación de ADN, realizar el genotipado específico del virus. El primer cebador que se popularizó fue el que usa como diana de amplificación la región común L1, utilizando los “primers” MY09 y MY11 (103). El amplificado generado es de aproximadamente 450 pares de bases. Después se han diseñado variantes como PGMY09/11, GP5/GP6 o su variante GP5+/GP6+, SPF10...a menor región para amplificar, mayor es la sensibilidad para detectar la presencia del VPH.

Fuera ya de los métodos reconocidos por la FDA para screening, se encuentra el sistema CLART2HPV (104), que consiste en un método semiautomatizado de genotipado viral basado en la amplificación de oligonucleótidos (*primers*) por acción de la polimerasa, detectando 35 genotipos (20 de alto riesgo y 15 de bajo riesgo). Es el método que aquí se ha utilizado para el genotipado viral tras la positividad que arrojó el método de la captura de híbridos, para el objetivo 3º del estudio actual, sobre tejido embebido en parafina (TEP) . Determinar el tipo de VPH-AR es un instrumento muy válido para marcar el riesgo de presentar CIN2+ en el seguimiento (60).

➤ **COBAS 4800**

Se trata de un método comercializado de detección del VPH basado en PCR en tiempo real (105) y disponible para material conservado para citología en medio líquido, no pudiendo utilizarse material histológico procesado en parafina. Es un método automatizado que informa si la muestra es positiva o negativa para VPH-AR y, en casos positivos, indica si está presente el VPH16, el VPH18, u otro de los siguientes VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). La técnica proporciona información sobre carga viral. En los resultados positivos no se han observado reacciones cruzadas con VPH-BR (106).

Muestra una elevada sensibilidad clínica, por lo que es adecuada para su utilización en el cribado poblacional (107).

- Métodos de detección de ARN-VPH.

➤ **APTIMA**

Aptima es un sistema automatizado que permite la detección de 14 tipos de VPH-AR mediante análisis del ARN mensajero viral de las oncoproteínas E6 y E7 en citología en medio líquido. En los estudios publicados el método ha demostrado ser tan sensible como HC2, Cervista y Cobas 4800, pero algo más específico. Está aprobado por la FDA y validado en la plataforma Panther, como co-test y para la selección de las citologías ASCUS (18).

I.4.3. Técnicas moleculares para proteínas del ciclo celular

La determinación de VPH de alto riesgo posee una alta sensibilidad para detectar lesiones cervicales de alto grado pero su baja especificidad (que viene condicionada fundamentalmente por la alta prevalencia de infecciones no persistentes) obliga a buscar marcadores (108,109,110) que orienten acerca de qué porcentaje de las citologías anormales implican una lesión de alto grado subyacente, sobre la que hay que tomar una conducta clínica (111,112,113).

Schiffman-Solomon (114) ya determinaron el problema del triaje en las lesiones denominadas “*lower anogenital squamous terminology*” (LAST), y cómo era necesario unir el resultado citológico con la determinación viral al menos para predecir aproximadamente qué porcentaje de lesiones intraepiteliales de alto grado habría ocasionado.

Por eso, hoy en día se están planteando biomarcadores que ayuden (p16/ki67,..) que intervengan en las vías moleculares tempranas o tardías de la carcinogénesis (115):

- * Marcadores de regulación del ciclo celular (116): p53, p21, bax, pRb, p16^{INK4A}, p27, MCM2 y TOP II α (ProExTM C), (117,118,119), ciclina D1, ciclina A, ciclina E (98).
- * Marcadores de proliferación celular: PCNA, c-myc, Ki-67 (MIB-1)
- * Marcadores de apoptosis : telomerasa, survivina
- * Marcadores de transcripción : Skn-1, Oct-1, AP-2, NFkappaB
- * Marcadores de vías celulares de señalización
- * Marcadores de infección VPH: proteína L1 de la cápside (120)

Recientemente se ha evidenciado que algunos biomarcadores pueden ser detectados inmunohistoquímicamente (121) y, por tanto, pueden ser evaluados en un examen citológico:

- La **p16** como marcador único aumenta la sensibilidad y la especificidad para la detección de lesiones premalignas en comparación con la citología convencional (122,123,124). Está considerada como una proteína celular involucrada en el

control del ciclo celular, como un FRENADOR DE CICLO. Produce un efecto antiproliferativo en células fisiológicamente normales. Su sobreexpresión está directamente ligada a la transformación oncogénica en las células cervicales inducidas por las infecciones por VPH-AR (125), y es independiente de la edad de la paciente así como del tipo de VPH-AR.

La tinción positiva es nuclear y citoplasmática (126,119), y se asocia significativamente con el riesgo de progresión a CIN de alto grado (127). La positividad de una lesión CIN1 obligaría a un seguimiento más estrecho (128), puesto que a veces la lesión neoplásica de alto grado ya está presente (129). Sin embargo, otros autores piensan que diagnosticar CIN2+ no debe basarse únicamente en la p16 (130).

Algunos autores incluso han valorado el coste-beneficio de realizar la técnica en la citología líquida (131).

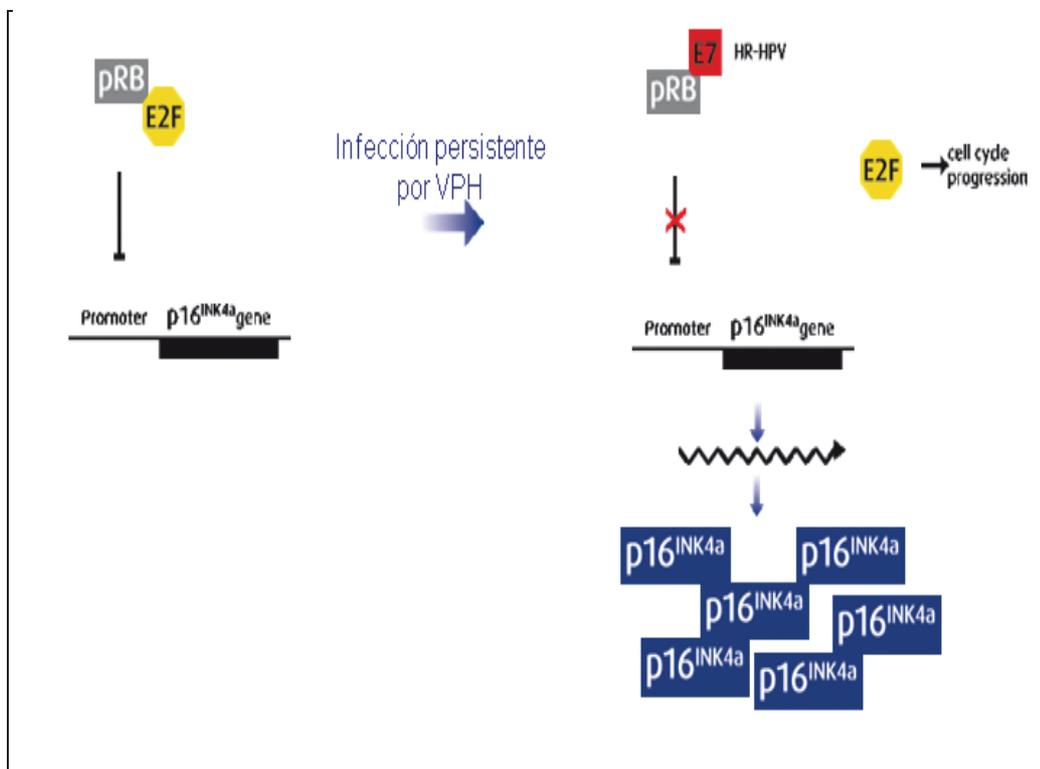


Figura 19. Mecanismo molecular de acción de la p16

Se ha comparado (132) también en términos de sensibilidad y especificidad con los tests de captura de híbridos para VPH (133), con alto VPN (134).

En condiciones fisiológicas normales, p16 actúa junto a otro gen supresor del retinoblastoma (pRb), controlando el paso a la fase síntesis de la célula (115). Cuando el VPH-AR infecta la célula huésped su oncoproteína viral E7 bloquea y “despega” al factor de transcripción E2F de pRB (*figura 19*), lo que promueve la progresión del ciclo celular. El feedback por tanto se pierde y se produce sobreexpresión de p16 (135).

Sin embargo, la presencia de células normales positivas para p16 (como las células endocervicales y las células metaplásicas) obliga a utilizar criterios morfológicos (136).

- ✓ Un segundo biomarcador válido de proliferación celular es el **ki-67**. Es una proteína celular que puede ser detectada en células en proliferación, en todas las fases de división celular (G1-, S-, G2 y M), pero no en células inactivas ya que está ausente en fase G0 del ciclo celular.

- ✓ La unión de los dos biomarcadores antes mencionados en una misma técnica ha dado lugar a la denominada **tinción dual p16/ki67**, comercializada como CINtec® PLUS kit, que consiste en un ensayo inmunocitoquímico para determinar cualitativamente y de manera simultánea las proteínas p16^{INK4a} y ki67 en preparaciones citológicas cervicales, que puede ser aplicada tanto en citología convencional como líquida. Es positiva la co-detección de p16 y ki-67 en la misma célula.

Anteriormente a la unión de ambos marcadores se empezaron a usar en el mismo tejido pero independientemente, valorándose en conjunto. En concreto, en lesiones anales por VPH (137) y su relación con la determinación viral.

Las células con tinción positiva (*figura 20*) para ambas proteínas muestran:

- Tinción marrón citoplasmática, indicando sobreexpresión de p16
- Tinción roja nuclear, indicando expresión de ki-67

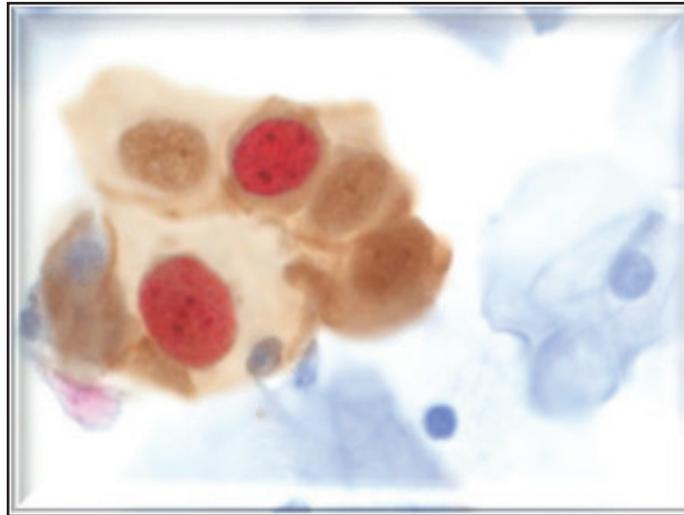


Figura 20. Célula positiva para tinción dual p16/ki67

El CINtec® PLUS Kit detecta y tiñe dos biomarcadores:

1. La proteína p16^{INK4a} (p16), que tiene una función crucial en la regulación del ciclo celular eucariótico, siendo parte del control mediado por la proteína retinoblastoma (pRB) de la transición de las fases G1 a S y provoca la detención del ciclo celular durante el proceso de diferenciación celular, por tanto tiene un efecto antiproliferativo cuando se expresa durante la progresión del ciclo celular.
2. La proteína Ki-67, un marcador de proliferación celular, presente en todas las fases y en las mitosis, pero solo detectable en el núcleo de las células, durante la proliferación.

Como las células con sobreexpresión de p16^{INK4a} sólo pueden proliferar activamente si su sistema de control del ciclo celular está dañado, la expresión del marcador de proliferación celular ki-67 y del marcador p16^{INK4a} dentro de una misma célula se deberían de excluir mutuamente bajo condiciones fisiológicas normales. Por lo tanto, la expresión conjunta de p16^{INK4a} y Ki-67 en determinadas células se podría considerar como un indicador de desregulación del sistema de control del ciclo celular de estas células.

Algunos de los posibles beneficios de la utilización de estas técnicas que se han propuesto podría ser:

1. Aumentar la precisión para detectar lesiones de alto grado en comparación con la citología
2. Constituir una herramienta realmente útil para el manejo eficiente de mujeres con citología de LSIL (lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado)(138)
3. Reducir el porcentaje de falsos positivos en el manejo de mujeres con citología ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), independientemente de su edad
4. Ser una opción eficaz para el manejo inmediato de mujeres con citología negativa y VPH positivo (*figura 21*)

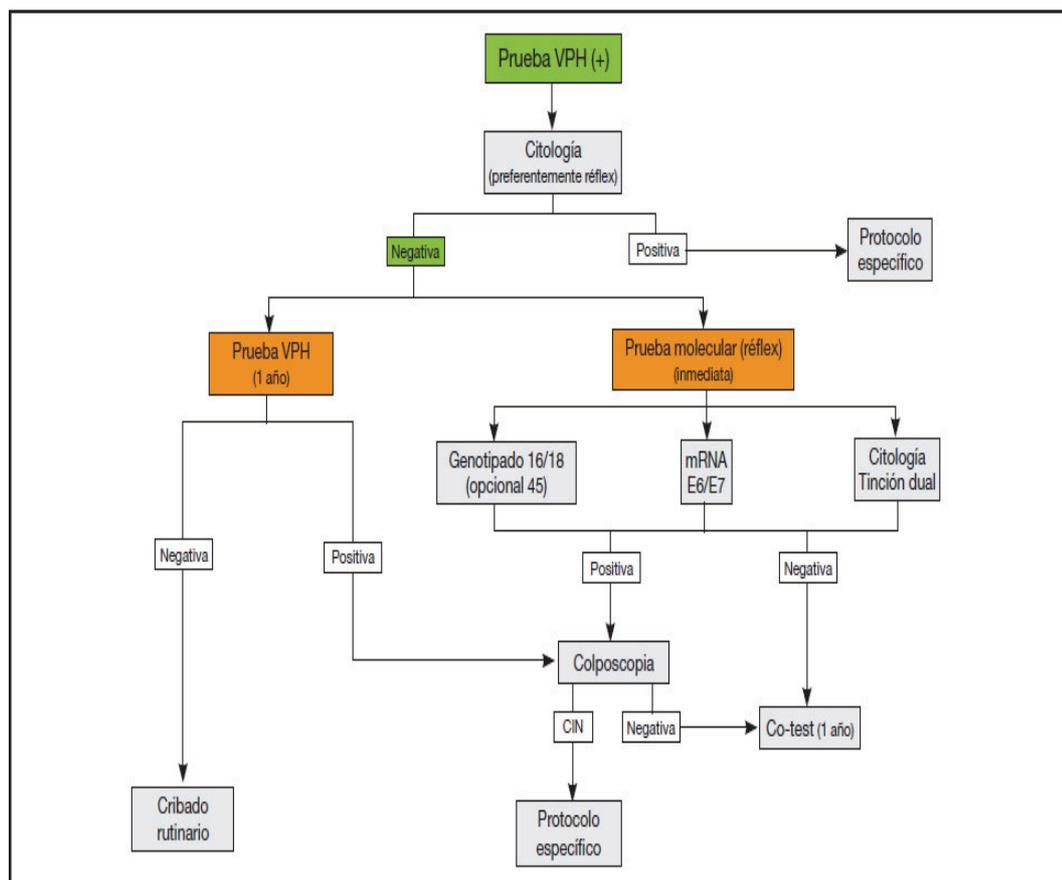


Figura 21. Algoritmo propuesto para el manejo clínico de mujeres con prueba de detección del virus del papiloma humano positiva y citología negativa (18)

5. Un resultado positivo a CINtec® PLUS es un claro indicador de que esa mujer debe ser remitida a colposcopia (139).
6. Se ha visto también su utilidad en el triaje de citologías anormales en pacientes embarazadas, con alta sensibilidad para lesión CIN2+ subyacente (140).

TINCIÓN DUAL P16/Ki-67

- 1) PROCEDIMIENTO (figura 22): CINtec® PLUS kit contiene un grupo de reactivos para la detección inmunocitoquímica de los antígenos p16^{INK4a} y ki-67. Para la detección de los antígenos se emplea un anticuerpo primario de ratón monoclonal, clon E6H4TM, frente a la proteína humana p16^{INK4a} y un anticuerpo primario de conejo monoclonal, clon 274-11 AC3, frente a la proteína humana ki-67.

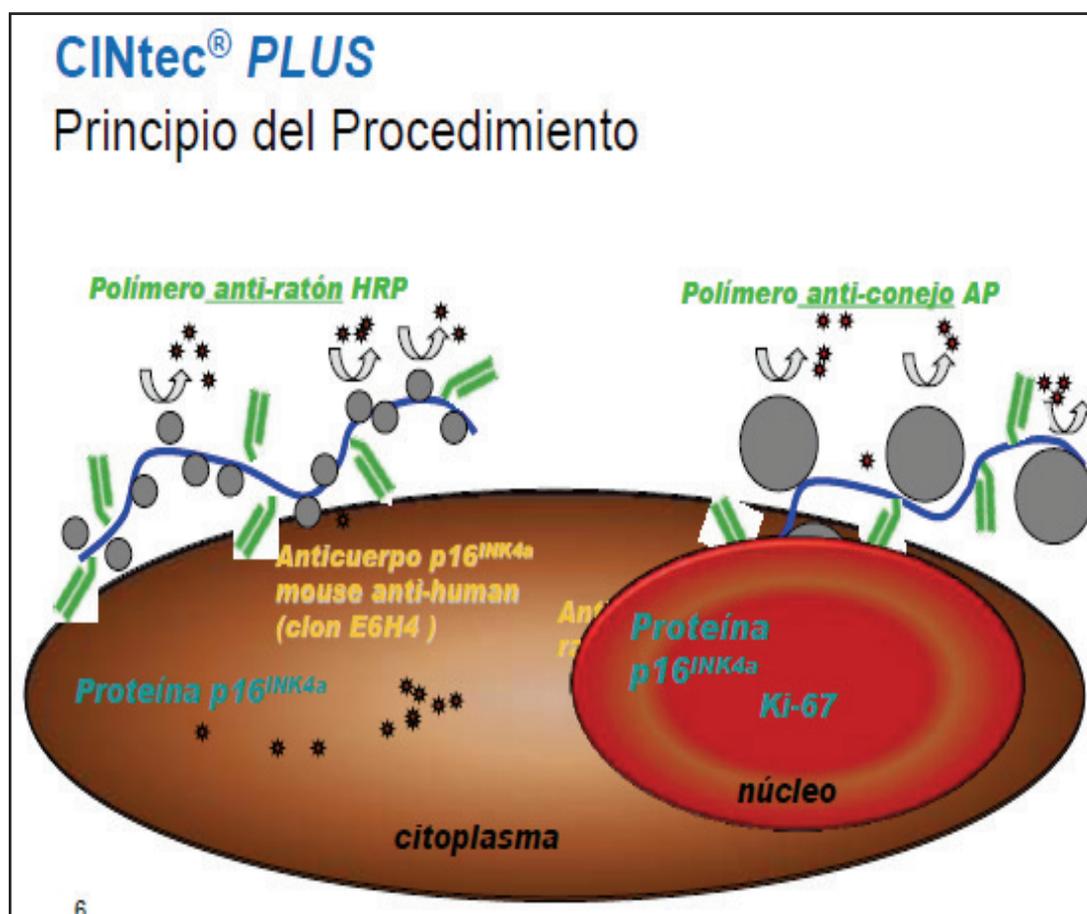


Figura 22. Base científica o principio de procedimiento

2) INTERPRETACIÓN: La positividad de la tinción dual p16/ki-67 sirve de marcador subrogado de la desregulación del ciclo celular secundaria a la infección transformante por VPH. Su gran ventaja es que no precisa de interpretación morfológica de las características nucleares, por lo que se considera positiva cualquier citología con al menos una célula con tinción citoplasmática para p16 (marrón) y tinción nuclear para Ki67 (roja). Actualmente la p16 aislada para citología se ha retirado del mercado y se ha reemplazado por la tinción dual. Dicha técnica se basa en la citología, combinada con los conceptos moleculares adquiridos en los últimos años.

Ya hemos comentado anteriormente que la acción de las oncoproteínas virales E6 y E7 (*figura 23*) consigue que las células proliferen y adquieran el fenotipo carcinogénico (13), demostrándose con esta técnica la proteína proliferada Ki67 y la proteína sobreexpresada p16.

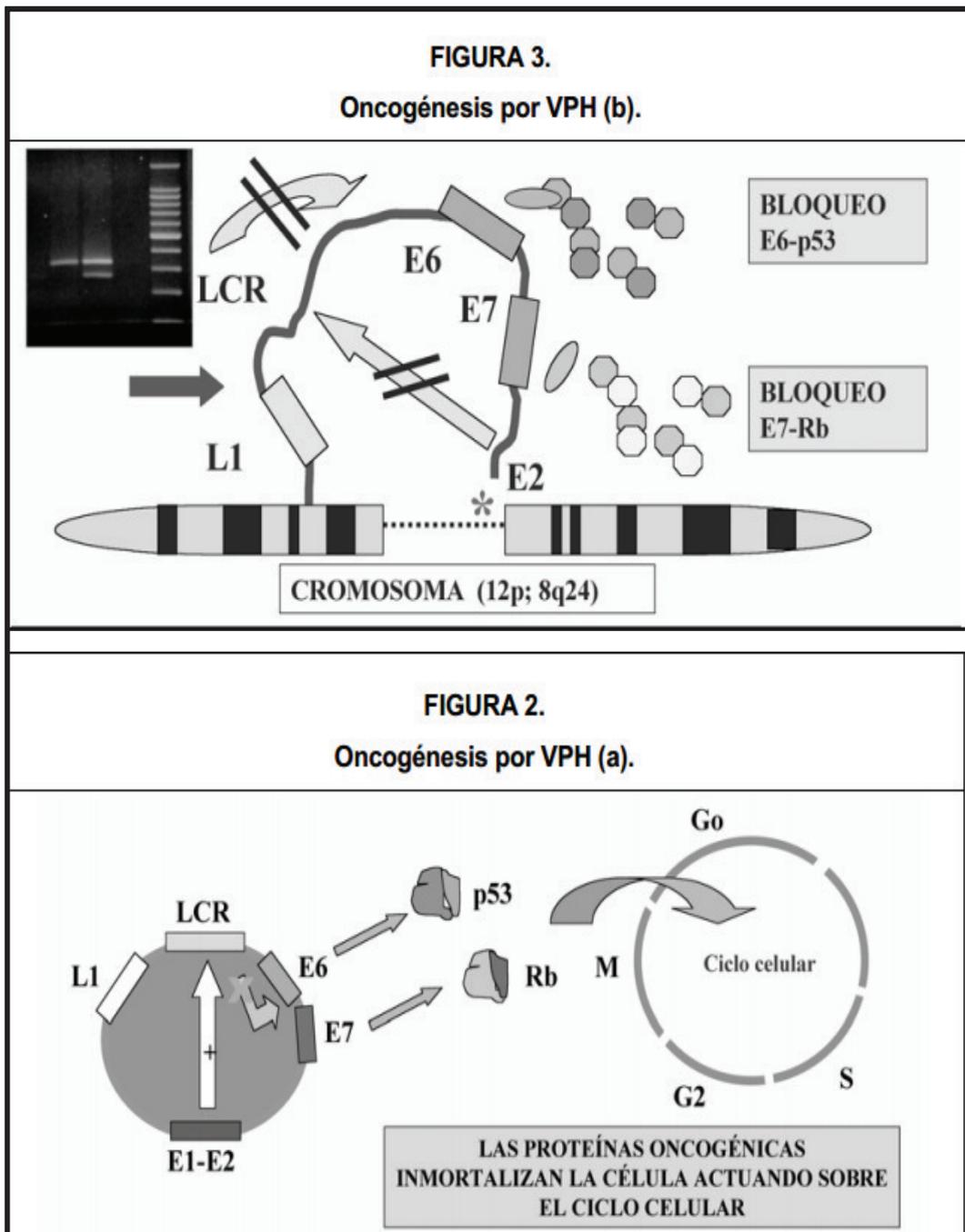


Figura 23. Oncogénesis por VPH (modificada de 27)

- 3) SIGNIFICADO CLÍNICO: La experiencia desarrollada hasta el momento, es que aplicando esta doble tinción inmunohistoquímica sobre extendidos citológicos, la positividad de UNA SOLA CÉLULA, muestra la misma sensibilidad para CIN2+ que la detección de VPH con captura de híbridos, y la misma especificidad que la citología (141). Ello sucede en general y en las pacientes menores y mayores de 30 años. Asimismo puede usarse como triaje en casos de ASCUS dado que presenta la misma sensibilidad y mayor especificidad para CIN2 que la detección de VPH mediante HC2. Podría usarse también para triaje de LSIL, pero con menor eficiencia que para ASCUS (13). Hay estudios muy novedosos en ASCUS y ASC-H (142,143) sobre el aumento de detección de lesiones CIN2+.
- 4) EXPECTATIVAS DE FUTURO: La tinción dual p16/Ki67 en citología constituye, por tanto, una de las pruebas más prometedoras para identificar lesiones cervicales premalignas (111, 141, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154). En la actualidad se han publicado diversos estudios en los que, a pesar de las notables diferencias en los criterios de inclusión, se observa una sensibilidad y especificidad muy altas (aproximadamente del 90% y 80% respectivamente). La sensibilidad es significativamente mejor en las muestras preparadas con ThinPrep que en extensiones convencionales o preparadas con SurePath (141). La tinción dual p16/Ki67 ha demostrado ser particularmente útil (*figura 24*) en la selección de las pacientes con citología de ASC-US y LSIL (155) y en casos con prueba VPH positiva y citología negativa (147,156). La alta sensibilidad y especificidad se observa especialmente en mujeres mayores de 30 años, pero también por debajo de esta edad (a pesar de la elevada frecuencia de infecciones VPH transitorias en este colectivo). Un estudio destaca que la valoración de criterios morfológicos e inmunohistoquímicos incrementa de

forma notable la especificidad de la técnica, lo que puede ser especialmente útil en mujeres jóvenes (146).

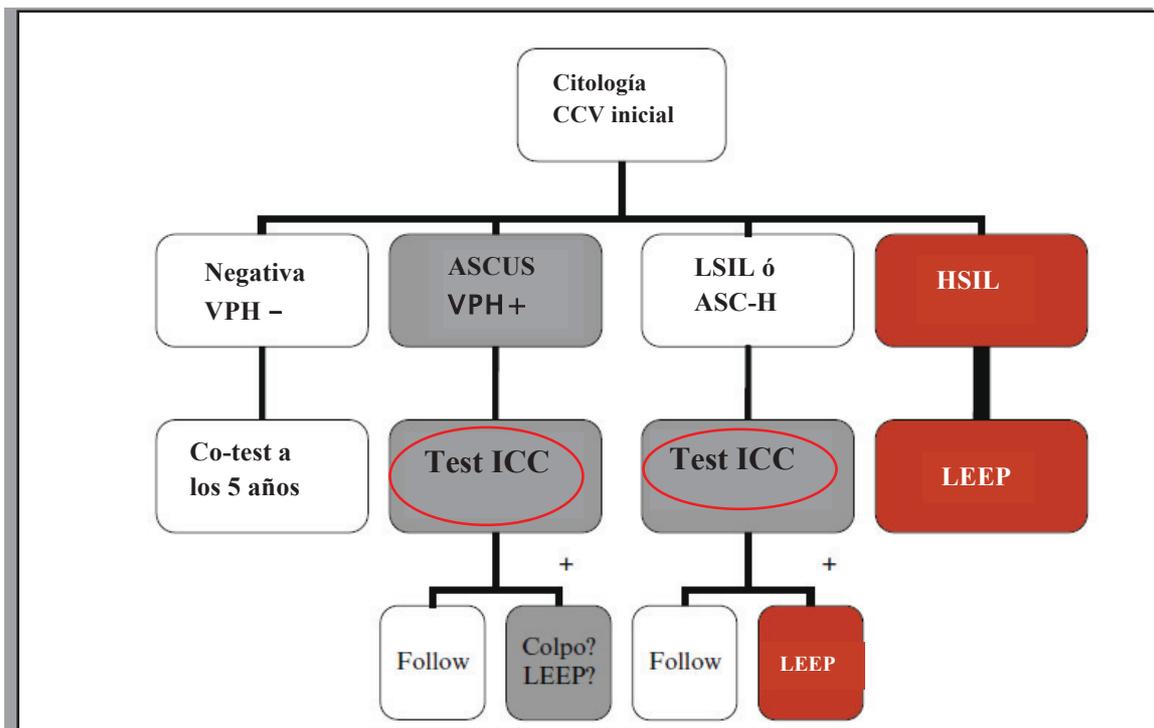


Figura 24. Probable manejo clínico de lesiones citológicas ASC+ con la introducción de test inmunocitoquímicos (modificada de 109)

- 5) ESTUDIOS REALIZADOS: Se han realizado estudios en mujeres que acuden al cribado citológico de rutina (157), en selección de mujeres con ASC-US y LSIL (estudio PALMS, confirmado posteriormente en 158), (159), en mujeres con resultados citológicos ASCUS ó LSIL (estudio EEMAPS) , y en mujeres con resultado negativo en la citología pero positivas al test de VPH-AR (estudio WOLFSBURG).

- ✓ Citología LSIL: el 12-28% (52) de las mujeres con citología de LSIL son portadoras de lesión de alto grado (CIN2+); el remitir a colposcopia a todos los LSIL lleva a un alto nivel de sobreintervención y falsos positivos ya que una positividad del 80-85% al test de VPH-AR en LSIL (145), hace que estos tests sean ineficaces para la selección de pacientes que precisan estudio colposcópico, y más teniendo en cuenta que en sólo el 12-28% de esas pacientes se confirma histológicamente el CIN2+ (145)
- ✓ Citología ASC-US: en torno al 11% de las mujeres con citología ASC-US son portadoras de un CIN2+ (145); o se le repite citología, o se remite a colposcopia o se realiza test VPH en función de la edad. El aplicar la tinción dual reducirá el porcentaje de falsos positivos en el manejo de mujeres con citología ASC-US, independientemente de su edad
- ✓ También se ha publicado algún estudio (160) sobre la utilidad de la tinción dual p16/ki-67 en el manejo de las lesiones glandulares de cérvix, con resultados aparentemente prometedores, aunque concluyen en que deben basarse, en ese tipo de lesiones, también en la morfología celular de las células teñidas
- ✓ Se ha aplicado también en mujeres tras 1 año con VPH positivo y alteraciones citológicas (161)

6) CONSIDERACIONES TÉCNICAS A TENER EN CUENTA (144):

- ✓ Un resultado positivo requiere un núcleo teñido de cromógeno rojo y un citoplasma teñido con cromógeno marrón. El fondo queda en hematoxilina
- ✓ La evaluación de la morfología es necesaria para excluir metaplasias escamosas, metaplasia tubárica y células endocervicales que pueden teñirse individualmente para p16 o Ki-67. Sólo células con doble tinción con cromógenos rojo y marrón son consideradas positivas
- ✓ La interpretación de CINtecPLUS puede tener dificultades añadidas, según el método de citología en medio líquido usado (143)
- ✓ Waldstrøm et al (149) comprobó la buena reproducibilidad de la interpretación de la positividad/negatividad de la técnica, que no depende de la morfología como sí ocurría con la interpretación de p16 sólo
- ✓ La interpretación de la técnica dual no requiere de contajes de células positivas, aunque sí se ha demostrado que a mayor número de células positivas mayor grado de severidad de la lesión histológica (162)
- ✓ La adición de criterios morfológicos a la valoración inmunohistoquímica incrementa de forma notable la especificidad de la técnica (146)

I.5. Histopatología de la infección por el VPH en el cérvix:

La biopsia es en la actualidad el “gold standard”, el método de referencia para diagnosticar y clasificar adecuadamente las lesiones VPH cervicales (163), vulvares, vaginales, del pene, del canal anal y de cabeza y cuello. A nivel de patología cervical es el proceder recomendado ante un diagnóstico de lesión escamosa intraepitelial LSIL+, AGC+, ASC-H y ante una sospecha citológica de neoplasia infiltrante.

Algunos patólogos utilizan el Sistema Bethesda para clasificar las lesiones escamosas intraepiteliales en material histológico, aunque conviene recordar que esta nomenclatura fue concebida para el manejo exclusivo de citologías cérvico vaginales. El sistema más utilizado en la actualidad sigue siendo el sistema CIN, aunque también es cierto que el sistema Bethesda y el sistema CIN son usados por algunos citopatólogos indistintamente para biopsias y citologías (*figura 25*).

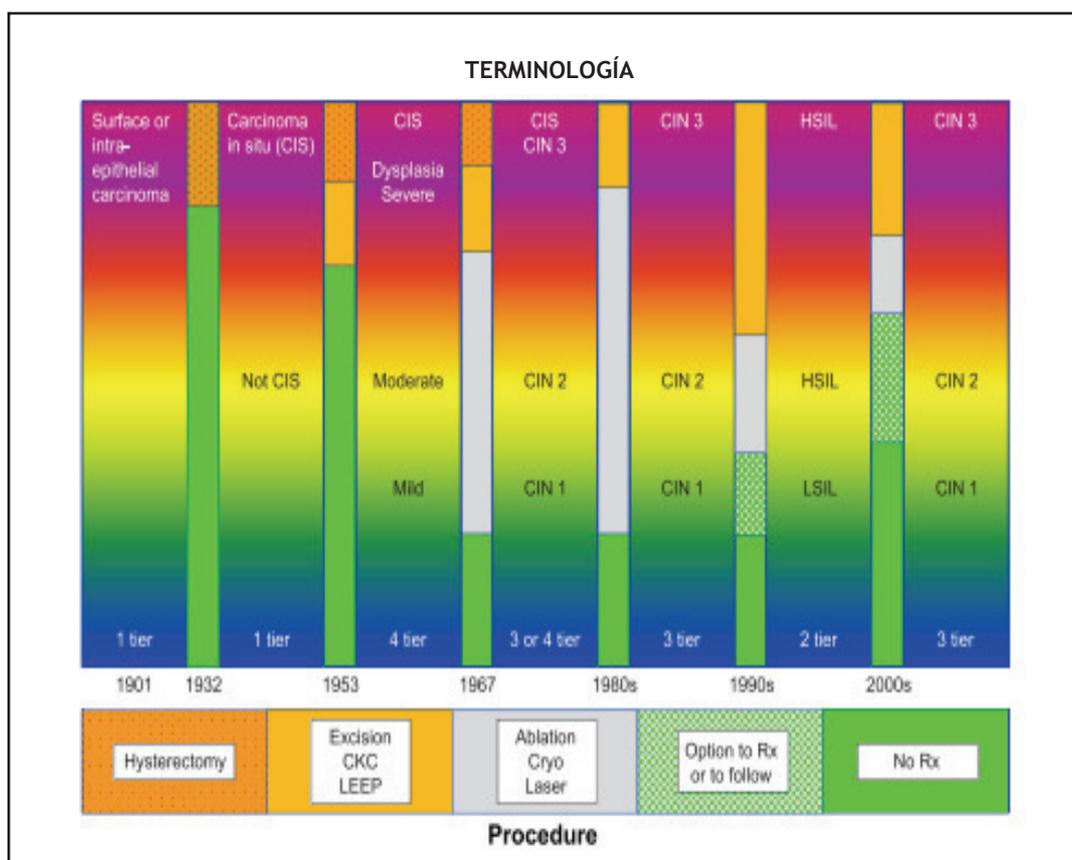


Figura 25. Cambios en la terminología y grados de lesiones precancerosas cervicales a la largo de la historia (modificado de 165)

Actualmente se acepta el sistema binario para lesiones intraepiteliales dividiendo las lesiones en bajo y de alto grado (*figura 26*) (34,164,165,166,167,168) porque es más reproducible (169) que el sistema CIN en CIN 1, CIN 2 Y CIN 3. Actualmente se la conoce como estandarización LAST (lower anogenital squamous terminology) propuesta por Darragh y col. (165):

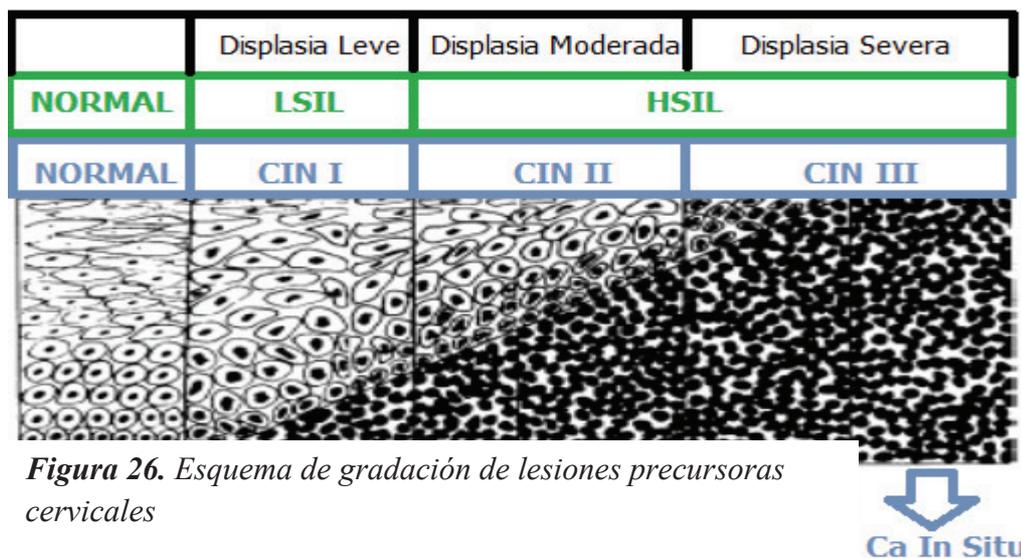


Figura 26. Esquema de gradación de lesiones precursoras cervicales

- **LSIL** (coilocitosis o condiloma plano o **CIN 1**): proliferación de células basales/parabasales-like limitadas a 1/3 del espesor epitelial, con algunas mitosis al mismo nivel. Los cambios citopáticos virales se “quedan” en el 1/3 superior del epitelio (*figura 27*). Un método muy adecuado para objetivar el espesor del epitelio cervical anómalo es practicar una tinción inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti-p16^{INK4a} (165), limitándose la inmunotinción al 1/3 basal, o inexistente, o sólo citoplásmico.

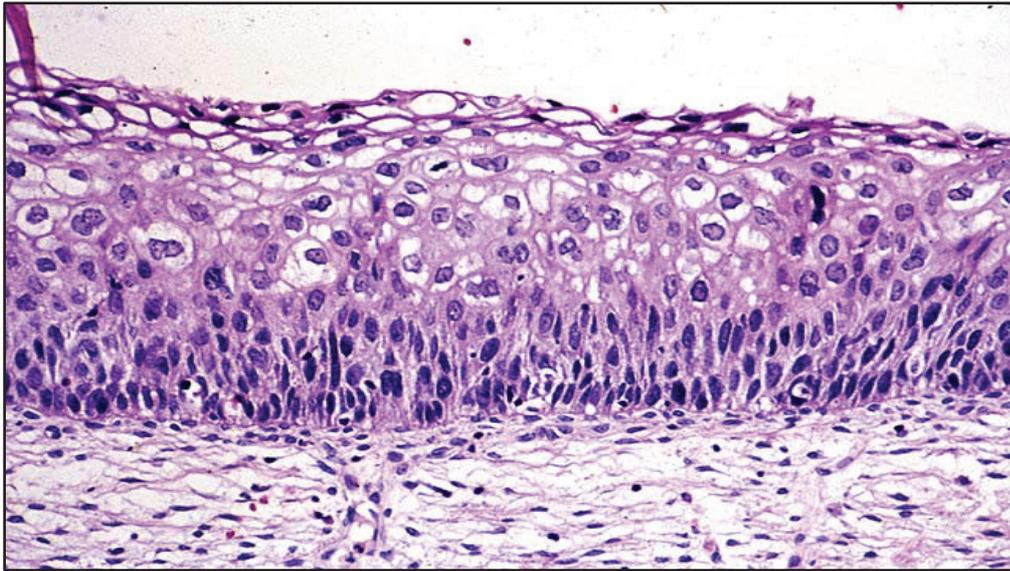


Figura 27. Displasia epitelial leve (CIN1, LSIL)

- **HSIL** (sinónimos: **CIN 2**, **CIN 3**, displasia escamosa moderada, displasia escamosa severa, carcinoma escamoso in situ) (34): aquí se acepta que es el CIN 2 (*figura 28*) el que tiene peor valoración interobservador, y que en muchas biopsias en su seguimiento tienen al final CIN 3 (*figura 29*) (170). Los cambios ocurren sobre todo en la zona metaplásica o en la unión escamocolumnar (*figura 30*)(171,172,173,174). Los cambios displásicos ocupan prácticamente 2/3 o más del espesor epitelial. Aquí la p16 es útil para diferenciar estas lesiones de sus mímicas, como la atipia reparativa, la atrofia, la metaplasia inmadura (175),.. siendo intensamente p16 positiva en todo el espesor epitelial (165,176,177, 178).

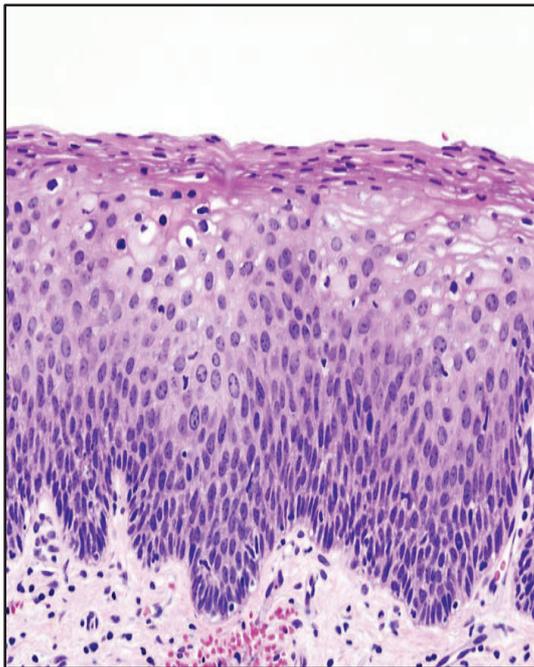


Figura 28. Displasia moderada (CIN2)

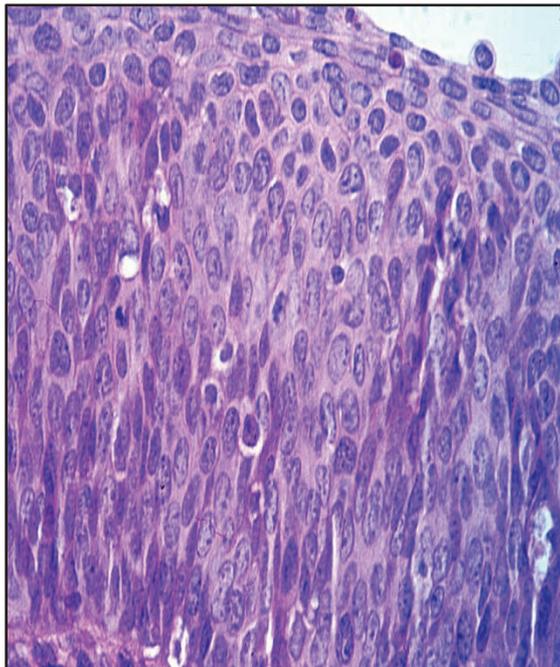


Figura 29. Displasia severa (CIN3)

La sensibilidad de la biopsia para detectar HSIL aumenta significativamente con el número de biopsias practicadas (179). Ante una imagen colposcópica múltiple impera la actuación de toma múltiple de biopsias.

Según otros autores recientemente (164), la positividad difusa de p16 es indicativa de infección por VPH-AR, y puede ser difusamente positiva tanto en LSIL como en HSIL, por lo que con p16 no se debería de gradar, aunque Darragh (165) y la mayoría de autores opinan lo contrario (180).

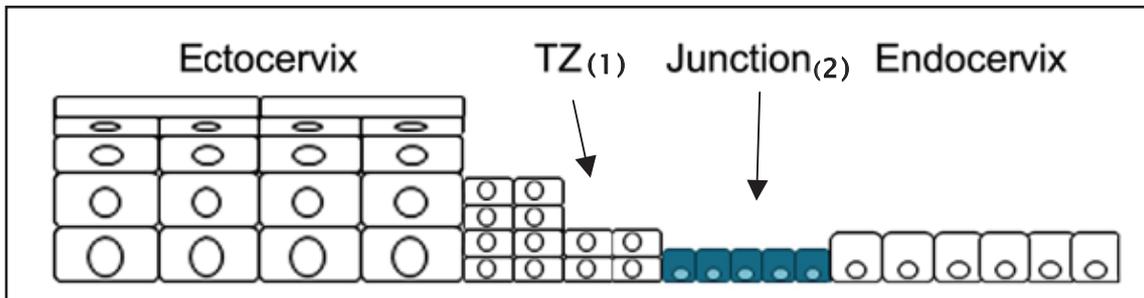


Figura 30. Zona de transformación (1) y Unión Escamocolumnar (2) del epitelio cervical (modificado de 171)

I.6. Métodos estadísticos: Sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN)

De una prueba diagnóstica se evalúan dos características muy importantes: la exactitud diagnóstica y los valores predictivos.

La exactitud diagnóstica, también llamada eficiencia o rendimiento diagnóstico, es la característica más importante de una prueba diagnóstica. Mide la capacidad de la prueba para distinguir entre dos estados de salud. La exactitud diagnóstica de una prueba suele evaluarse con los índices de sensibilidad y especificidad, ambos independientes de la prevalencia de la enfermedad, ya que se miden en dos categorías diferentes de sujetos: enfermos y no enfermos.

La sensibilidad de una determinada prueba diagnóstica es un indicador de la proporción de diagnósticos positivos obtenidos al aplicar la prueba a una población de enfermos. Valora la proporción de enfermos detectados por la prueba, o sea, en el caso del cribado del cáncer de cuello uterino indica la proporción de mujeres con lesión cervical precursora que tal prueba es capaz de confirmar mediante un resultado positivo.

La especificidad es la proporción de diagnósticos negativos obtenidos al aplicar una prueba a una población de sujetos sanos. Valora la capacidad de una prueba para descartar la enfermedad en sujetos sanos o no afectados, o sea, aplicada a una prueba de cribado del cáncer de cuello uterino indica la proporción de mujeres sin lesión cervical precursora que tal prueba es capaz de confirmar mediante un resultado negativo. Por tanto, lo ideal es disponer de una prueba que por su alta especificidad de lugar a un menor número de falsos positivos.

Normalmente interesa aplicar primero una prueba con alta sensibilidad para evitar los falsos negativos. Después, con los resultados positivos de esta primera prueba aplicar una segunda ya con alta especificidad para descartar los sanos.

Los valores predictivos nos ayudan a evaluar el comportamiento de una prueba diagnóstica según se aplique en diferentes contextos clínicos, y sí dependen ya de la prevalencia de la enfermedad.

El valor predictivo positivo (VPP) de una prueba es la proporción de sujetos con la enfermedad en el conjunto de sujetos con resultado positivo en la prueba. En el caso del cribado de cáncer de cuello uterino, el VPP es la probabilidad de que una mujer con

una prueba de cribado positiva tenga realmente una lesión cervical. Al depender de la prevalencia es lógico pensar que el VPP de una prueba disminuye al aplicarse en poblaciones con menor prevalencia de la enfermedad, y viceversa.

El valor predictivo negativo (VPN) de una prueba es la proporción de sujetos sin la enfermedad en el total de sujetos con resultado negativo de la prueba. En el caso del cribado por cáncer de cuello uterino, el VPN indica la probabilidad de que una mujer con prueba de cribado negativa no tenga lesión cervical.

Para comparar los dos tests lo hacemos con el test de McNemar y vemos tasa de acuerdos y nivel kappa de Cohen (181).

El Test de McNemar es una prueba no paramétrica de comparación de proporciones para dos muestras relacionadas, siempre y cuando los datos se ajusten a la distribución de chi-cuadrado. Su función es comparar el cambio en la distribución de proporciones entre dos mediciones de una variable dicotómica y determinar que la diferencia no se deba al azar (que la diferencia sea estadísticamente significativa).

H
I
P
Ó
T
E
S
I
S

D
E

T
R
A
B
A
J
O

Y

O
B
J
E
T
I
V
O
S

II.1.Hipótesis de trabajo:

1. La realización de la técnica dual para el cribaje o manejo de las pacientes con LSIL o ASC puede ser un factor determinante en el seguimiento clínico de las pacientes
2. Su positividad obligaría a conducta clínica inmediata (colposcopia), y su negatividad permitiría derivar el seguimiento a 6 meses.

Para contratar estas hipótesis diseñamos nuestro estudio prospectivo a dos años y nos planteamos el primero de los objetivos de tesis siguientes:

II.2.Objetivos de la tesis:

1. OBJETIVO PRINCIPAL: Comprobar si la tinción dual con biomarcadores p16^{INK4a} y Ki-67 que se expresan en las células de las citologías diagnosticadas de ASC y LSIL se asocia
 - ✓ Bien con lesión CIN2+ subyacente, ó
 - ✓ Progresa en un período determinado a CIN2+

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

2. Comparar tasa de positividad, sensibilidad y especificidad para técnica dual p16/ki-67 positiva versus determinación VPH-AR., para detectar lesiones CIN2+
3. Ver si existe relación entre la técnica dual p16/ki67 con los distintos genotipos virales de alto riesgo, en los casos confirmados histológicamente como CIN2+. Evaluar la frecuencia de los distintos genotipos.

**M
A
T
E
R
I
A
L

Y

M
É
T
O
D
O
S**

III .1. Breve introducción sobre la población de nuestro estudio

La población de mujeres seleccionada para nuestro estudio corresponde básicamente al Área de salud 1-Murcia Oeste de la comunidad autónoma de la región de Murcia, aunque recoge también población del Área 6 Vega Media del Segura (*figura 31*).



Figura 31. Áreas de Salud de la Región de Murcia (www.murciasalud.es/planificacion)(182)

La Región de Murcia (183) es una comunidad autónoma uniprovincial española, situada en el sudeste de la Península Ibérica, entre Andalucía (provincias de Granada y Almería) y la Comunidad Valenciana (provincia de Alicante), y entre la costa mediterránea y Castilla-La Mancha (provincia de Albacete).

La población total de la Región de Murcia es de 1.472.049 habitantes (aproximadamente la mitad son mujeres: 727.812 mujeres, según Instituto Nacional de estadística, refer. a fecha 1 de enero de 2014)(183) de los que algo menos de un tercio vive en la capital y la mitad vive en los municipios de Murcia, Cartagena y Lorca. Se trata de una comunidad relativamente pequeña al ser uniprovincial -la 9ª de España en superficie y la 10ª en población por delante de Aragón o Asturias, pero en su condición de provincia es de las más pobladas de las 50 que tiene el país -concretamente la 7ª más poblada-.

Su capital es la ciudad de Murcia, que es el centro de la comarca natural de la Huerta de Murcia y de su área metropolitana. Murcia tiene el saldo vegetativo y la tasa de natalidad más elevadas del país. Del total de la población municipal el 40% viven en el distrito de la capital (población básicamente urbana) y el resto en el anillo periférico de las pedanías de alrededor (población más rural).

Desde 2009 la Dirección General de Planificación y Ordenación Sanitaria distribuye la población de la región de Murcia en 9 áreas de salud con un hospital de referencia, las cuales incluyen a su vez distintas zonas básicas de salud (*figura 32*).

En España no existen recomendaciones nacionales para el diseño de la estrategia de cribado del CCU, ya que su aplicación es competencia de cada comunidad autónoma; sin embargo, el Sistema Nacional de Salud define los siguientes objetivos para la detección precoz de esta neoplasia (18):

- Población diana: mujeres asintomáticas, con relaciones sexuales y edad comprendida entre 25 y 65 años.
- Prueba de cribado: citología cervical.
- Intervalo recomendado entre exploraciones: de 3-5 años tras dos citologías iniciales normales realizadas en el intervalo de un año.
- Se establece como objetivo que el 70% de las mujeres entre 30 y 60 años tengan una citología de cribado realizada en los 5 años anteriores.

Y con esas directrices nuestra comunidad autónoma de Murcia diseña la siguiente estrategia de cribado:

- Programa de cribado: oportunista. Existen iniciativas para mejorar la captación y adherencia al cribado: la Consejería de Sanidad envía a las mujeres incluidas en la población diana, una carta personalizada con información sobre la prevención del cáncer de cuello uterino y el periodo de cribado.
- Población diana: mujeres no hysterectomizadas a partir de los 3 años de inicio de las relaciones sexuales y hasta los 65 años.
- Prueba e intervalo de cribado: citología trienal después de dos citologías realizadas en el intervalo de un año con resultado valorable y negativo.
- Aquellas mujeres con 65 años que no han realizado ninguna citología en los últimos 5 años requieren dos citologías normales de intervalo anual para finalizar el programa de cribado.

En nuestro estudio de partida se analiza la citología de cribado de parte del área 1 de salud y de parte del área 6 de salud, además de la que genera la consulta de Patología Cervical del HCUVA u otras consultas ginecológicas hospitalarias (área 1 – Murcia Oeste), como por la atención de las Unidades Ginecológicas de Apoyo (UGA), descentralizadas, generalmente en centro de especialidades, dependientes de su hospital de referencia del área 1 (HCUVA).

 <p>H. MORALES MESEGUER (MURCIA). HR ÁREA 6 VEGA MEDIA DEL SEGURA Zona 6 Murcia/Vista Alegre Zona 9 Murcia/Cabezo de Torres Zona 78 Murcia/Zarandona Zona 11 Murcia/Centro Zona 79 Murcia/El Ranero Zona 61 Alguazas Zona 59 Abanilla Zona 62 Archena Zona 64 Fortuna Zona 66 Molina/Sur Zona 65 Molina/Norte Zona 67 Torres de Cotillas Zona 71 Ceuti Zona 89 Molina/Este Zona 72 Lorquí Zona 7 Murcia/Sta. M^a de Gracia Zona 77 Murcia/Sgo. y Zairaiche</p>	 <p>H. V. DE LA ARRIXACA (MURCIA) H.R. ÁREA 1 MURCIA OESTE Zona 1 Alcantarilla Zona 8 Murcia/Espinardo Zona 10 Murcia/San Andrés Zona 20 Murcia/Nonduermas Zona 19 Murcia/La Nora Zona 21 Murcia/La Alberca Zona 22 Murcia/Algezares Zona 3 Alhama Zona 23 Murcia/El Palmar Zona 24 Murcia/Campo de Cartagena Zona 80 Murcia/Ajucar Zona 74 Murcia/Sangonera la Verde Zona 5 Mula Zona 2 Alcantarilla/Sangonera la Seca</p>
---	---

Figura 32. Mapa sanitario 2009 en áreas de Salud y zonas básicas de salud (www.murciasalud.es/planificacion)

CRIBADO EN EL H.U.V.A.

POBLACIÓN ATENDIDA

- AREA I
Adscrita a H.U.V.A
Adscrita a H. Morales
Meseguer
- AREA VI



CITOLOGÍAS CERVICOVAGINALES

CENTROS EXTERNOS (C. poblacional)

- 1.- C.E. "Dr. Quesada Sanz"
- 2.- Sta. M^ª de Gracia
- 3, y 4.- Molina de Segura (Ant. Garcia Y Jesús Marín Consolación)
- 5.- Alcantarilla-Sangonera
- 15.- Alcantarilla-Casco
- 16.- Sangonera la Verde
- 8.- Mula
- 9.- La Roca
- 10.- Alguazas
- 11.- Torre de Cotillas
- 12.- Ceuti
- 13.- Lorquí
- 14.- Murcia-centro

PROPIO HOSPITAL (C. oportunista)

- Consulta Onco-Ginecología
- Urgencias Maternal
- Histeroscopia
- Consulta Ginecología

En ambas áreas de salud la población femenina es básicamente urbana, ya que casi la mitad de ambas áreas corresponde al municipio de Murcia.

III.2.- OBJETIVO PRINCIPAL: Comprobar si la tinción dual p16/ki67 que se expresa en las células de las citologías ASC-LSIL se asocia con lesión CIN2+ subyacente

III .2.1. Pacientes incluídas en el estudio

Se seleccionaron 306 pacientes con diagnóstico de LSIL o ASC diagnosticados entre Marzo-2012 y Marzo-2014 (25 meses) a las que se les realizó, tras diagnóstico citológico, estudio inmunocitoquímico de la técnica dual p16/ki-67 (CINtec® PLUS).

Posteriormente se siguieron esos pacientes desde 1 día (cuando tienen la biopsia simultánea con la citología) hasta los 30 meses en algún caso. El seguimiento va desde marzo 2012 a octubre 2014.

Las pacientes para su inclusión en este estudio debían cumplir los siguientes requisitos:

- Mujeres mayores de 25 años
- Diagnóstico citológico de LSIL o ASC (según BETHESDA 2001)
- Muestras únicamente en medio líquido (Surepath®)

Los datos de procedencia de los pacientes se muestran en la *tabla 3*.

Tabla 3. *Procedencias de las pacientes*

CONSULTA / PRIMARIA	Nº pacientes	Porcentaje (%)
CONSULTA ONCOGINECOLOGÍA H.C.U.V.A	287	93,8%
CONSULTAS GINECOLOGÍA ARRIXACA	15	4,9%
ATENCIÓN PRIMARIA (Sangonera)	4	1,3%

La edad media de las pacientes seleccionadas (306) a las que se les realizó técnica dual p16/ki67 fue de $39,8 \pm 10,4$ años (rango 25,83)

El final del seguimiento acaba con el diagnóstico histológico de CIN2+ (CIN-2 o CIN-3); por tanto, los casos se evaluarán como POSITIVOS o NEGATIVOS en función de la presencia o no de CIN2+.

III .2.2. Muestras citológicas

Se recogieron 349 muestras pertenecientes a las 306 pacientes incluídas en el presente estudio.

Algunas pacientes tenían más de un resultado citológico y posterior realización de p16/ki67, en base a discordancias clínico-citológicas anteriores (*tabla 4*).

Tabla 4. Número de pacientes según n° estudios con técnica dual p16/ki-67

	N° de pacientes	N° de estudios
1 técnica	266	266
2 técnicas	37	74
3 técnicas	3	9
	306	349

De un total de 239 ASC y de 340 LSIL diagnosticados en esos dos años, se seleccionaron en base a los criterios establecidos 127 ASC y 222 LSIL, lo que supone un 53,1% de los ASC totales y un 65,3% de los LSIL totales diagnosticados en ese período de tiempo (Marzo-2012 a Marzo 2014) (tabla 5)

Tabla 5. Casos de ASC/LSIL seleccionados

Resultado citológico	Total	Casos seleccionados	Porcentaje (%)
ASC	239	127	53,1%
LSIL	340	222	65,3%

III 2.2.1. Recogida de las muestras:

Tras la toma, las muestras de citología cérvicovaginal fueron incluidas en MEDIO LÍQUIDO BD SurePath™ (Tripath/BD). Procedían de varias UGA de atención primaria, de las consultas de ginecología del HCUVA o de la consulta de Oncoginecología del HCUVA, desde donde se remitieron al servicio de Anatomía Patológica:

Procedimiento: Las muestras se tomaron con los dispositivos disponibles en la consulta del ginecólogo (Espátula y Cytobrush o Cervex Brush con mango desechable). Se depositó el cabezal del dispositivo en el vial SurePath™, que contiene un líquido conservante a base de etanol, el cual fija inmediatamente el 100% de las células recogidas en la muestra y evita la formación de artefactos por aireación y desecación. Se cerró el envase, se identificó el vial con la muestra y se envió al servicio de Anatomía Patológica para su procesamiento (figura 33).



Figura 33. Método de recogida de la muestra cervicovaginal (tomada de www.civagen.com)

III.2.2.2. Procesamiento de la muestra: enriquecimiento celular

Una vez que llegan al laboratorio las muestras son procesadas utilizando un método único del sistema BD SurePath™, mediante el cual se obtiene un sedimento concentrado de las células con importancia diagnóstica, libre de elementos entorpecedores como la sangre, moco cervical y células inflamatorias. Esto permite obtener preparaciones más limpias y de fácil lectura.

- 1.- Este procedimiento se inicia con una agitación inicial en vórtex para liberar las células.
- 2.- A continuación se realiza el paso de enriquecimiento celular, en el cual la muestra se transfiere de forma gradual y automática, mediante el sistema BD PrepMate™, a los tubos que contienen el reactivo de densidad (solución polisacárida). Con el fin de reducir la posibilidad de contaminación, el instrumento BD PrepMate™ realiza un paso de perforación y dispensación de la muestra sin retirar las tapas de los viales durante el proceso.
- 3.- Posteriormente se realizan dos pasos de centrifugación de estos tubos que contienen la muestra sobre el reactivo de densidad, con el objetivo de separar y eliminar elementos entorpecedores y concentrar las células con relevancia clínica.

III.2.2.3. Preparación y tinción de objetos:

Mediante el sistema BD PrepStain™ se realiza la transferencia de las muestras, la preparación y la tinción de los portaobjetos de forma totalmente automática (*figura 34*).

Se obtiene una capa fina de células con una distribución uniforme y homogénea en un área de sólo 13 mms. de diámetro, con un fondo nítido y de fácil lectura.

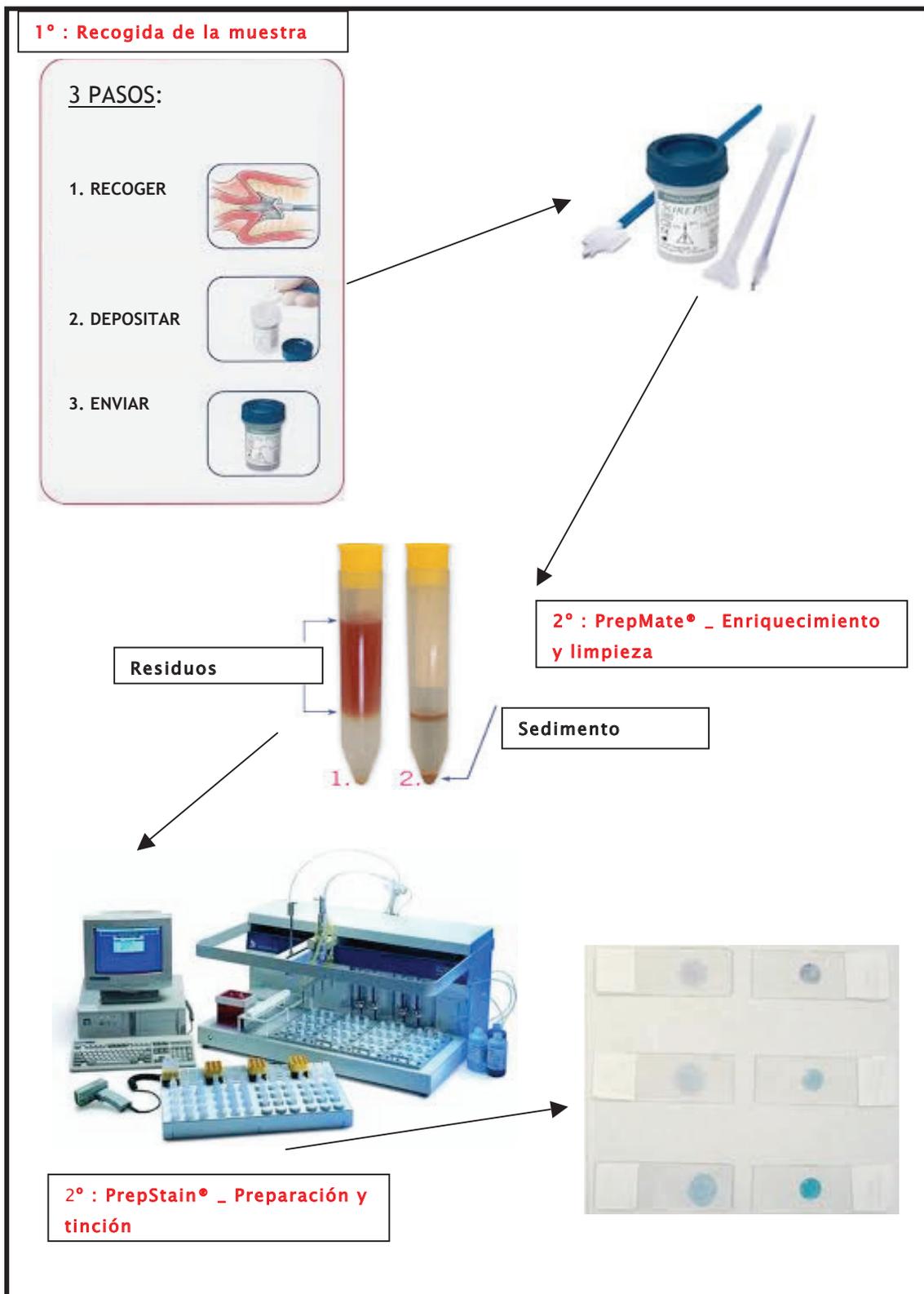


Figura 34. Recogida de la muestra y procesamiento. Esquema representativo que describe el método “BD Surepath” (modificado de www.bd.com)

III.2.2.4. Lectura o diagnóstico citológico:

Una vez obtenido el porta con la muestra y ya teñido con un papanicolau modificado para Surepath®, se procede a estudio citológico adecuándolas según Bethesda 2001 (en INTRODUCCIÓN, página 19), valorando:

- Idoneidad de la muestra
- Categorización general :
 - * Negativa para malignidad
 - * Atipia de células escamosas
 - * LSIL
 - * HSIL
 - * Otras alteraciones glandulares,....

III.2.3. Realización de la técnica dual p16/ki-67 (CINtec® PLUS):

Del material residual que quedó en el vial tras el diagnóstico citológico se preparó, conforme a fabricante, otro portaobjetos del sistema BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) que se fijó inmediatamente después de la preparación en etanol al 99% durante 10 minutos hasta 1 hora y se dejó secar durante 20 minutos hasta 16 horas (durante la noche).

Se pasó al laboratorio de inmunohistoquímica para la realización de la técnica dual p16/ki67, usando el kit CINtec® PLUS (Roche-mtm Laboratories, Heidelberg, Germany), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El kit comprende un procedimiento inmunohistoquímico en dos pasos sobre preparaciones citológicas, y contiene un Ac monoclonal (clon E6H4™) dirigido contra la proteína humana p16^{INK4a} y otro Ac monoclonal dirigido contra la proteína humana Ki-67 (clon 274-11 AC3).

A. El PROCEDIMIENTO es el siguiente:

1. REHIDRATACIÓN DE LAS MUESTRAS: Los portas con la muestra se someten a hidratación progresiva desde xileno a agua destilada, en los siguientes pasos:

- 1 xileno de 2 minutos
- 2 alcoholes de 100°, 2 minutos cada uno
- 2 alcoholes de 96° , 2 minutos cada uno
- Agua destilada

2. RECUPERACIÓN DEL EPÍTOPO: La recuperación antigénica se lleva a cabo con la solución del kit CINtec® PLUS:

- 150 ml de tampón
- 1350 ml H₂O

Diluir la solución de recuperación 1/10 en agua destilada.

Programación del PT LINK: se introducen las muestras y se calienta hasta 97°, se incuban durante 15 minutos, y se dejan enfriar un rato en dicha solución

Los portas se colocan posteriormente con el buffer durante 5 minutos previos a la tinción.

3. PROTOCOLO DE TINCIÓN: Se cargan en el sistema automatizado Dako Autostainer Plus y se incuban con el anticuerpo de la solución; nombres de los reactivos:

- Bloqueante de la peroxidasa.....DS PEROXIDASA..... 5 min
- Anticuerpos primariosCINtec PLUS 30 min
- Polímero HRPDS HRP15 min
- Polímero AP DS AP 15 min
- DAB (1 gota/1 ml.) DS DAB 10 min
- FAST RED (1 gota/1 ml.) DS FAST RED 15 min

- Hematoxilina sin alcohol 5 min
4. MONTAJE (procedimiento de montaje en dos pasos, para evitar que se destiña el cromógeno Fast Red):
- Cubreobjetos líquido: Los portas se dejan secar al aire, con 40 microlitros (1-2 gotas) de CINtec® PLUS mount (con alcohol), sin poner cubre a la preparación, hasta el día siguiente
 - Cubreobjetos de cristal o film: Una vez que se han secado (preferiblemente tras toda la noche), incubar 5-10 min. en xilol nuevo y montar con medio de montaje permanente.

B. CONTROLES DE CALIDAD DEL PROCEDIMIENTO

- Control positivo (*figuras 35 y 36*): portaobjetos SurePath® de muestra con un resultado de citología Pap confirmado como HSIL

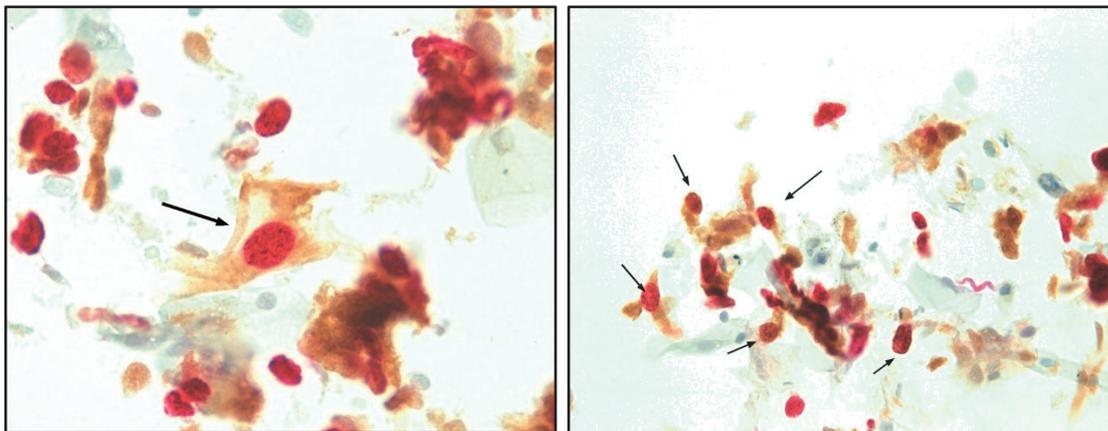


Figura 35 y 36 . Controles positivos de la técnica dual

- Control negativo (*figuras 37 y 38*): portaobjetos SurePath® de muestra con un resultado de citología Pap confirmado como “negativo para malignidad”

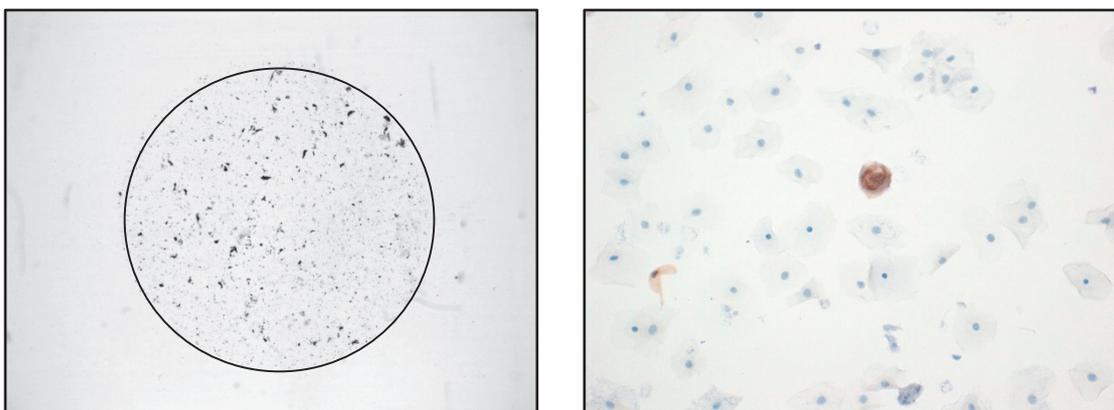


Figura 37 y 38. *Controles negativos de la técnica dual*

C. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los portas teñidos se analizaron por tres patólogos con dedicación parcial a la citología cervicovaginal (ATC, IOR, EIL).

Los portas fueron interpretados como POSITIVO o NEGATIVO para CINtec PLUS conforme a atlas y guías del producto: en presencia de displasia de alto grado subyacente, una o más células se teñirán de rojo en el núcleo y de marrón en el citoplasma (*figura 39*). Con esta doble tinción, la positividad también nuclear para p16 queda oscurecida por el rojo intenso que marca el Ki-67.

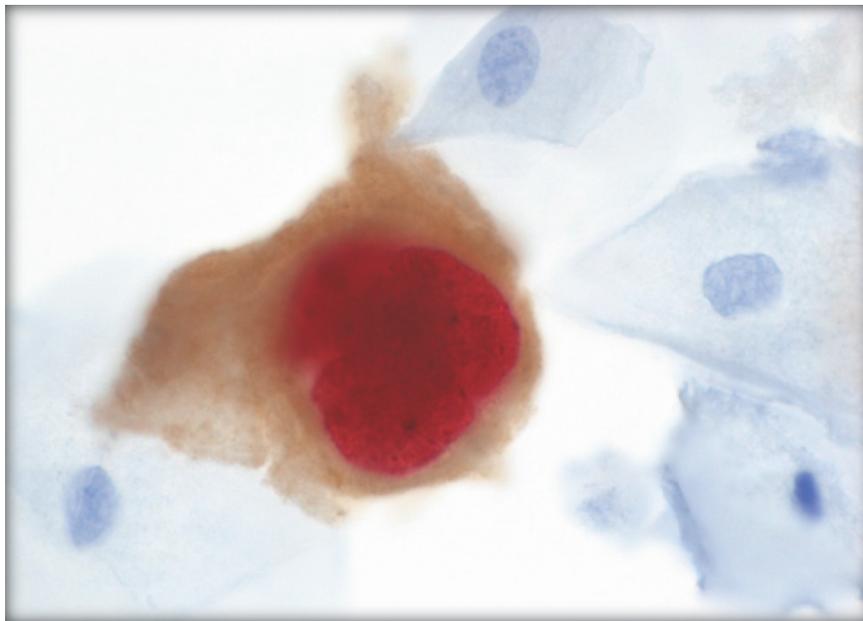


Figura 39. Célula positiva para la tinción dual p16/ki-67

La presencia de una o más células cervicales epiteliales con la presencia de ambas tinciones (la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo dentro de la misma célula) se interpreta como un resultado positivo del test CINtec® PLUS.

Si no se detectan células cervicales epiteliales con la presencia de ambas, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo, se interpreta con un resultado negativo del test CINtec® PLUS.

La presencia de células cervicales epiteliales que muestren inmunorreactividad a tan sólo uno de los dos marcadores (como por ejemplo sólo la tinción marrón por p16 o sólo la tinción roja por ki-67) no se considerarán un resultado positivo del test; incluso si ambos tipos de células cervicales que muestran una inmunorreactividad se encuentran en la misma muestra citológica.

Si se detectaran células con indicación de discariosis severa que no presenten la tinción de ambos marcadores, p16 y ki-67, los criterios morfológicos de interpretación no se deben de ignorar.

D. EQUIPO NECESARIO ADICIONAL:

- Microscopio (aumento de 10-40x)
- Contenedores de tinción resistentes al calor (plástico)
- Probetas graduadas
- Botella de lavado (para rellenar con el tampón de lavado)
- Cronómetro (capaz de medir intervalos de 30 segundos-60 minutos)
- Baño con tapa (capaz de mantener la solución de recuperación del epítipo a una temperatura de 95-99° C)
- Termómetro

En las 40 pacientes con más de un estudio con CINtec PLUS, y tras comprobar los resultados, se selecciona SOLO un resultado por paciente, quedando el espacio muestral (*tabla 6*):

Tabla 6. Resultados de técnica dual según resultado citológico

RESULTADO CITOLÓGICO	p16/ki67			TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	NO VALORABLE	
ASC	24	87	1	112
LSIL	121	69	4	194
	144	157	5	306

III.3. 2° OBJETIVO: Comparar ratio de positividad entre la técnica dual p16/ki-67 y la determinación VPH-AR. para detectar lesiones CIN2+

III.3.1. Pacientes incluidas en el estudio

Para esta parte del estudio, de las 306 pacientes totales, se seleccionaron únicamente aquellas que tenían estudio citológico con técnica dual p16/ki-67 y además determinación de VPH-AR. Fueron un total de 146 pacientes (*figura 40*).

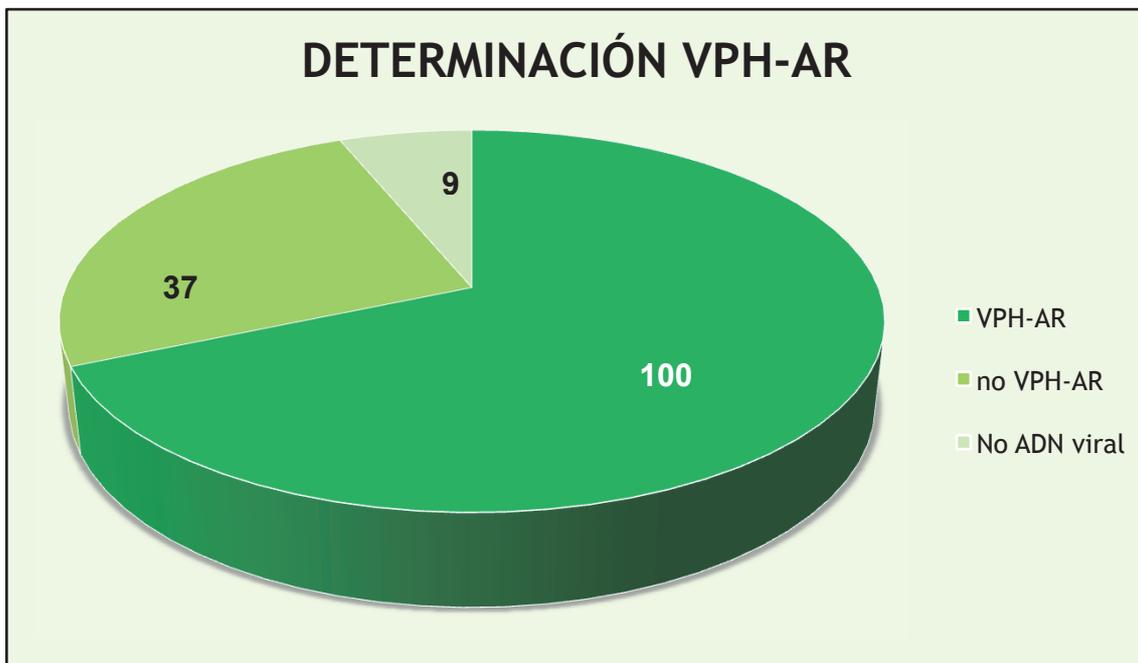


Figura 40. Resultados de la determinación de VPH-AR en las 146 pacientes

La edad media de las pacientes a las que se les realizó la determinación de VPH fue de $38,5 \pm 9,4$ años (rango 25,65).

III.3.2. Detección de ADN viral

La detección de VPH de alto riesgo se realizó mediante la técnica de captura híbrida (HC2 High-Risk HPV DNA Test®, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) y/o el genotipado mediante el método PCR microarray (CLART® HPV2, Genómica, Madrid, Spain). La realización de estas técnicas de biología molecular se llevó a cabo en la Unidad de Virología del HCUVA.

La toma de muestra, que se envía directamente a la unidad de Virología desde la consulta de ginecología, se recogió mediante cepillo cervical DNAPap® en el medio de transporte (Digene cervical sampler®).

- La primera determinación que se realiza es la detección de ADN de VPH mediante captura de híbridos, que es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal y detección por quimioluminiscencia. Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda ARN específica del VPH. Los híbridos de ADN-ARN resultantes se capturan en la superficie de los pocillos de una microplaca, recubiertos con anticuerpos específicos para los híbridos ADN-ARN. A continuación, los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, y se detectan mediante un sustrato quimioluminiscente. A medida que la fosfatasa alcalina unida degrada el sustrato se emite luz, que se mide en unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro. Cuando ese valor alcanza un mínimo ($RLU/CO \geq 1,0$) dicha muestra SE CONSIDERARÁ POSITIVA PARA ALGUNO DE LOS SIGUIENTES TIPOS DE VPH DE ALTO GRADO QUE SE DETECTAN MEDIANTE ESTA TÉCNICA (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68).

La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del ADN diana en la muestra (*figura 41*)

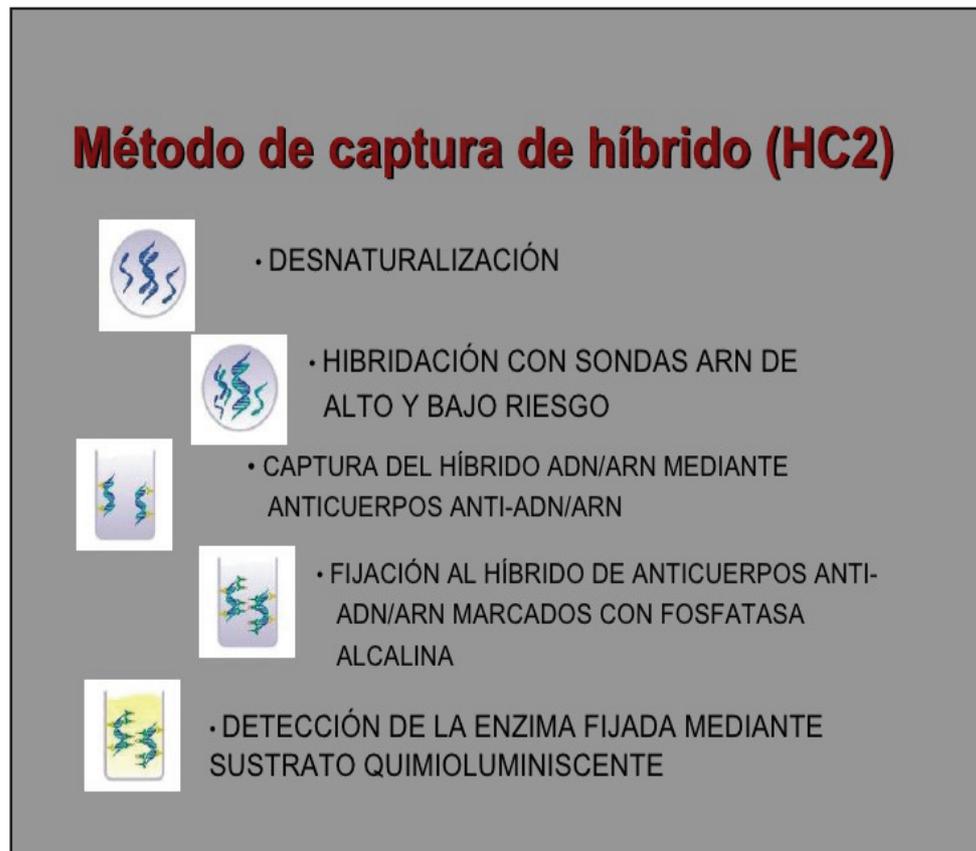


Figura 41. Descripción de la técnica de captura híbrida

- SOLO con un resultado positivo en la técnica de captura de híbridos se procede a una lisis-extracción de ADN (VER MÉTODO DE EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN EN EL SIGUIENTE PUNTO: 3º OBJETIVO) a partir del mismo medio de transporte con la muestra de exudado cervical, para Amplificación del ADN mediante PCR

microarray, que DETECTA DE FORMA ESPECÍFICA HASTA 35 TIPOS DE VPH DE ALTO Y BAJO RIESGO:

- Incluye 20 sondas de VPH de alto riesgo: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 y 85
- Y 15 sondas de VPH de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 y 89

Después de extraer el ADN y de amplificarlo mediante PCR se procede a la visualización del producto amplificado en CLART-CS®.

La lectura de los resultados se basa en una matriz de puntos que se forma al precipitar sobre un microarray de sondas de ADN viral una sustancia coloreada e insoluble.

III.4. 3° OBJETIVO: Ver si existe relación entre la técnica dual p16/ki67 con los distintos genotipos virales de alto riesgo, en los casos confirmados histológicamente como CIN2+.

III.4.1. Diseño del estudio

A sólo la mitad de las pacientes de nuestro estudio (153) se les realizó biopsia, que fueron fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina. De esas, 57 fueron diagnosticadas en biopsia de CIN2+.

Todas las biopsias correspondían a CIN2 y CIN3, sin casos de carcinoma escamoso.

La edad media de estas mujeres fue de $37,26 \pm 9,5$ años (rango 25,59).

III.4.1.1. CONSIDERACIONES PREVIAS QUE SE SIGUIERON ANTES DE LA OBTENCIÓN DE SECCIONES DE TEJIDO PARAFINADO PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

Para el manejo de las muestras hay una serie de normas que se deben cumplir:

- El personal técnico debe de estar adiestrado para la obtención de este tipo de muestras .
- Las muestras deben ser perfectamente seleccionadas por el responsable previa solicitud.
- Las solicitudes deben de ser registradas en el software del centro.

Para ello nosotros adoptamos que dicha obtención de muestras de TEP se llevara a cabo siempre por la misma Técnico Especialista en Anatomía Patológica (TEAP), después de que se hubiera seleccionado el corte adecuado con lesión CIN2+.

III.4.1.2. MATERIALES:

- Micrótopo (Microm HM340E).
- Cuchillas desechables (MX35 Ultra-34°/80mm).
- Tubos de 1.5 ml estériles de polipropileno con tapa incorporada y fondo cónico.
- Gradillas para los tubos.
- Etiquetas adecuadas para los tubos de 1.5 ml.
- Pinzas de plástico o metálicas, estériles.
- Contenedor para reactivo tipo spray.
- Guantes de un solo uso.
- Caja transportadora de tubos de 1.5 ml.
- Papel secante.
- Etanol Absoluto (CH₃CH₂OH- Panreac).
- Isopropanol o 2Propanol (CH₃CHOHCH₃- Panreac)
- Agua Destilada.
- Registro en el software de gestión "Patwin" de anatomía patológica.

III.4.1.3. DESARROLLO:

A. PROCEDIMIENTO: OBTENCIÓN DE SECCIONES DE PARAFINA

1. La obtención de las secciones debe de realizarse en un micrótopo completamente libre de restos de parafina de secciones anteriores.
2. Preparar disolución al 50%, de isopropanol al 50% y etanol al 70%. Pulverizar con esta disolución el micrótopo, deshumedecer y dejar evaporar los

restos de la disolución, igualmente realizar lo mismo con los guantes que se están utilizando.

3. Insertar cuchilla de un solo uso en el micrótomo.
4. Realizar de 5 a 10 secciones de un bloque de parafina, entre 5 μm y 10 μm , dependiendo de la cantidad de TEP que se quiera obtener.
5. Con una cuchilla nueva se intenta quitar la mayor cantidad de parafina de alrededor de la muestra de tejido, ya que la parafina puede degradar el ADN de la muestra
6. Recoger las secciones con unas pinzas e introducirlas en los tubos de 1.5 ml, perfectamente etiquetados; cerrar el recipiente evitando tocar la parte interna de la tapa.
7. Repetir desde el punto 1 hasta el 6, por cada bloque de TEP.

A partir de este primer proceso que se lleva a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica los tubitos, debidamente identificados y localizados por códigos de barras (sistema informático), se envían a la unidad de virología donde se le aplica un protocolo estandarizado para la extracción adecuada de ácidos nucleicos, a partir del material de cada bloque.

B. PROCEDIMIENTO: EXTRACCIÓN MANUAL DEL ADN DE VPH

- En el tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml, con las 5-10 secciones de tejido parafinado, se añade 180 μl de Solución T1
- Tras machacar el tejido con la punta de la pipeta, mezclar en el vórtex para facilitar la lisis.
- Añadir 25 μl de la solución de Proteinasa K, mezclar en vórtex e incubar a 56°C toda la noche (al ser muestras en parafina), en un baño o un Termomixer con agitación, hasta que la muestra esté totalmente lisada. Para

acelerar esta lisis, se recomienda agitar las muestras en un vórtex cada 15 minutos

- Una vez lisada la muestra, añadir 200 µl de solución B3 a cada muestra. Mezclar en vórtex e incubar a 70°C durante 10 min.
- Añadir 210 µl de etanol 96% a cada muestra y agitar en vórtex inmediatamente
- Preparar una columna de purificación por muestra y colocarla en un tubo de recogida de 2 ml. Añadir la muestra y centrifugar durante 1 minuto a 12.000 r.p.m. Si el líquido no ha atravesado completamente la membrana, repetir la centrifugación. Descartar el fluido filtrado y el tubo de recogida de 2 ml.
- Colocar la columna en otro tubo colector y añadir 500µl de la Solución BW a la columna. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el fluido filtrado y el tubo colector.
- Colocar la columna en otro tubo colector y añadir 600 µl de Solución B5 a la columna. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el fluido filtrado
- Reinsertar la columna en el tubo de recogida. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min para eliminar cualquier resto de la solución B5

*Nota: El etanol residual que pueda quedar de la Solución B5 inhibe reacciones enzimáticas, por lo que se debe eliminar completamente mediante esta centrifugación.

- Colocar la columna en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml. Eluir el ADN con 100µl de la Solución BE (previamente calentada a 70°C). Incubar esta solución caliente en la columna a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min.
- Recuperar el filtrado (aproximadamente 100) en el tubo de microcentrífuga a 1,5 ml. Utilizar 5 para la reacción de amplificación y guardar el resto a -20°C.

CLART® PAPILOMAVIRUS HUMANO 2 GENOTIPADO DE
PAPILOMAVIRUS HUMANO MEDIANTE IDENTIFICACIÓN
GENÓMICA PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Posteriormente, tras la extracción de ácidos nucleicos se pasa a la detección y genotipado del VPH con el sistema CLART Human Papillomavirus 2 (Genomica, Madrid, Spain)

La detección se lleva a cabo mediante la amplificación de un fragmento de unos 450 pares de base dentro de la región L1 del virus por tratarse de una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH. Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo de virus con sondas específicas. De esta manera, se asegura la especificidad de la detección.

Para ello se usa “primers” de consenso (*tabla 42*) dirigidos contra esa región L1 del virus.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres pasos (*figura 43*):

1. DESNATURALIZACIÓN: para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90° a 95° 10 minutos que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras en toda la muestra debe mantener esta temperatura unos minutos (5 minutos más). Si el ADN sólo

se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.

2. HIBRIDACIÓN: esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40° y 60° para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o “annealing” depende de varios factores y es relativamente específica para cada *primer*. La longitud de los primers y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de la amplificación. Los primers que usan están marcados con biotina y son PGMY09/11 (T^a de hibridación: 55°C), que amplifica un fragmento de 450 pares de bases dentro de la región L1 de la cápside del VPH

Primer	Secuencia (5'-3')	Pares de bases	Target
MY09/11	(MY09)CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC (MY11)GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	450	L1
PGMY09/11	(PGMY11)A GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG (PGMY11B)GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG (PGMY11C)GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG (PGMY11D)GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG (PGMY11E)GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG (PGMY09F)CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC (PGMY09G)CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC (PGMY09H)CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC (PGMY09Ia)G CCA AGG GGA AAC TGA TC (PGMY09J)CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC (PGMY09K)CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC (PGMY09L)CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC (PGMY09M)CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC (PGMY09N)CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC (PGMY09Pa)G CCC AAC GGA AAC TGA TC (PGMY09Q)CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC (PGMY09R)CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC (HMB01b)GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT	450	L1
GP5/6	(GP5)TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC (GP6) TGA TTT ACA GTT TAT TTT TC	140-150	L1
GP5+/6+	(GP5+)TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC (GP6+)GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	160	L1

Figura 42. Algunos oligonucleótidos usados como primers para PCR de VPH (modificado de 103)

- EXTENSIÓN: durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza la máxima actividad.

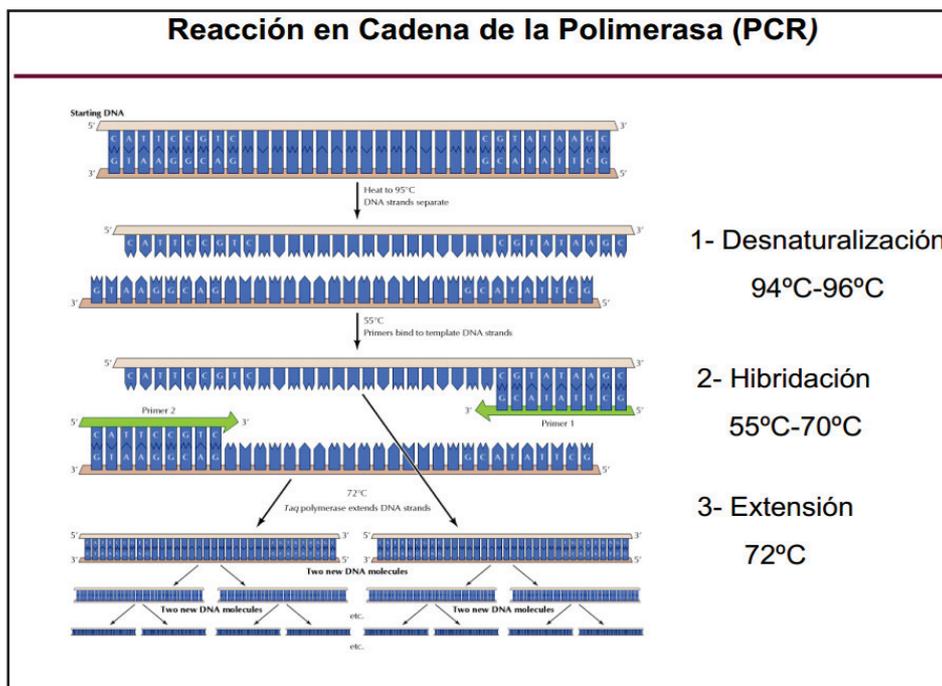


Figura 43. Esquema de las tres fases de la PCR (modificado de 184)

La detección del producto amplificado por PCR se lleva a cabo mediante una plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad: CLART-CS® (Clinical Array Technology). La plataforma se fundamenta en un principio muy sencillo pero a la vez muy cómodo y eficaz: las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado (estretavidina-HRP. El sustrato o-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

La lectura automatizada de los resultados se basa en una matriz de puntos que se forma al precipitar sobre un microarray de sondas de ADN viral una sustancia insoluble y coloreada.

CLART HPV2® detecta la presencia de los 35 virus de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89) con mayor importancia clínica, en

distintos tipos de muestras humanas (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina).

La clasificación del riesgo oncogénico de esta técnica (*tabla 7*) está basada en Dunne y col, 2007 (185)

Tabla 7. Clasificación riesgo oncogénico según Dunne et al. (2007)(185)

TIPO	RIESGO ONCOGÉNICO*	TIPO	RIESGO ONCOGÉNICO*
VPH 6	Bajo Riesgo	VPH 56	Alto Riesgo
VPH 11	Bajo Riesgo	VPH 58	Alto Riesgo
VPH 16	Alto Riesgo	VPH 59	Alto Riesgo
VPH 18	Alto Riesgo	VPH 61	Bajo Riesgo
VPH 26	Alto Riesgo	VPH 62	Bajo Riesgo
VPH 31	Alto Riesgo	VPH 66	Alto Riesgo
VPH 33	Alto Riesgo	VPH 68	Alto Riesgo
VPH 35	Alto Riesgo	VPH 70	Alto Riesgo
VPH 39	Alto Riesgo	VPH 71	Bajo Riesgo
VPH 40	Bajo Riesgo	VPH 72	Bajo Riesgo
VPH 42	Bajo Riesgo	VPH 73	Alto Riesgo
VPH 43	Bajo Riesgo	VPH 81	Bajo Riesgo
VPH 44	Bajo Riesgo	VPH 82	Alto Riesgo
VPH 45	Alto Riesgo	VPH 83	Bajo Riesgo
VPH 51	Alto Riesgo	VPH 84	Bajo Riesgo
VPH 52	Alto Riesgo	VPH 85	Alto Riesgo
VPH 53	Alto Riesgo	VPH 89	Bajo Riesgo
VPH 54	Bajo Riesgo		

Tabla 8. Número de pacientes y muestras incluidas en cada uno de los estudios realizados en el presente trabajo

Estudio realizado	Nº pacientes / nº determinaciones VPH / nº biopsias	Selección de pacientes o muestras
1.- Comprobar si la tinción dual con biomarcadores p16INK4a y Ki-67 que se expresan en las células de las citologías diagnosticadas de ASCUS y LSIL se asocia con lesión CIN2+ subyacente, actual o en próximas revisiones.	306/153	Pacientes en seguimiento por ASCUS-LSIL (inicial o postconizaciones con virus de control negativo)
2.- Comparar ratio de positividad entre CINtec PLUS y determinación VPH-AR., para detectar lesiones CIN2+	146	Citologías CV en medio líquido con alteraciones citológicas de ASCUS ó LSIL, con determinación de VPH AR
3.- Ver si existe relación entre la técnica dual p16/ki67 con los distintos genotipos virales de alto riesgo, en los casos confirmados histológicamente como CIN2+.	57	Biopsias confirmadas para CIN-II ó CIN-III

III.5. Análisis estadístico de los casos

Para el análisis general de las variables se han empleado los métodos descriptivos básicos para las variables cualitativas obteniendo el número de casos presentes en cada categoría y el porcentaje correspondiente y para las variables cuantitativas hemos obtenido el máximo, mínimo, media y desviación típica (la edad, expresada en su media, desviación estándar y rango).

En las tablas de contingencia se obtuvo la frecuencia y el porcentaje de casos que presentan las dos características de forma conjunta. Para conocer si entre las dos variables hay o no dependencia hemos realizado la prueba Chi-cuadrado, obteniendo en los casos de dependencia la Odds ratio y realizando las comparaciones de proporciones de columna. Para evaluar la relación entre el resultado de las pruebas diagnósticas teniendo en cuenta el posible efecto de la edad, se ha empleado el método de Cochran-Mantel-Haenszel que permite estimar el OR ajustando por el efecto de la variable de confusión edad.

Se calcularon los índices de validez diagnóstica (sensibilidad, especificidad y valores predictivos) con sus intervalos de confianza al 95%. La prueba de McNemar se empleó para comparar la sensibilidad y especificidad entre CINTec PLUS y VPH. El grado de concordancia se calculó mediante el índice de kappa (181).

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 21.0 para Windows. Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya $p < 0.05$.

R E S U L T A D O S

- **Distribución de los diagnósticos citológicos en el período de tiempo estudiado**

Durante el período Marzo-2012 y Marzo-2014 se remitieron en nuestro servicio de Anatomía Patológica 29.336 muestras de citología cervicovaginal. En la *tabla 9* se puede ver el porcentaje de los distintos diagnósticos, según Bethesda 2001.

Tabla 9. *Distribución de las muestras según resultado citológico*

Resultado citológico	n	%
Normal	27.958	95,3%
ASC-US	408	1,3%
ASC-H	51	0,2%
LSIL	554	1,9%
HSIL	175	0,6%
ACG	57	0,2%
Carcinoma-ADC	8	0,03%
N/A	125	0,5%
Total	29.336	100%

De ellas, algo más del 70% fueron remitidas como citología de triple toma, y casi el 30% como citología en medio líquido (8.676 muestras citológicas) (*tabla 10*).

Citologías anormales (ASC+): 4,23%

Tabla 10. Distribución de las muestras en T.T. o C.L.

Resultado citológico	T.T.	%	C.L.	%
Normal	20.061	97	7897	91
ASC-US	199	1	209	2,5
ASC-H	21	0,1	30	0,3
LSIL	214	1	340	3,9
HSIL	57	0,3	118	1,3
AGC	11	0,05	46	0,5
Carcinoma-ADC	2	0,01	6	0,07
N/A	95	0,4	30	0,3
Total	20660	70,4%	8676	29,6%

- **Estudios inmunocitoquímicos realizados con técnica dual p16/ki67:**

De los 239 ASC (ASCUS +ASC-H) sólo se seleccionaron 127 estudios en base a los siguientes criterios (*tabla 11*):

De los 340 LSIL sólo se seleccionaron 222 estudios en base a los siguientes criterios (*figura 44*):

Tabla 11. Criterios de selección de las pacientes en el estudio

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Mujeres mayores de 25 años • Diagnóstico citológico de LSIL o ASC (según BETHESDA 2001) • Muestras únicamente en medio líquido (Surepath®) |
|--|

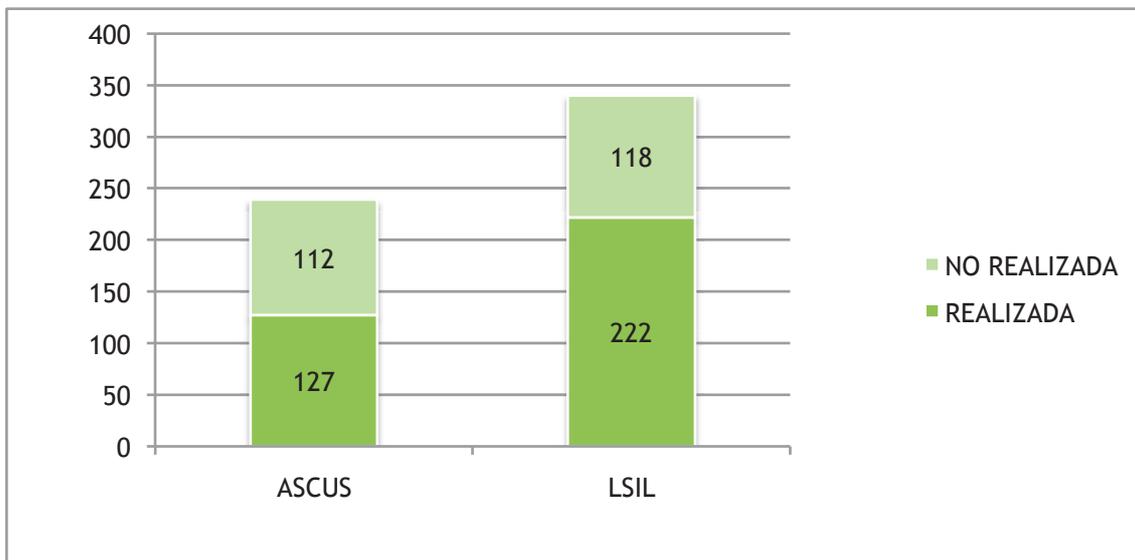


Figura 44. Diagnósticos citológicos (n) ASC y LSIL a los que se les realiza la técnica dual p16/ki67

Se realizaron 349 estudios inmunocitoquímicos con técnica dual p16/ki67 sobre un total de 306 pacientes.

En 40 pacientes de los 306 se realizó más de un estudio con técnica dual p16/ki67:

- En 23 de ellos por diagnóstico de LSIL con dual+ que no se siguen de actuación clínica como toma de biopsia
- En 7 de ellos también con diagnóstico de LSIL con dual -, para confirmar dicha negatividad
- En 5 casos de ASC con dual+ porque tampoco se siguen de actitud clínica inmediata
- En los últimos 5 casos de ASC con dual-, por confirmar la negatividad.

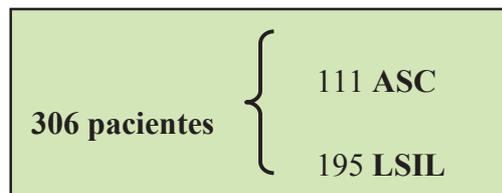


Figura 45. Selección final de diagnósticos citológicos en los 306 pacientes

- **Estudios de VPH realizados:**

Se realizaron un total de 146 determinaciones de VPH-AR con la técnica de captura de híbridos, siendo la detección de VPH-AR positiva en 100 pacientes (68,5%) y negativa en 39 (26,7%). En 7 de las pacientes no se llegó a detectar VPH ni de AR ni de BR o no se detectó ADN (4,8%) (*figura 46*).

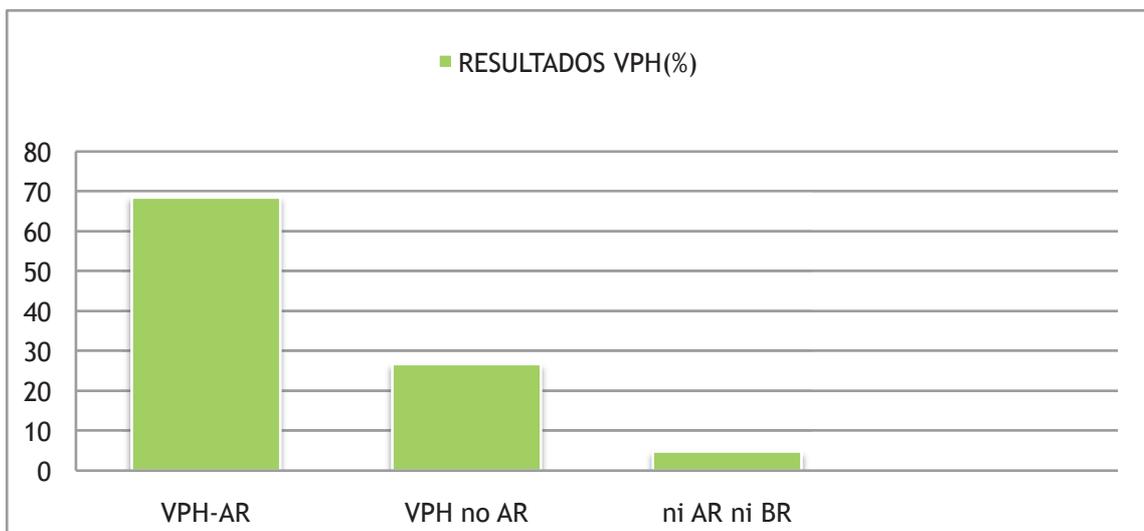
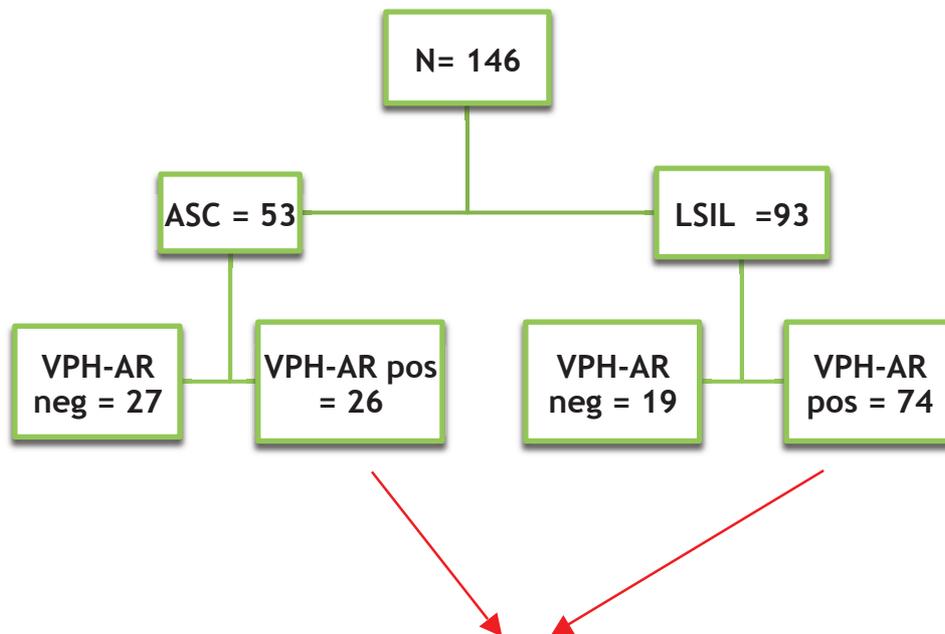


Figura 46. % de estudios VPH realizados

De los 146 estudios de VPH, 53 correspondían a ASC (36,3%) y 93 a LSIL (63,7%).



De los 100 estudios positivos para VPH-AR, 74 pacientes con diagnóstico de LSIL resultaron positivos para HPV-AR (74%), y 26 pacientes con diagnóstico de ASC resultaron positivos (26%), lo que indica que la prevalencia del HPV-AR aumenta con el grado de la lesión citológica (asociación estadísticamente significativa con $p < 0,0001$).

1.- OBJETIVO PRINCIPAL: Comprobar si la tinción dual p16/ki67 que se expresa en las células de las citologías ASC-LSIL se asocia con lesión CIN2+ subyacente

La edad media de las 306 pacientes a las que se les realizó la técnica dual p16/ki67 fue de $39,8 \pm 10,4$ años (rango 25,83).

La mayoría de las pacientes (245 pacientes, 80%) eran mayores o igual a 30 años. El resto, 61 pacientes (20%) menores de 30 años.

De las 306 pacientes, 111 mostraban cambios citológicos de ASC y las 195 restantes cambios de LSIL.

IV.1.1.Relación entre técnica dual-resultado citológico:

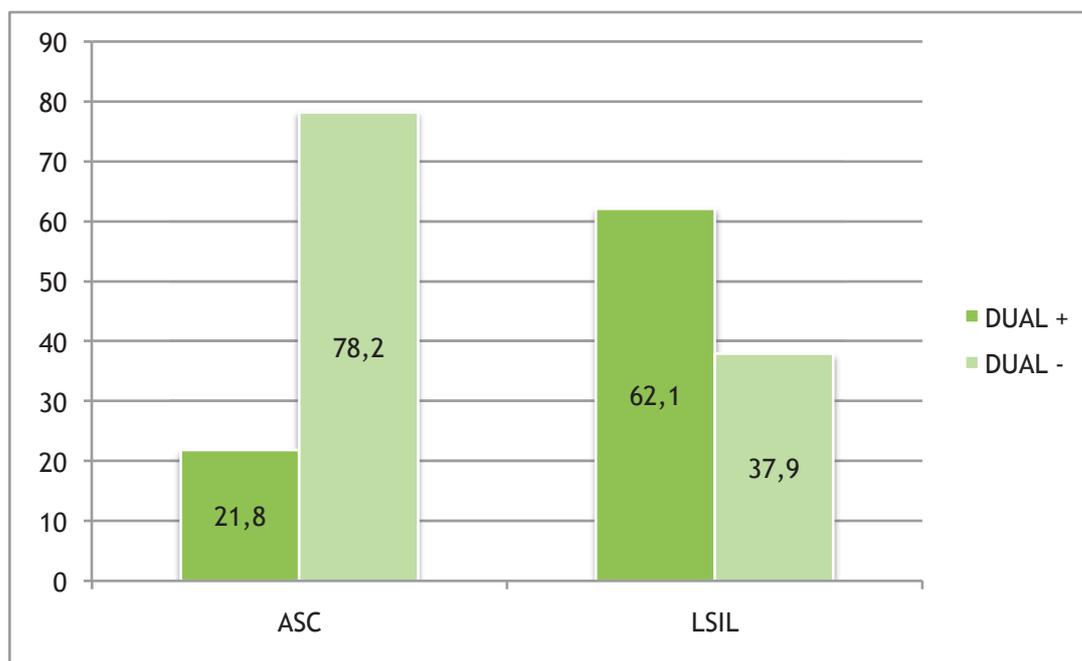
En la *tabla 12* y en la *figura 47*, podemos observar que el 78,2% de las pacientes con citología ASC dieron negativo en la tinción dual frente un 37,9% de las pacientes con citología LSIL. Por otra parte, el 21,8% de las pacientes con citología ASC dieron positivo en la tinción dual frente a un 62,1% de las pacientes con citología LSIL. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=45,36;p<0,001$], con lo que podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la tinción dual es mayor en pacientes con citología LSIL que en las pacientes con citología ASC.

Tabla 12. Tabla de contingencia Tinción dual vs Citología.

Tinción dual	Citología n(%)		Total
	LSIL	ASC	
Positivo	118 _a (62,1)	24 _b (21,8)	142 (47,3)
Negativo	72 _a (37,9)	86 _b (78,2)	158 (52,7)
Total	190 (100,0)	110 (100,0)	300 (100,0)

Chi-cuadrado de Pearson: Valor=45,36; gl=1; p<0,001

a,b. Comparación proporciones de columna. Cada letra de subíndice indica un subconjunto de Citología categorías cuyas proporciones de columna no difieren significativamente entre sí en el nivel 0,05.

Figura 47. Ratio de positividad de la tinción dual p16/ki67 según resultado citológico

En la *tabla 13*, observamos la estimación del riesgo. Como podemos observar, el hecho de que ningún intervalo de confianza en torno a las dos razones de riesgo y al odds ratio incluya el valor 1, nos indica que el riesgo de dar positivo en la tinción dual entre las pacientes LSIL es significativamente superior al de las pacientes ASC.

La razón entre la proporción de pacientes positivos en tinción dual en la muestra de LSIL y la correspondiente a los ASC es de 2,85 pudiéndose afirmar que la proporción de positivos entre los LSIL es 2,85 veces mayor que la misma proporción entre los ASC.

La razón entre la proporción de pacientes negativos en tinción dual en la muestra de LSIL y la correspondiente a ASC es de 0,48, con lo que el riesgo de dar negativo entre los LSIL equivale a 0,48 veces el riesgo de dar negativo entre los ASC, es decir, el riesgo de dar negativo entre los LSIL es inferior a la mitad del mismo riesgo en los ASC.

Respecto a la razón de ventajas u odds ratio, podemos afirmar que la odds (ventaja) de dar positivo en la tinción dual entre los LSIL es 5,87 veces mayor que la misma odds entre los ASC.

Tabla 13. Odds ratio y Riesgo Relativo.

	Valor (IC _{95%})
OR (LSIL / ASC)*	5,87 (3,43 - 10,07)
RR Tinción dual = Positivo	2,85 (1,96 - 4,12)
RR Tinción dual = Negativo	0,48 (0,39 - 0,60)

OR: Odds Ratio. RR=Riesgo relativo. IC_{95%}= Intervalo confianza al 95%

* Grupo referencia: pacientes con Tinción dual=Positivo

Para evaluar la relación entre el resultado de la citología y la tinción dual teniendo en cuenta el posible efecto de la edad, empleamos el método de Cochran-Mantel-Haenszel que permite estimar el OR ajustando por el efecto de la variable de confusión edad.

En la *tabla 14*, podemos observar que el 72,7% de las pacientes <30 años con citología ASC dieron negativo en la tinción dual, similar al 78,8% de las pacientes ≥30 años, lo cual significa que no hay diferencias significativas en el nivel 0,05 con respecto a la edad de la mujer.

Del mismo modo, podemos también observar en la *figura 48* que tanto el 32,7% de las mujeres menores de 30 años con citología LSIL como el 39,7% de las mayores o igual a 30 años son negativas para la técnica dual, por lo que tampoco hay diferencias significativas para este diagnóstico citológico, en el nivel 0,05 con respecto a la edad de la paciente.

En uno y otro grupo se sigue manteniendo, independientemente de la edad, diferencias estadísticamente significativas (como evidencia la prueba Chi-cuadrado) entre las pacientes con citología ASC y las pacientes con citología LSIL, tanto en las mujeres ≥ 30 años [$\chi^2=36,01; p<0,001$], como en las mujeres <30 años [$\chi^2=6,01; p=0,014$]. Por tanto podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la tinción dual es mayor en pacientes con citología LSIL que en las pacientes con citología ASC. Y no depende, por tanto, de la edad de la paciente.

Tabla 14. Tabla de contingencia Tinción dual vs Citología por grupos de edad.

Edad	Tinción dual	Citología n(%)		Total
		LSIL	ASC	
< 30 años (1)	Positivo	33 _a (67,3)	3 _b (27,3)	36 (60,0)
	Negativo	16 _a (32,7)	8 _b (72,7)	24 (40,0)
	Total	49 (100)	11 (100)	60 (100)
≥ 30 años (2)	Positivo	85 _a (60,3)	21 _b (21,2)	106 (44,2)
	Negativo	56 _a (39,7)	78 _b (78,8)	134 (55,8)
	Total	141 (100)	99 (100)	240 (100)

(1) Chi-cuadrado de Pearson: Valor=6,01; gl=1; p=0,014

(2) Chi-cuadrado de Pearson: Valor=36,01; gl=1; p<0,001

a,b. Comparación proporciones de columna. Cada letra de subíndice indica un subconjunto de Citología categorías cuyas proporciones de columna no difieren significativamente entre sí en el nivel 0,05.

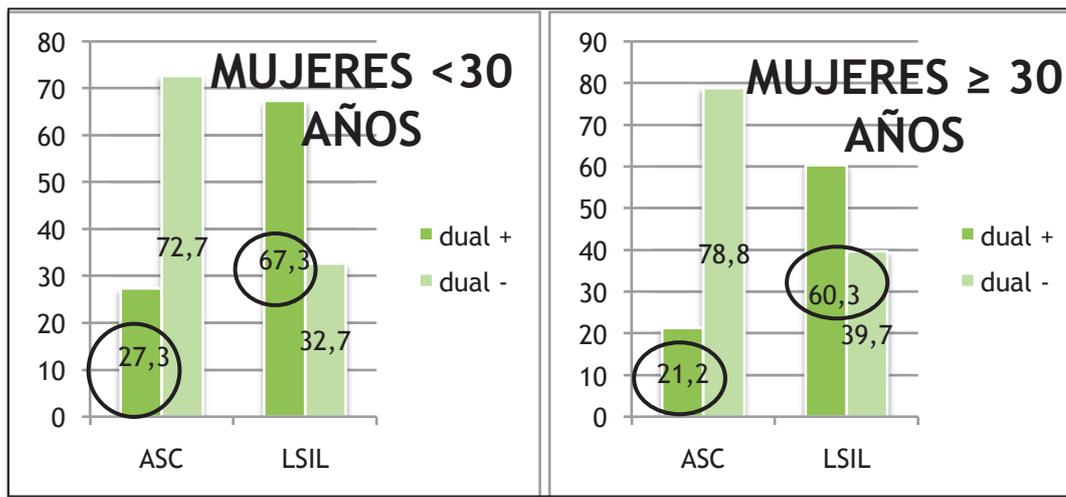


Figura 48 . Ratio de positividad de la tinción dual según edad y resultado citológico

En la *tabla 15*, se observa que los resultados en términos de Razón de Odds, son muy similares entre los dos estratos $OR_{<30 \text{ años}}=5,50$ y $OR_{\geq 30 \text{ años}}=5,64$, donde el riesgo de dar positivo en la tinción dual entre los LSIL es más de 5 veces mayor que entre los ASC. La prueba de homogeneidad de Breslow-Day permite comparar estadísticamente si las OR por estratos son iguales ($H_0:OR_{<30 \text{ años}}=OR_{\geq 30 \text{ años}}$). En este caso, la prueba de homogeneidad nos permite concluir que hay evidencias suficientes para no rechazar la hipótesis nula [$\chi^2=0,001;p=0,975$] por lo que, la variable edad no modifica el resultado en tinción dual entre LSIL y ASC.

El resultado sin tener en cuenta la variable edad ($OR_{\text{cruda}}=5,87$), no varía sustancialmente del resultado ajustando por dicha variable a través del método de Mantel- Haenszel ($OR_{<30 \text{ años} - \geq 30 \text{ años}}=5,62$).

Dado que el método de Mantel-Haenszel proporciona una estimación insesgada de la OR de la población de referencia, podemos cuantificar la magnitud del sesgo entre las dos estimaciones en términos porcentuales. Desde el punto de vista estadístico, se considera como variable confusora, aquella variable que produce un sesgo de confusión (al comparar $OR_{<30 \text{ años} - \geq 30 \text{ años}}$ vs. OR_{cruda}) superior al 10%.

$$((OR_{cruda} / OR_{<30 \text{ años} - \geq 30 \text{ años}}) - 1) \times 100\% = ((5,87/5,62) - 1) \times 100\% = 4,45\%$$

El sesgo de confusión debido a la variable edad es de un 4,45%, inferior al límite establecido y considerando la variable edad no modificadora del resultado en tinción dual entre LSIL y ASC.

Tabla 15. Odds ratio y Riesgo Relativo por grupos edad.

	Valor (IC _{95%})
Edad	
<30 años	
OR (LSIL / ASCUS)*	5,50 (1,28 – 23,57)
RR Tinción dual = Positivo	2,47 (0,92 – 6,61)
RR Tinción dual = Negativo	0,45 (0,26 – 0,77)
≥ 30 años	
OR (LSIL / ASCUS)*	5,64 (3,13 - 10,15)
RR Tinción dual = Positivo	2,84 (1,90 – 4,25)
RR Tinción dual = Negativo	0,50 (0,40 – 0,63)
Común de Mantel-Haenszel	
OR (LSIL / ASCUS)*	5,62 (3,26 – 9,69)

OR: Odds Ratio. RR=Riesgo relativo. IC_{95%}= Intervalo confianza al 95%

***Grupo referencia: pacientes con Tinción dual=Positivo**

Breslow-Day: $\chi^2=0,001$; $p=0,975$

Mantel-Haenszel: $\chi^2=40,2$; $p<0,001$

IV.1.2. Relación entre la técnica dual y el resultado histológico. Evaluación diagnóstica para determinar CIN2+

Para estudiar la posible asociación de la positividad de la técnica dual con la lesión histológica CIN2+ se seleccionaron, entre las 306 pacientes con determinaciones inmunohistoquímicas, aquellas con biopsia posterior:

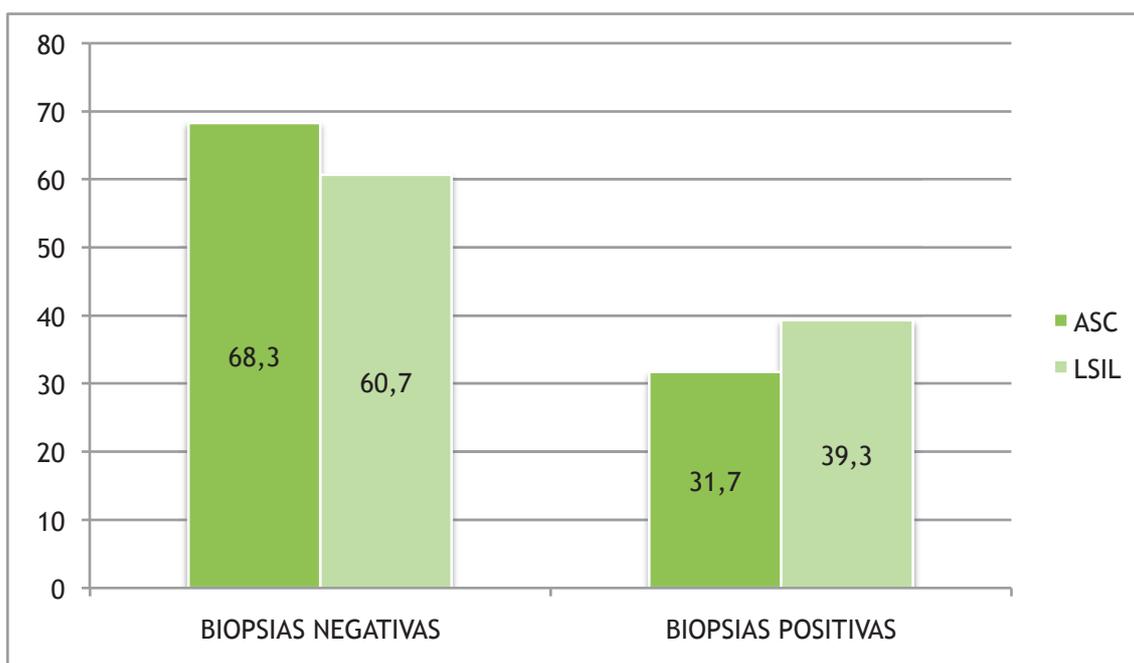
*153 PACIENTES BIOPSIADAS (TOTAL= 306 PACIENTES): 50%

- * En 57 pacientes se diagnosticó CIN2+ (18,6%)
- * En 80 pacientes se diagnosticó CIN-1 (26,1%)
- * En 16 pacientes no se objetivó displasia (5,2%)

Para estudiar nuestro objetivo, de ahora en adelante agruparemos:

- las biopsias sin displasias y las biopsias con CIN-1 en BIOPSIAS NEGATIVAS.
- Las biopsias CIN2+ como BIOPSIAS POSITIVAS

Figura 49. Diagnósticos histológicos (%) según resultados ASC/LSIL



En la *figura 49* y en la *tabla 16*, podemos observar que el 39,3% de las pacientes con citología LSIL dieron positivo en la biopsia frente a un 31,7% de las pacientes con citología ASC. Por otra parte, el 60,7% de las pacientes con citología LSIL dieron negativo en la biopsia frente a un 68,3% de las pacientes con citología ASC. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados no son estadísticamente significativos [$\chi^2=0,74$; $p=0,390$], por tanto el resultado de la biopsia no depende de la citología, con lo que podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la biopsia es semejante en pacientes con citología LSIL que en las pacientes con citología ASC.

Tabla 16. *Tabla de contingencia Biopsia vs Citología*

Biopsia	Citología n(%)		Total
	LSIL	ASC	
Positiva	44 _a (39,3)	13 _a (31,7)	57 (37,3)
Negativa	68 _a (60,7)	28 _a (68,3)	96 (62,7)
Total	112 (100,0)	41 (100,0)	153 (100,0)
Chi-cuadrado de Pearson: Valor=0,74; gl=1; p=0,390			

a.Comparación proporciones de columna. Cada letra de subíndice indica un subconjunto de Citología categorías cuyas proporciones de columna no difieren significativamente entre sí en el nivel 0,05.

Vemos por tanto que por sí solo, el diagnóstico citológico ASC/LSIL no sirve para predecir lesión CIN2+ subyacente (BIOPSIA POSITIVA).

Por eso introducimos la tinción dual p16/ki67 en el triage de ASC/LSIL para predecir lesión CIN2+ subyacente, obteniendo los siguientes resultados (*tabla 17*):

Tabla 17. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual

Tinción dual	Biopsia n(%)		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	52	43	95
Negativa	4	52	56
Total	56	95	151

En la *figura 50*, observamos que el 92,9% de las pacientes con biopsia positiva dieron positivo en la tinción dual frente un 7,1% de las pacientes con tinción dual negativa. Por otra parte, el 45,3% de las pacientes con biopsia negativa dieron positivo en la tinción dual frente un 54,7% de las pacientes con tinción dual negativa. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=34,20;p<0,001$], por tanto podemos afirmar que el porcentaje de CIN2+ en la biopsia es mayor en pacientes con tinción dual positiva que en las pacientes con tinción dual negativa.

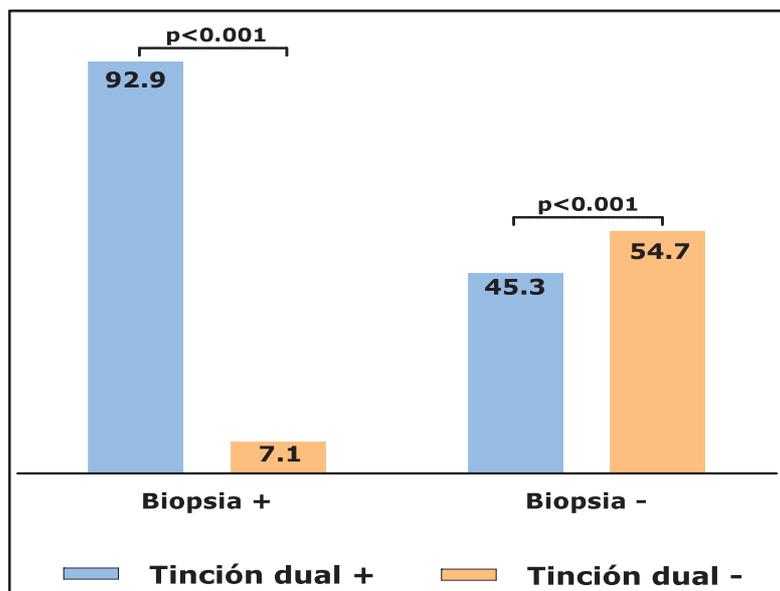


Figura 50. Distribución de biopsias según resultado de técnica dual

La sensibilidad de la técnica dual en citologías ASC-LSIL para detectar lesión CIN2+ subyacente ha sido del 92,8% (*tabla 18*).

La especificidad de la técnica dual en citologías ASC-LSIL para descartar lesión CIN2+ subyacente ha sido del 54,7%.

Tabla 18. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+

Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
Sensibilidad	92,86	85,2 – 100,0
Especificidad	54,74	44,2 – 65,3
Valor predictivo +	54,74	44,2 – 65,3
Valor predictivo -	92,86	85,2 – 100,0

IV.1.2.1. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+ por grupos de edad

Tabla 19. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual

Edad	Tinción dual	Biopsia n (%)		Total
		Positiva	Negativa	
< 30 años	Positivo	15	11	26
	Negativo	0	6	6
	Total	15	17	32
≥ 30 años	Positivo	37	32	69
	Negativo	4	46	50
	Total	41	78	119

- Para mujeres <30 años:

En la *figura 51* podemos observar que el 100% de las pacientes con biopsia positiva han resultado positivas con la técnica dual, sin casos negativos para la tinción dual (*tabla 19*). En las biopsias negativas se ha visto también el mayor nº de técnicas duales positivas que negativas, con una diferencia estadísticamente significativa para $p < 0,05$ [$\chi^2=6,52; p=0,011$]

- Para mujeres ≥ 30 años:

En la misma *figura 51* observamos que el 90,2% de las pacientes con biopsia positiva han resultado también positivas con la técnica dual frente al 9,8% de las pacientes también con biopsia positiva que dieron negativa en la técnica dual. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos, por tanto podemos afirmar que en las biopsias positivas es mayor el porcentaje de resultados positivos, como en las biopsias negativas los resultados negativos [$\chi^2=26,72; p < 0,001$]

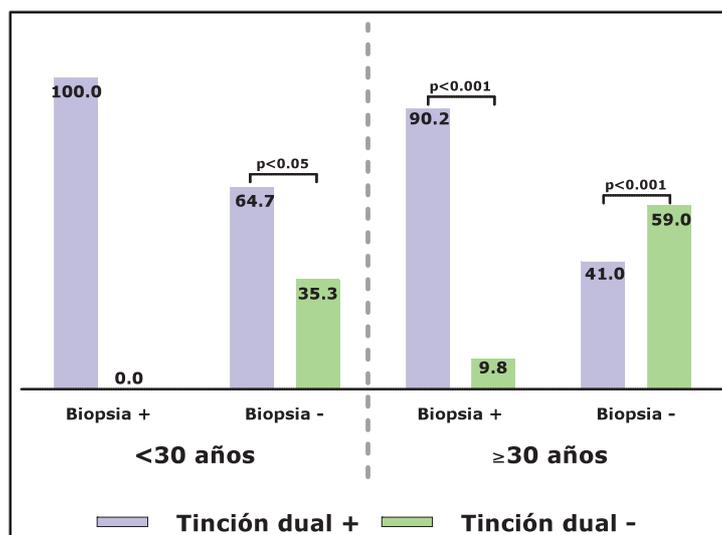


Figura 51. Nº de biopsias (%) según resultado de la técnica dual

Tabla 20. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+ por grupos de edad.

Edad	Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
< 30 años	Sensibilidad	100	96,7 -100
	Especificidad	35,29	9,6 -60,9
	Valor predictivo +	57,69	36,8 -78,6
	Valor predictivo -	100	91,7 -100
≥ 30 años	Sensibilidad	90,24	79,9 -100
	Especificidad	58,97	47,4 -70,5
	Valor predictivo +	53,62	41,1 -66,1
	Valor predictivo -	92,00	83,5 -100

Vemos que la variable edad no modifica el resultado en tinción dual para determinar CIN2+ (tabla 20).

En la especificidad se ven diferencias significativas con respecto a la edad, siendo mayor en las mujeres ≥ 30 años.

IV.1.2.2. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+, según diagnóstico citológico (ASC ó LSIL)

Tabla 21. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual.

Citología	Tinción dual	Biopsia n(%)		Total
		Positiva	Negativa	
ASC	Positivo	9	8	17
	Negativo	3	20	23
	Total	12	28	40
LSIL	Positivo	43	35	78
	Negativo	1	32	33
	Total	44	67	111

- ASC:

De los 111 casos diagnosticados citológicamente como ASC, 24 resultaron positivos para la técnica dual p16/ki67 y 86 negativos para la misma técnica. Sólo un caso de ASC fue imposible valorarlo como positivo o negativo, por mala realización de la técnica inmunohistoquímica.

A 40 pacientes se les realizó biopsia (tabla 21):

+ Entre las 12 biopsias positivas para CIN2+ subyacentes a ASC, 9 fueron positivas para la técnica dual. La sensibilidad de la tinción dual en ASC es de un 75%.

+ Entre las 28 biopsias negativas para CIN2+ subyacentes a ASC, 20 fueron negativas para la técnica dual. La especificidad de la tinción dual en ASC es de 71,4% (tabla 22).

En la figura 52 podemos observar que el 75% de las pacientes con biopsia positiva para CIN2+ dieron positiva la técnica dual frente a un 25% de las pacientes también con biopsia positiva que dieron negativa en la técnica dual. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=7,41; p=0,006$], con lo que podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la tinción dual para ASC es mayor en los pacientes con lesión CIN2+ que en los pacientes con biopsias negativas (normales o CIN1).

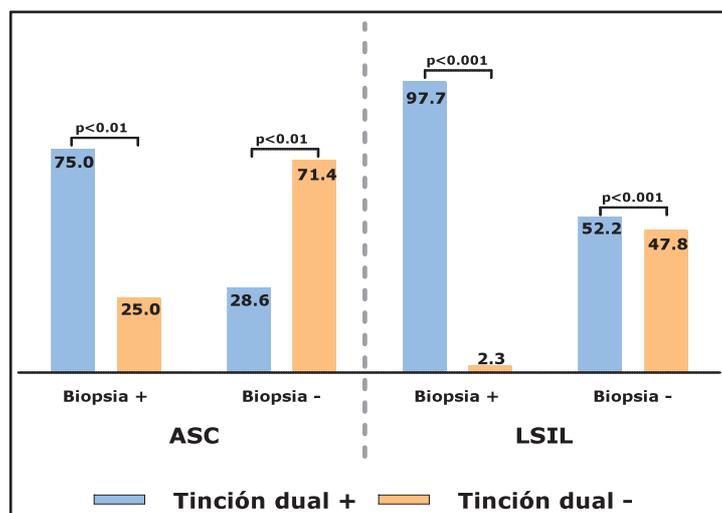


Figura 52. N° de biopsias (%) según técnica dual, para ASC y LSIL

- LSIL:

De los 195 casos diagnosticados citológicamente como LSIL, 118 resultaron positivos para la técnica dual p16/ki67 y 72 negativos para la misma técnica. 5 casos de LSIL fueron imposible de valorar como positivo o negativo, por mala realización de la técnica inmunocitoquímica.

A 111 pacientes se les realizó biopsia (*tabla 21*):

+ Entre las 44 biopsias positivas para CIN2+ subyacentes a LSIL, 43 fueron positivas para la técnica dual. La sensibilidad de la tinción dual en LSIL fue de un 97,73%.

+ Entre las 67 biopsias negativas para CIN2+ subyacentes a LSIL, 32 fueron negativas para la técnica dual. La especificidad de la tinción dual en LSIL fue de 47,76% (*tabla 22*).

En la *figura 52* podemos observar que en el 97,7% de las pacientes con biopsia positiva para CIN2+ la técnica dual fue positiva, frente a un 2,3% de las pacientes también con biopsia positiva en que fue negativa la técnica dual. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=26,31; p<0,001$]. Por tanto podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la tinción dual para LSIL es mayor en los pacientes con lesión CIN2+ que en los pacientes con biopsias negativas (normales o CIN1).

Tabla 22. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+ según diagnóstico citológico.

Citología	Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
ASC	Sensibilidad	75	46,3 -100
	Especificidad	71,43	52,9 -89,9
	Valor predictivo +	52,94	26,3 -79,6
	Valor predictivo -	86,96	71,0 -100
LSIL	Sensibilidad	97,73	92,2 -100
	Especificidad	47,76	35,1 -60,5
	Valor predictivo +	55,13	43,5 -66,8
	Valor predictivo -	96,97	89,6 -100

IV.1.2.3. Evaluación diagnóstica de Tinción dual para determinar CIN2+, según diagnóstico citológico (ASC ó LSIL), y según grupo de edad

Tabla 23. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual.

Edad	Citología	Tinción dual	Biopsia n(%)		Total
			Positiva	Negativa	
<30 años	ASC	Positivo		1	1
		Negativo		1	1
		Total		2	2
	LSIL	Positivo	15	10	25
		Negativo		5	5
		Total	15	15	30
≥ 30 años	ASC	Positivo	9	7	16
		Negativo	3	19	22
		Total	12	26	38
	LSIL	Positivo	28	25	53
		Negativo	1	27	28
		Total	29	52	81

Puesto que no se han detectado casos en el presente estudio de lesiones CIN2+ con citología de ASC en menores de 30 años, no podemos comparar estas lesiones con lo hallado en las mayores o igual a 30 años (*tabla 23*).

Destacar también que todos los casos de CIN2+ con citología LSIL en las mujeres menores de 30 años fueron positivos para la técnica dual.

- LSIL en <30 años:

En la *figura 53*, podemos observar que el 100% de las pacientes con biopsia positiva fueron técnica dual+, y que no hubo casos de técnica dual negativa. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=6,00;p=0,014$], por tanto podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la tinción dual es mayor en pacientes con CIN2+ que en las pacientes con biopsias negativas.

- LSIL en ≥ 30 años:

En la *figura 53*, podemos observar que el 96,6% de las pacientes con biopsia positiva fueron positivas con la técnica dual frente a un 3,4% de pacientes también con CIN2+ que fueron negativas con la técnica. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=19,34;p<0,001$], por tanto podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la tinción dual también es mayor en estas pacientes ≥ 30 años con biopsia CIN2+ que los resultados negativos en tinción dual.

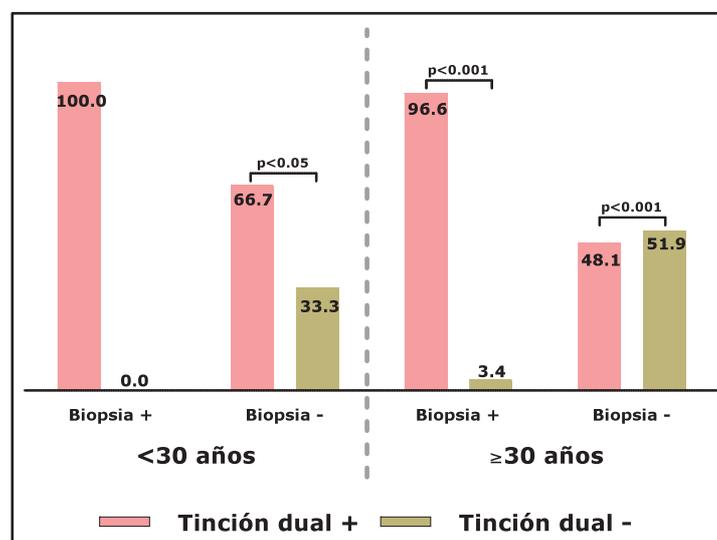


Figura 53. Distribución de biopsias por edad y citología LSIL según resultado de técnica dual (%).

Tabla 24. Tabla de contingencia Biopsia vs Tinción dual por grupos de edad y por diagnósticos citológicos.

Edad	Citología	Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
<30 años	LSIL	Sensibilidad	100	96,7 - 100
		Especificidad	33,33	6,1 - 60,5
		Valor predictivo+	60	38,8 - 81,2
		Valor predictivo -	100	90 -100
≥ 30 años	LSIL	Sensibilidad	96,55	88,2 -100
		Especificidad	51,92	37,4 - 66,5
		Valor predictivo+	52,83	38,4 - 67,2
		Valor predictivo -	96,43	87,8 - 100

2° OBJETIVO: Comparar tasa de positividad entre técnica dual p16/ki-67 y determinación VPH-AR, para detectar lesiones CIN2+

La muestra para este objetivo secundario consistió en 146 pacientes (de las 306 iniciales del objetivo principal). La edad media de las pacientes a las que se les realizó la determinación de VPH fue de $38,5 \pm 9,4$ años (rango 25,65).

Resultados:

- En 100 pacientes la determinación de VPH fue positiva para alto riesgo (68,5%)
- En 39 pacientes fue negativa (26,7%).
- En 7 pacientes no se detectó VPH ni de AR ni de BR (4,8%).

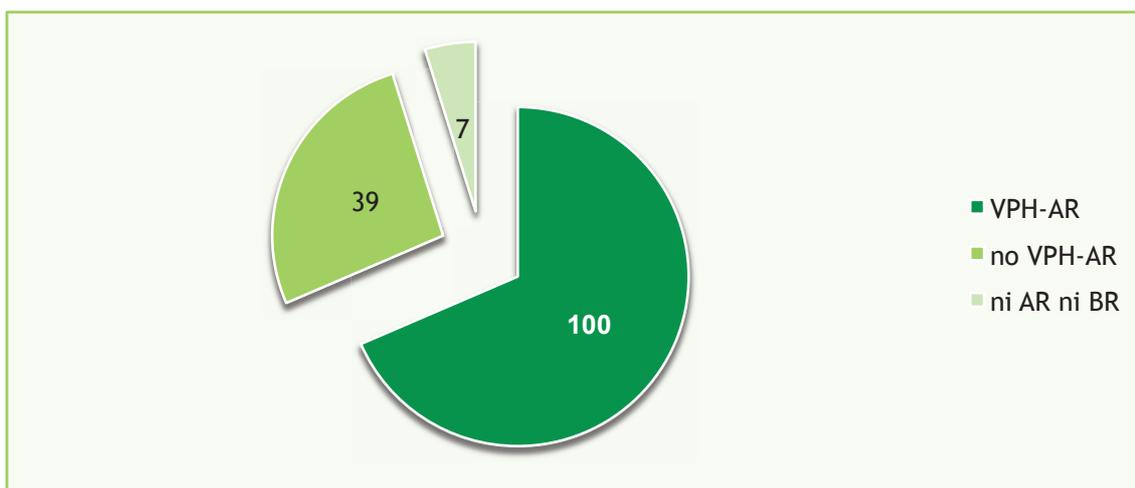


Figura 54. Prevalencia de VPH en nuestro estudio (%)

IV.2.1. Relación entre determinación viral VPH-AR y resultado citológico

De las 146 pacientes, 53 se diagnosticaron citológicamente como ASC y las 93 restantes como LSIL. En 7 no se detectó ADN viral y/o fue negativo tanto para VPH-AR como para VPH-BR (1 ASC no valorable y 6 LSIL no valorables).

Tabla 25. Tabla de contingencia VPH-AR vs Citología.

VPH-AR	Citología n(%)		Total
	LSIL	ASC	
Positivo	74 _a (85,1)	26 _b (50,0)	100 (71,9)
Negativo	13 _a (14,9)	26 _b (50,0)	39 (28,1)
Total	87 (100,0)	52 (100,0)	139 (100,0)

Chi-cuadrado de Pearson: Valor=19,82; gl=1; p<0,001

a,b. Comparación proporciones de columna. Cada letra de subíndice indica un subconjunto de Citología categorías cuyas proporciones de columna no difieren significativamente entre sí en el nivel 0,05.

En la *tabla 25* y en la *figura 55*, podemos observar que el 50% de las pacientes con citología ASC dieron negativo en la determinación viral HPV-AR frente un 14,9% de las pacientes con citología LSIL. Por otra parte, el 50% de las pacientes con citología ASC dieron positivo en la determinación viral VPH-AR frente a un 85,1% de las pacientes con citología LSIL. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos, por tanto podemos afirmar que el porcentaje de positivos en la determinación viral HPV-AR es mayor en pacientes con citología LSIL que en las pacientes con citología ASC.

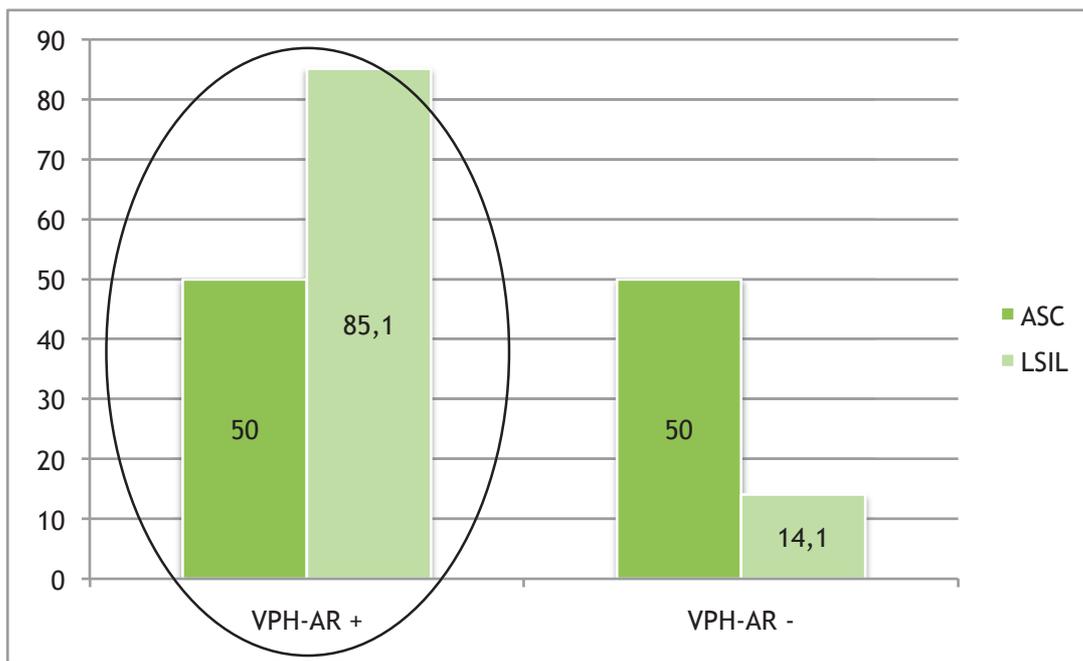


Figura 55. Ratio de positividad de la determinación VPH-AR según resultado citológico (%)

Tabla 26. Odds ratio y Riesgo Relativo

	Valor (IC _{95%})
OR (LSIL / ASC)*	5,69 (2,55 – 12,69)
RR VPH-RA = Positivo	1,70 (1,28 – 2,26)
RR VPH-RA = Negativo	0,29 (0,17 - 0,53)

OR: Odds Ratio. RR=Riesgo relativo. IC_{95%}= Intervalo confianza al 95%

* Grupo referencia: pacientes con VPH-RA=Positivo

En la *tabla 26*, observamos la estimación del riesgo. Como podemos observar, el hecho de que ningún intervalo de confianza en torno a las dos razones de riesgo y al odds ratio incluya el valor 1, nos indica que el riesgo de dar positivo en la técnica de

determinación VPH-AR entre las pacientes LSIL es significativamente superior al de las pacientes ASC.

La razón entre la proporción de pacientes positivos en la determinación viral en la muestra de LSIL y la correspondiente a los ASC es de 1,70, pudiéndose afirmar que la proporción de positivos entre los LSIL es 1,70 veces mayor que la misma proporción entre los ASC.

La razón entre la proporción de pacientes negativos en la determinación viral en la muestra de LSIL y la correspondiente a ASC es de 0,29, con lo que el riesgo de dar negativo entre los LSIL equivale a 0,29 veces el riesgo de dar negativo entre los ASC.

Respecto a la razón de ventajas u odds ratio, podemos afirmar que la odds (ventaja) de dar positivo en la tinción dual entre los LSIL es 5,69 veces mayor que la misma odds entre los ASC.

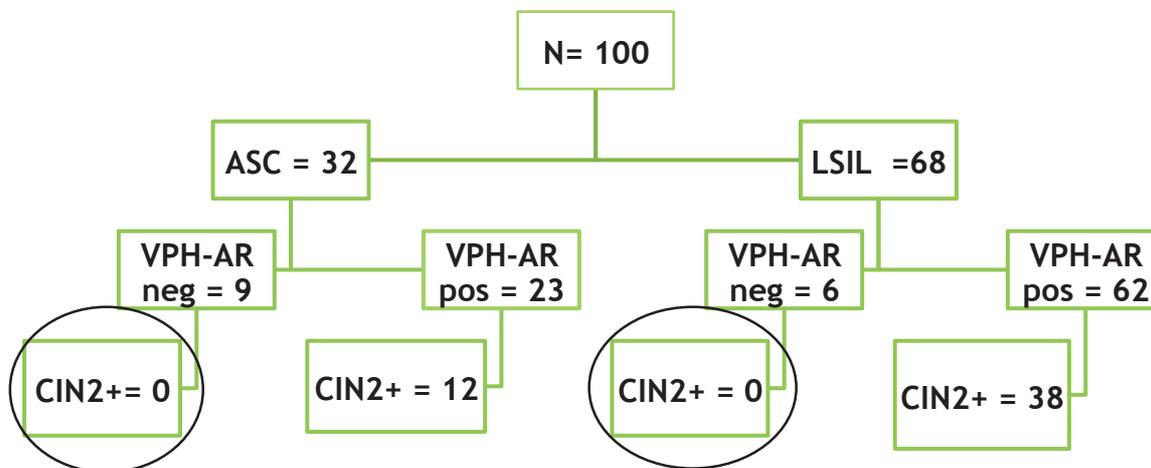
IV.2.2.Relación entre la determinación viral y la lesión histológica (biopsia).

Evaluación diagnóstica de la determinación viral VPH-AR para determinar CIN2+.

Para estudiar la posible asociación de la determinación de HPV con la lesión histológica CIN2+ se seleccionaron, entre las 146 pacientes las que tenían biopsia posterior:

- * En 57 pacientes se diagnosticó CIN2+ (18,6%); en 7 de ellas no se pudo demostrar ADN viral, ni AR ni BR.
- * En 50 pacientes no se objetivó lesión intraepitelial de alto grado (normal o CIN1).

De las 107 biopsias con determinación de VPH, 7 de ellas, pese a repetición del test, no detectaron presencia de ADN viral, lo que deja el análisis de las muestras en 100 válidas:



Como se ve en este diagrama, no hemos visto ningún caso CIN2+ confirmado en el que la determinación de VPH-AR no haya sido positiva.

Tabla 27. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR.

VPH-AR	Biopsia n (%)		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	50	35	85
Negativa	0	15	15
Total	50	50	100

En la *figura 56* observamos que el 100% de las pacientes con biopsia positiva dieron positivo en la determinación VPH-AR y que no hubo casos de lesión CIN2+ que confirmara VPH-AR negativo. Por otra parte, el 70% de las pacientes con biopsia negativa dieron también positivo en la determinación VPH-AR dual frente a un 30% de las pacientes con determinación VPH-AR negativa. La prueba Chi-cuadrado evidencia

que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=17,65;p<0,001$], por lo tanto el resultado de la determinación viral claramente no sirve para discriminar el resultado de la biopsia.

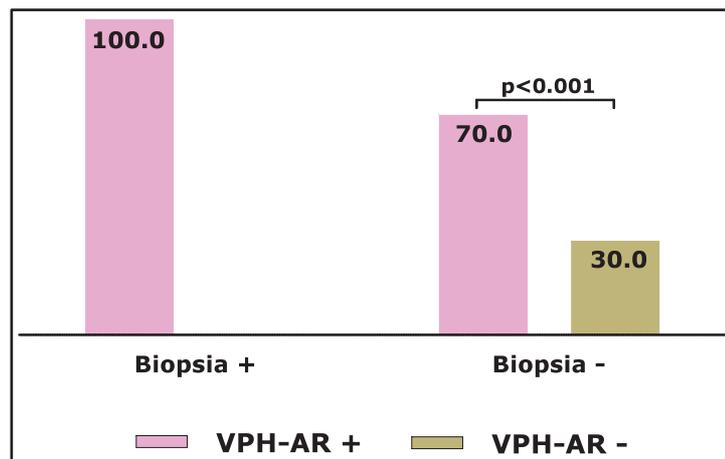


Figura 56. Distribución de biopsias según resultado de la determinación viral VPH-AR

Tabla 28. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+

Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
Sensibilidad	100	99 - 100
Especificidad	30	16,3 - 43,7
Valor predictivo +	58,82	47,8 - 69,9
Valor predictivo -	100	96,7 -100

IV.2.2.1. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ por grupos de edad

Tabla 29. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR.

Edad	VPH-AR	Biopsia n (%)		Total
		Positiva	Negativa	
< 30 años	Positivo	15	5	20
	Negativo	0	2	2
	Total	15	7	22
≥ 30 años	Positivo	35	30	65
	Negativo	0	13	13
	Total	35	43	78

✓ Mujeres <30 años:

En la *figura 57* observamos que el 100% de las pacientes con biopsia positiva dieron positivo en la determinación VPH-AR. Por otra parte, el 71,4% de las pacientes con biopsia negativa dieron positivo dicha determinación viral frente un 28,6% de las pacientes con determinación viral AR negativa. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=4,71;p=0,030$].

✓ Mujeres ≥30 años:

En la misma *figura 57* observamos que también el 100% de las pacientes con biopsia positiva dieron positivo en la determinación VPH-AR. Por otra parte, el 69,8% de las pacientes con biopsia negativa dieron positivo en dicha determinación viral frente un 30,2% de las pacientes con VPH-AR negativo. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=12,69;p<0,001$].

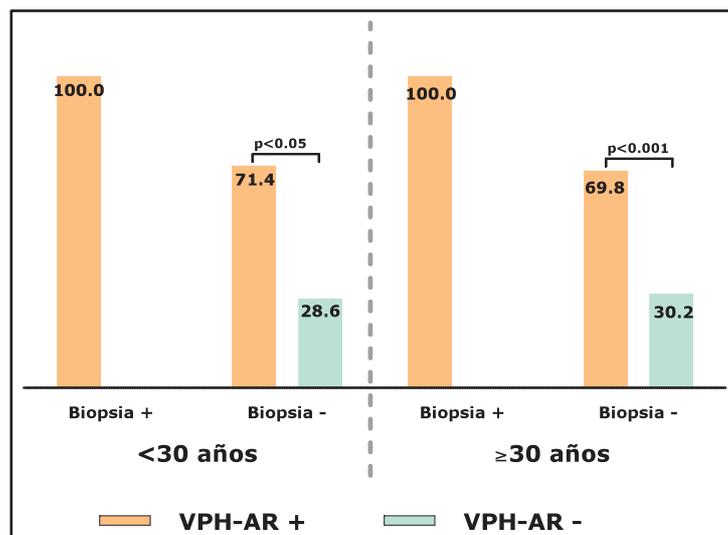


Figura 57. Distribución de biopsias según determinación VPH-AR, para <30 años y para ≥ 30 años

Claramente se observa cómo no hay diferencias significativas con la edad; la edad es independiente del resultado de la determinación viral VPH-AR con respecto a las biopsias.

Se observa claramente como en las biopsias negativas es significativamente superior los resultados positivos para la determinación viral VPH-AR. Vemos cómo el resultado de la determinación viral no nos sirve para determinar cuál va a ser el resultado de la biopsia.

Tabla 30. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ por grupos de edad.

Edad	Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
< 30 años	Sensibilidad	100	96,7 -100
	Especificidad	28,57	0 -69,2
	Valor predictivo +	75	53,5 -96,5
	Valor predictivo -	100	75 -100
≥ 30 años	Sensibilidad	100	98,6 -100
	Especificidad	30,23	15,3 -45,1
	Valor predictivo +	53,85	40,9 -66,7
	Valor predictivo -	100	96,2 -100

IV.2.2.2. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ según diagnóstico citológico (ASC ó LSIL)

Analizamos los datos de la relación entre diagnóstico citológico y determinación de VPH-AR de manera independiente:

Tabla 31. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR por diagnósticos citológicos.

Citología	VPH-AR	Biopsia n (%)		Total
		Positiva	Negativa	
ASC	Positivo	12	11	23
	Negativo	0	9	9
	Total	12	20	32
LSIL	Positivo	38	24	62
	Negativo	0	6	6
	Total	38	30	68

✓ ASC:

En la *figura 58*, podemos observar que el 100% de las pacientes con biopsia positiva para CIN2+ dieron positiva para VPH-AR. Entre las pacientes con biopsia negativa el 55% dio positiva en la determinación viral frente al 45% que dio negativo. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=7,51; p=0,006$], por tanto el resultado de la determinación viral VPH-AR no sirve para discriminar el resultado final de la biopsia, ya que el porcentaje de positivos tanto en biopsias negativas como en positivas es bastante superior al porcentaje de negativos en biopsias negativas.

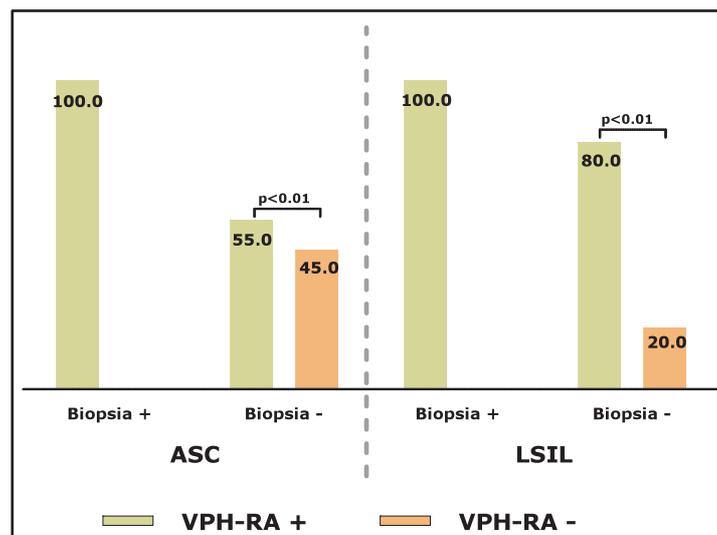


Figura 58. Distribución de biopsias según determinación VPH-AR para ASC y LSIL

✓ LSIL:

En la *figura 58*, podemos observar que el 100% de las pacientes con biopsia positiva para CIN2+ dieron positiva la técnica de determinación VPH-AR. En las biopsias negativas también la determinación viral positiva fue significativamente superior al resultado negativo. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=8,34;p=0,004$], por tanto el resultado de la prueba VPH-AR no sirve para discriminar el resultado final de la biopsia.

Tabla 32: Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ por diagnósticos citológicos

Citología	Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
ASC	Sensibilidad	100	95,8 -100
	Especificidad	45	20,7 -69,3
	Valor predictivo +	52,17	29,6 -74,8
	Valor predictivo -	100	94,4 -100
LSIL	Sensibilidad	100	98,7 -100
	Especificidad	20	4,0 -35,9
	Valor predictivo +	61,29	48,4 -74,2
	Valor predictivo -	100	91,7 -100

IV.2.2.3. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ según diagnóstico citológico (ASC ó LSIL) y según grupo de edad

Tabla 33. Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR.

Edad	Citología	VPH-RA	Biopsia n(%)		Total
			Positiva	Negativa	
<30 años	ASC	Positivo		2	2
		Negativo			
		Total		2	2
	LSIL	Positivo	15	3	18
Negativo		0	2	2	
Total		15	5	20	
≥ 30 años	ASC	Positivo	12	9	21
		Negativo		9	9
		Total	12	18	30
	LSIL	Positivo	23	21	44
Negativo		0	4	4	
Total		23	25	48	

Con respecto a la edad, vemos que en ambos grupos todas las biopsias positivas han resultado positivas para la prueba de determinación viral VPH-AR (*tabla 33*).

- Menores de 30 años:
 - Sólo se detectaron dos ASC con resultado de la determinación viral VPH-AR positiva, que luego fueron negativos en la biopsia para CIN2+.
 - Podemos observar en LSIL que el 100% de las pacientes con biopsia positiva para CIN2+ dieron positiva la técnica de determinación VPH-AR (*figura 59*). En las biopsias negativas también la determinación viral positiva fue significativamente superior al resultado negativo. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=6,67;p=0,010$], por tanto el resultado de la prueba VPH-AR no sirve para discriminar el resultado final de la biopsia.

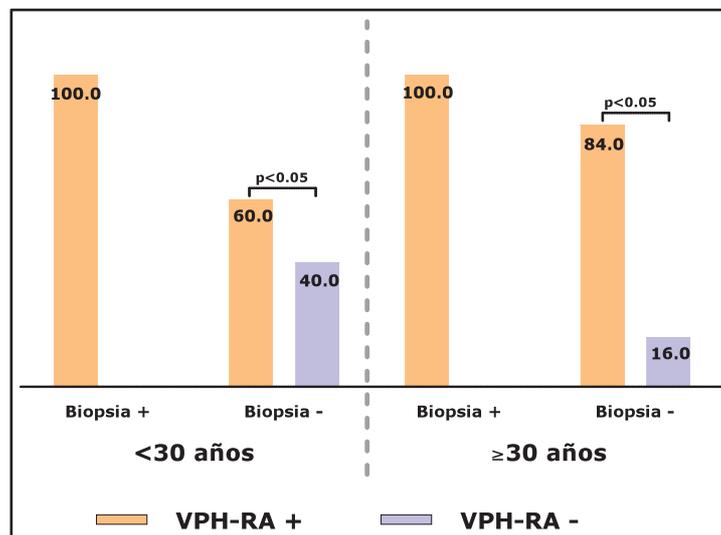


Figura 59. Distribución de biopsias por edad y citología LSIL según resultado de VPH-AR (%).

- Mayores de 30 años:

En las biopsias negativas también la determinación viral positiva fue significativamente superior al resultado negativo. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados son estadísticamente significativos [$\chi^2=6,67; p=0,010$], por tanto el resultado de la prueba VPH-AR no sirve para discriminar el resultado final de la biopsia.

Tabla 34. Evaluación diagnóstica de VPH-AR para determinar CIN2+ para ASC y LSIL, por edad.

Edad	Citología	Estadísticos	Valor (%)	IC _{95%}
<30 años	LSIL	Sensibilidad	100	96,67 -100
		Especificidad	40	0 -92,9
		Valor predictivo +	83,33	63,3 -100
		Valor predictivo -	100	75 -100
≥ 30 años	LSIL	Sensibilidad	100	97,8 -100
		Especificidad	16	0 -32,4
		Valor predictivo +	52,27	36,4 -68,2
		Valor predictivo -	100	87,5 -100

IV.2.3.Comparación entre ambas técnicas: DUAL Y VPH-AR

Conocida ya la sensibilidad y la especificidad en nuestro estudio tanto para la técnica dual como para la determinación viral VPH-AR, de manera global e independientemente para ASC y LSIL, pasamos a comparar gráficamente ambas técnicas desde el punto de vista de sensibilidad , especificidad, VPP y VPN (figura 60).

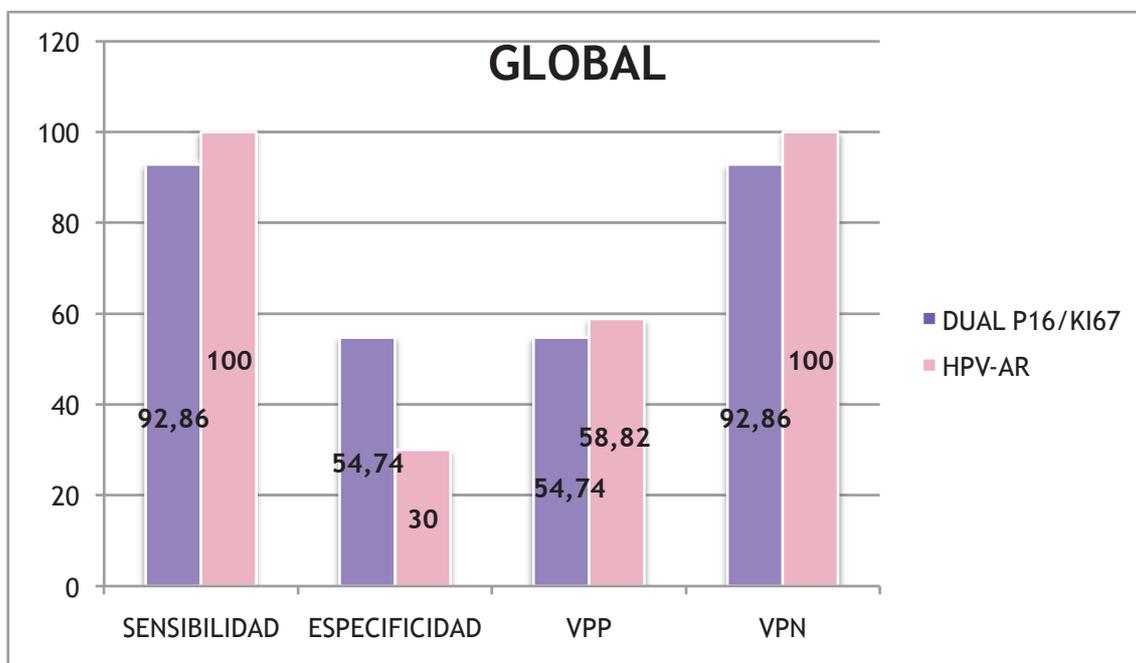


Figura 60. Comparativa de evaluaciones diagnósticas entre técnica dual y determinación VPH-AR, global (ASC+LSIL)

De manera global (ASC + LSIL) se observa una similar sensibilidad entre ambos tests, pero con una diferencia en ESPECIFICIDAD estadísticamente significativa a favor de la técnica dual p16/ki67 para detectar CIN2+, siendo $p=0,044$ ($p<0,05$).

Con respecto a la edad, y únicamente de manera global (ASC+LSIL) se observa una diferencia estadísticamente significativa a favor de la técnica dual para mujeres ≥ 30 años ($p=0,021$, $p<0,05$). En mujeres <30 años no existe esa diferencia significativa (tabla 35).

Tabla 35. Comparación CINtec PLUS y VPH para detección de CIN2+

	CINtec PLUS (IC_{95%})	VPH (IC_{95%})	p
ACS (n=31)			
Sensibilidad %	81,8 (54,5-100)	100,0 (95,5-100)	---
Especificidad %	70,0 (47,4-92,6)	45,0 (20,7-69,3)	0,180
LSIL (n=67)			
Sensibilidad %	97,4 (90,9-100)	100,0 (98,7-100)	---
Especificidad %	34,5 (15,5-53,5)	17,2 (1,77-32,7)	0,227
ASC+LSIL (n=98)			
Sensibilidad %	93,9 (86,1-100)	100,0 (98,9-100)	---
Especificidad %	49,0 (33,9-64,0)	28,6 (14,9-42,2)	0,044*
EDAD			
<30 años (n=22)			
Sensibilidad %	100,0 (96,7-100)	100,0 (96,7-100)	---
Especificidad %	28,6 (0-69,2)	28,6 (0-69,2)	---
≥ 30 años (n=76)			
Sensibilidad %	91,2 (80,2-100)	100,0 (98,5-100)	----
Especificidad %	52,4 (36,1-68,7)	28,6 (13,7-43,4)	0,021*
* $p<0,05$			

El VPP para lesiones CIN2+ de la técnica dual fue del 54,74%, muy similar al 58,82 de la determinación viral, sin significación estadística.

El VPN en lesiones CIN2+ de la técnica dual fue del 92,86%, algo inferior al 100% de la determinación viral, aunque no con diferencias estadísticamente significativas.

Hacemos también la misma comparación de ambas técnicas según los diagnósticos citológicos Bethesda 2001:

- **ASC:**

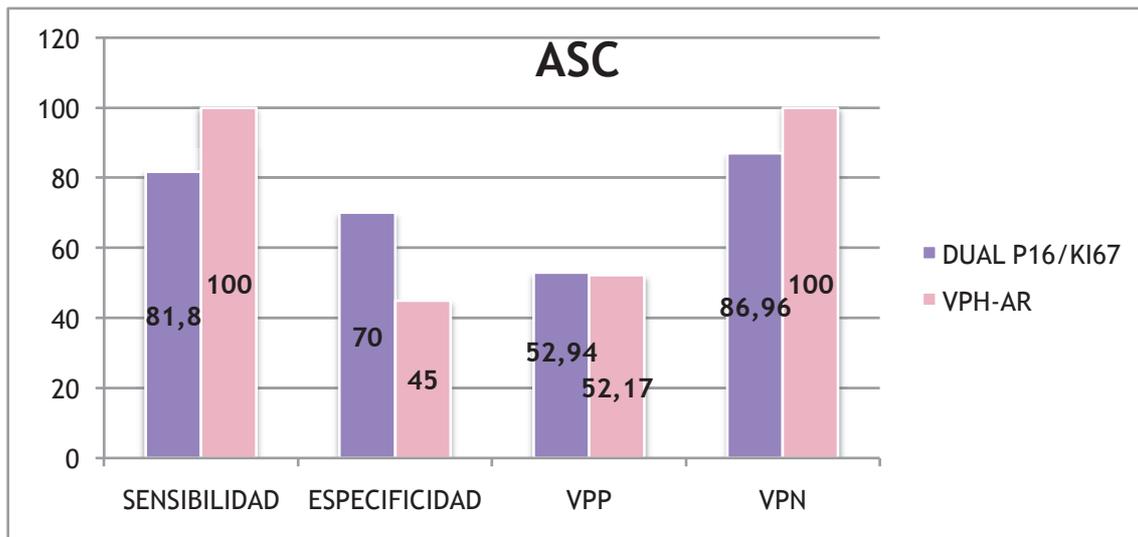


Figura 61. Comparativa de evaluaciones diagnósticas entre técnica dual y determinación VPH-AR para ASC

Vemos como no hay diferencias significativas entre la sensibilidad y la especificidad de ambas técnicas, siendo la p en la especificidad de 0,180.

- **LSIL:**

Vemos como la sensibilidad en nuestro estudio entre la técnica dual p16/ki67 y los tests de HPV-AR es similar, no existiendo diferencias estadísticamente significativas.

La especificidad no ha resultado estadísticamente significativa, con una $p=0,227$.

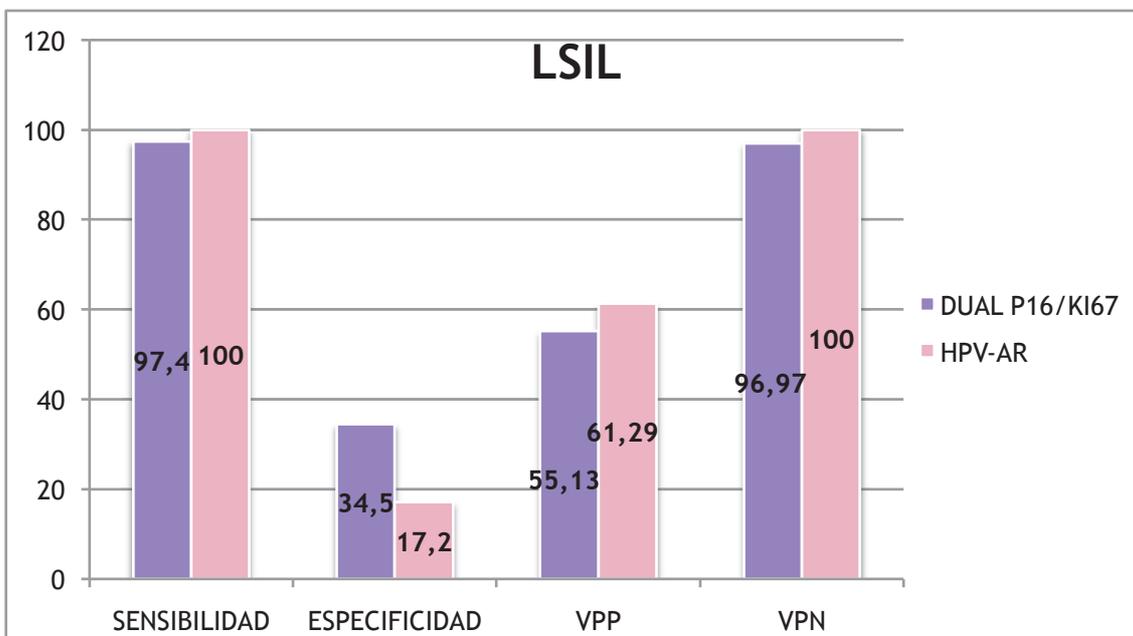


Figura 62. Comparativa de evaluaciones diagnósticas entre técnica dual y determinación VPH-AR para LSIL

IV.2.4. Resultados de concordancia entre los métodos evaluados

La concordancia global obtenida en los dos métodos evaluados fue del 77%, con un índice kappa de 0.49, que se considera un acuerdo o concordancia moderada (tabla 36). Se seleccionaron todos los casos con las dos técnicas realizadas que fueran valorables (total: 135 pacientes).

Tabla 36. Concordancia entre técnica dual p16/ki-67 y determinación de VPH-AR

Tinción dual	VPH-AR n(%)		Total
	Negativa	Positiva	
Negativo	30(22,2%)	23(17,1%)	53
Positivo	8(5,9%)	74(54,6%)	82
Total	38	97	135

Kappa: 0,49 (95% CI 0,34-0,64), $p < 0,001$

Kappa=0,49 MODERADA ($p < 0,001$)

EE=0,08

IC_{95,0%}=(0,34-0,64)

Acuerdo observado=0,7704

Tabla 37. Concordancia entre técnica dual p16/ki-67 y determinación de VPH-AR, en los diagnósticos ASC

Tinción dual	VPH-AR n(%)		Total
	Negativa	Positiva	
Negativo	23	12	35
Positivo	2	14	16
Total	25	26	51

Kappa=0,45 MODERADA ($p < 0,001$)

Acuerdo observado=0,72

Tabla 38. Concordancia entre técnica dual p16/ki-67 y determinación de VPH-AR, en los diagnósticos LSIL

Tinción dual	VPH-AR n(%)		Total
	Negativa	Positiva	
Negativo	7	12	19
Positivo	5	60	65
Total	12	72	84

Kappa=0,33 DÉBIL(p<0,001)
 Acuerdo observado=0,79

En la curva ROC para detectar lesión CIN2+, el área bajo la curva (AUC) para la técnica dual p16/ki-67 fue de 0,6907 (95% CI 0,5848-0,7965), algo mayor que la de la determinación viral de 0,6905 (95% CI 0,5519-0,8290), p= 0.9983

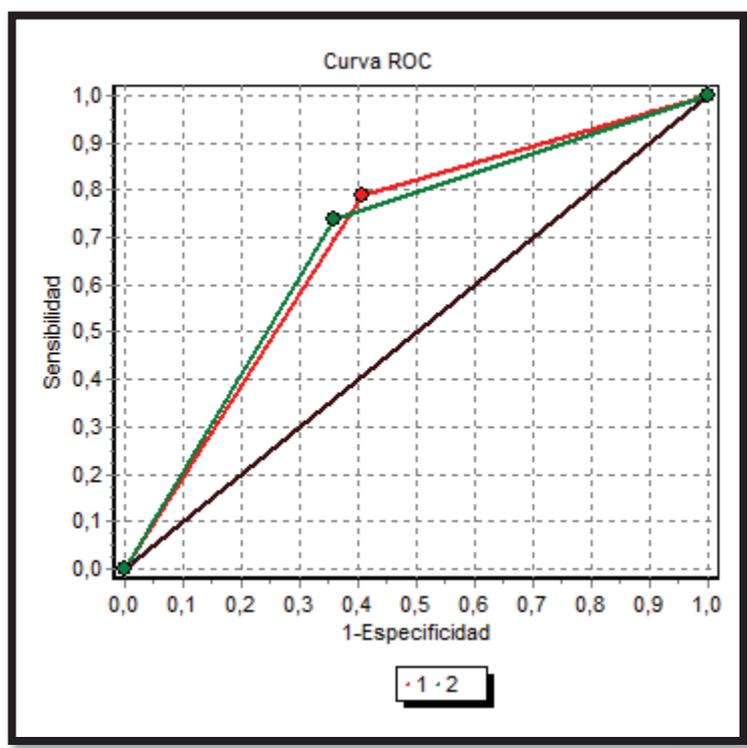


Figura 63. Curva Roc

3° OBJETIVO: Ver si existe relación entre la técnica dual p16/ki67 con los distintos genotipos virales de alto riesgo en los casos confirmados histológicamente como CIN2+

Al final del estudio se confirmaron 57 pacientes con diagnóstico histológico de CIN2+. La edad media de estas mujeres fue de $37,26 \pm 9,5$ años (rango 25,59).

Los 57 diagnósticos constituyen el “gold standard” del seguimiento de los casos citológicos ASC-LSIL a los que previamente se les había realizado la técnica dual p16/ki67 (objetivo principal del estudio).

IV.3.1. Prevalencia de VPH-AR en infección única o múltiple

En las muestras de biopsia de las 57 pacientes, todas diagnosticadas de HSIL histológico (CIN2 ó CIN3), 50 de ellas mostraron positividad para VPH-AR, con 6 casos en los que no se llegó a detectar ADN viral, probablemente por la escasez del material restante, y sólo un caso donde sí se detectó ADN pero ni VPH-BR ni VPH-AR.

Tabla 39. *Tabla de contingencia Biopsia vs VPH-AR*

	Biopsia n(%)		Total
	Positiva	Negativa	
Infección Única	28 (54,9)	23 (45,1)	51 (100)
Múltiple	22 (64,7)	12 (35,3)	34 (100)
Total	50 (58,8)	35 (41,2)	85 (100)

Chi-cuadrado de Pearson: Valor=0,80; gl=1; p=0,368

En la *tabla 39* podemos observar, sobre el total de biopsias (positivas y negativas) que el 54,9% de las pacientes con biopsia positiva CIN2+ presentan infección única mientras que el 64,7% de las mismas pacientes presentan infección múltiple. La prueba Chi-cuadrado evidencia que los resultados no son estadísticamente significativos, por tanto podemos afirmar que el porcentaje de infecciones únicas o múltiples no depende del resultado positivo de la biopsia.

La prevalencia de VPH-AR en las lesiones CIN2+ alcanzó un 87,7%, siendo 56% por un solo genotipo (en 28 pacientes) y en 44% por varios genotipos (en 22 pacientes), lo que no es estadísticamente significativo (*figura 64*):

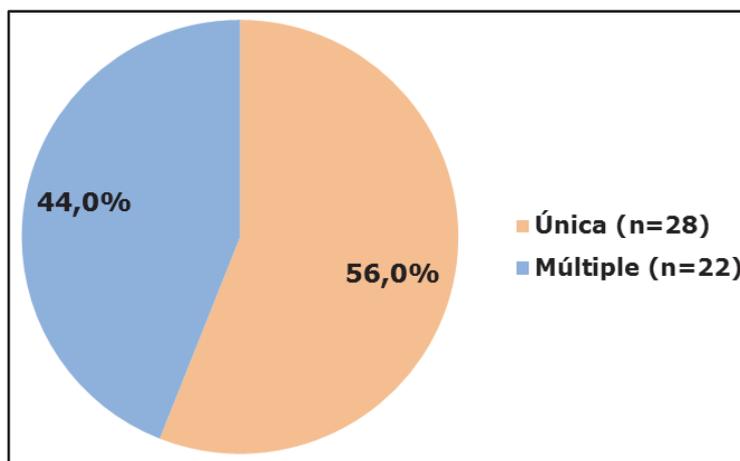


Figura 64. Prevalencia de VPH-AR en infección única o múltiple

IV.3.2.Frecuencia de los distintos genotipos en biopsias CIN2+

En las 50 biopsias positivas para VPH-AR (de las 57 totales positivas para CIN2+) se hallaron 16 genotipos distintos, siendo claramente prevalentes el tipo 16 y el tipo 31 (*figura 65 y tabla 40*). Con el mismo nº de casos les siguen el genotipo 18, 51 y 58 (6 casos cada uno, respectivamente). Con 3 casos cada uno los genotipos 45,52,56 y 66.

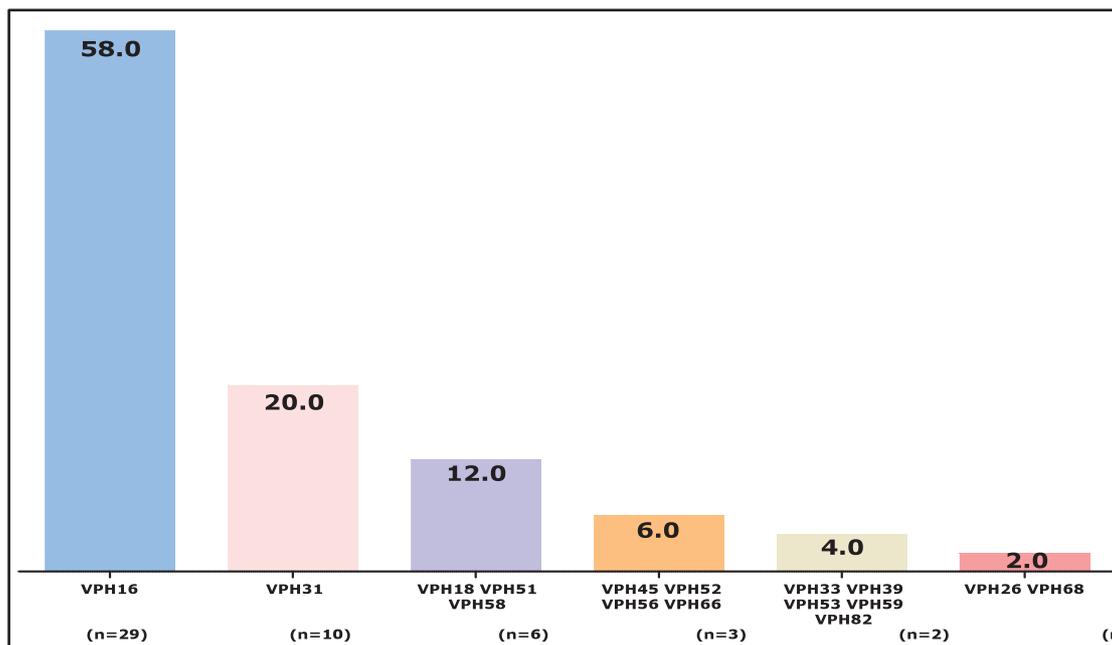


Figura 65. Frecuencia de los distintos genotipos en biopsias CIN2+

Tabla 40. Frecuencia de los distintos genotipos en biopsias CIN2+

Genotipo	N (%)	VPH		Valor	Chi-cuadrado	
		Inf-Única n (%)	Inf. Múltiple n (%)		g.l.	p
16	29 (58)	14 (50,0)	15 (68,2)	1,67	1	0,196
31	10 (20)	3 (10,7)	7 (31,8)	3,43	1	0,064
18	6 (12)	2 (7,1)	4 (18,2)	1,58	1	0,208
51	6 (12)	2 (7,1)	4 (18,2)	1,42	1	0,233
58	6 (12)	2 (7,1)	4 (18,2)	1,42	1	0,233
45	3 (6)	2 (7,1)	1 (4,5)	0,15	1	0,701
52	3 (6)	1 (3,6)	2 (9,1)	0,67	1	0,415
56	3 (6)		3 (13,6)			
66	3 (6)		3 (13,6)			
33	2 (4)	1 (3,6)	1 (4,5)	0,03	1	0,861
39	2 (4)		2 (9,1)			
53	2 (4)	1 (3,6)	1 (4,5)	0,03	1	0,861
59	2 (4)		2 (9,1)			
82	2 (4)		2 (9,1)			
26	1 (2)		1 (4,5)			
68	1 (2)		1 (4,5)			

*Estadísticamente significativo para $p < 0,05$

Los tipos más frecuentes son el HPV16 y 31, tanto en infección por un único genotipo como por múltiples genotipos.

El virus 31 muestra tendencia a las infecciones múltiples, aunque no llega a ser estadísticamente significativo ($p=0,064$).

El 62% de las pacientes con lesiones histológicas fueron infectadas exclusivamente por VPH16 y/o 18.

El 38% de las pacientes con lesiones CIN2+ fueron infectadas por VPH distintos al 16 y/o 18.

IV.3.3.Relación genotipo viral y positividad para la técnica dual

Para estudiar si hay relación o no entre la positividad de la técnica dual p16/ki67 y los distintos genotipos aislados ordenamos los datos en la siguiente tabla.

En la *tabla 41* se puede ver claramente que no hay relación entre el genotipo viral causante de la lesión histológica CIN2+ y la positividad para la técnica dual p16/ki67.

De hecho, no hay diferencias estadísticamente significativas entre positividad o negatividad de la muestra según genotipos, para un nivel de significación $p<0,05$.

Sólo en el VPH 56 se observa tendencia (con un $p=0,095$) a mayor número de resultados negativos con la técnica dual (4,3% de positividad frente a un 25% de negatividad).

Tabla 41. Positividad de la tinción dual (%) según genotipos

Tipos VPH	Tinción dual n (%)		Valor	Chi-cuadrado	
	Positiva	Negativa		g.l.	p
16	28 (60,9)	1 (33,3)	0,88	1	0,347
31	9 (19,6)	1 (33,3)	0,33	1	0,566
18	6 (13,3)				
51	5 (10,9)	1 (33,3)	1,32	1	0,250
58	5 (10,9)				
45	3 (6,5)				
52	3 (6,5)				
56	2 (4,3)	1 (33,3)	4,12	1	0,042
66	3 (6,5)				
33	2 (4,3)				
39	2 (4,3)				
53	2 (4,3)				
59	2 (4,3)				
82	2 (4,3)				
26	1 (2,2)				
68	1 (2,2)				

* Estadísticamente significativo para $p < 0,05$

D I S C U S I Ó N

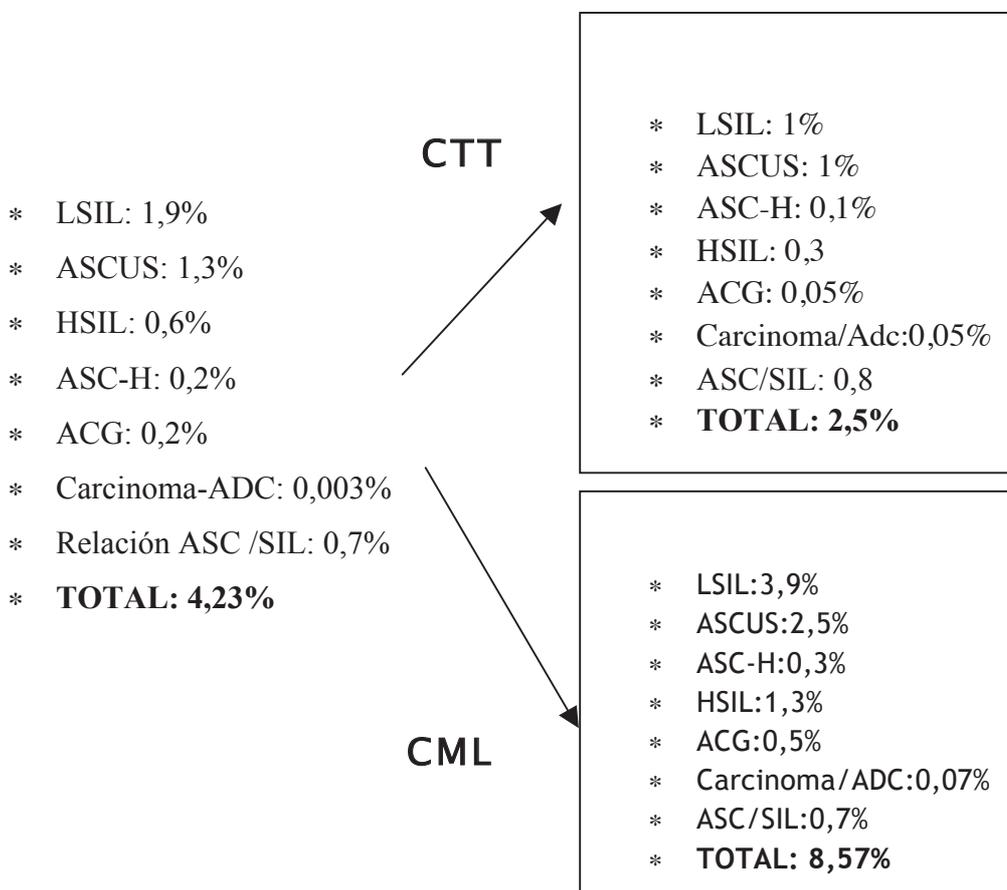
• **Distribución de las muestras totales según resultado citológico:**

A) JUSTIFICACIÓN:

Antes de proceder al análisis del objetivo principal del presente estudio que es comprobar si la tinción dual p16/ki-67 predice lesión CIN2+ subyacente ante un diagnóstico citológico anómalo (ASC/LSIL), hemos analizado la distribución y proporción de los resultados citológicos que se emiten desde nuestra unidad de citopatología ginecológica, que nos justifique que este estudio tiene una base metodológica adecuada.

B) ANALISIS:

La distribución obtenida de los distintos resultados citológicos anómalos, en el periodo de dos años seleccionados (marzo 2012 a marzo 2014) en nuestra unidad de citología fue la siguiente, tanto para CTT (citología triple toma) como CML (citología en medio líquido):



Se observa en nuestro estudio un claro aumento de la detección de lesiones LSIL y de los diagnósticos ASCUS, probablemente por la introducción de la citología en medio líquido, que facilita la interpretación en comparación con la citología en triple toma (92).

Al separar los datos obtenidos en las citologías en triple toma (CTT) de las citologías en medio líquido (CML) observamos:

- Del 2,5% de resultados anómalos con CTT se pasa al 8,57% con CML
- En nuestro estudio total, de los 4,23% de los diagnósticos anómalos emitidos en el periodo de seguimiento de 2 años (marzo 2012 a marzo de 2014), el 3,4% se diagnosticaron de ASC y LSIL, lo que supone el 80% de los mismos
- En citología en medio líquido (CML), que es lo que hemos usado en este estudio, de los 8,57% de diagnósticos anómalos, el 6,7% de los mismos fueron ASCUS+ASC-H+LSIL, lo que representa el 78,2% de los mismos
- Con CTT obtenemos un 1% de lesiones ASCUS, que aumentan al 2,5% con CML.
- Las lesiones ASC-H aumentan también del 0,1% al 0,3%
- Las lesiones LSIL aumentan del 1 al 3,9%
- Las lesiones de HSIL también aumentan de un 0,3% al 1,3%
- Hasta 10 veces aumenta la detección de las ACG con CML con respecto a la CTT (de 0,05 al 0,5%)
- Las lesiones sugestivas de ADC-Carcinoma también aumentan del 0,01 al 0,07

C) COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS (*tabla 42*):

En un análisis de más de 700.000 citologías realizadas en el entorno de Atención Primaria en Cataluña durante 2008-2011 se identifica un 3,7% de citologías con resultados anómalos (13), con un 44,8% de ASCUS y un 42,9% de LSIL. Datos muy afines a los resultados globales encontrados en nuestro estudio.

Pese a que autores apoyan que no hay aumento de sensibilidad en el diagnóstico con CML de HSIL con respecto a la citología de triple toma, en nuestro estudio sí se

observa un incremento significativo, al igual que en menor grado en la serie de Eversole (186), en donde sí se analizan las diferencias entre citología convencional triple toma con la citología líquida.

Aumenta también significativamente la detección de atipia de células escamosas (tanto ASCUS como ASC-H), como ocurre también en la serie de Eversole.

También aumenta la detección de LSIL, como también ocurre en todas las series(52,186).

Un primer análisis del CAP con respecto a criterios de Bethesda (45) arrojó resultados de citologías anómalas en consonancia con nuestro estudio: LSIL 2,1%; HSIL 0,5% ; ASCUS 3,9%; ASC-H 0,2%.

Según el CAP tras analizar los datos de más de 600 laboratorios, el porcentaje medio de los diagnósticos emitidos teniendo en cuenta los diferentes métodos de preparación de las muestras (convencional, CTT y CML) es (186):

- ASC-US: 4,3
- ASC-H: 0,3
- LSIL: 2,5
- HSIL: 0,5
- AGC: 1,5

Verma (187), con unas condiciones sanitarias inferiores, tras aplicar criterios de estandarización de Bethesda 2001 obtiene: 4,8 % ASCUS, 5,6% LSIL, 0,8% HSIL, 0,8% carcinoma

Vilaplana y Puig Tintoré (188) recogen los resultados citológicos anormales de 14 hospitales, obteniendo una tasa de citologías anormales del 3,56% del total, con la siguiente distribución: ASCUS 1,88, ASC-H 0,13, AGUS 0,07, LSIL 1,20 y HSIL 0,28.

Nanda y Mc Crory (189) compararon los resultados tanto de métodos citológicos convencionales como de tres estudios en medio líquido, y encontraron grandes variaciones en sensibilidad y especificidad, al comparar los resultados con sus estudios

histológicos posteriores. Al menos en 12 estudios que consultaron la sensibilidad osciló entre 30-87% y la especificidad entre el 86-100%.

Davey (84), comparando los resultados de la citología convencional con la citología en medio líquido también encuentra mayor tasa de detección de LSIL, HSIL y ASCUS.

Tabla 42. % de categorías anómalas en CML en distintas series.

CATEGORIA CITOLÓGICA	Eversole (CAP)**	Wright	Davey (84)	Vilaplana y Puig-Tintoré	Verna	Estudio actual
ASCUS	1,7-12,8	2,3-6,5	3,8	1,88	4,8	2,5
ASC-H	0-0,8	0,1-0,4	0,2	0,13		0,3
LSIL	1,1-7,7	1,1-3,2	2,1	1,20	5,6	3,9
HSIL	0,1-1,2	0,1-0,6	0,5	0,28	0,8	1,3
ASC/LSIL*	0,7-2,8	1,1-2,3	1,4	1,3	0,7	0,7
ACG	0-0,7	0,0-0,2		0,07		0,5
Carcinoma/ADC		0,0			0,8	0,07
<u>Total anómalos</u>		3,8-9,9	8	3,56	12	8,57

*NOTA: ASC/SIL es igual a la suma de ASCUS+ ASC-H dividido entre la suma de LSIL+HSIL+Carcinomas.

$$\frac{\text{ASCUS+ASC-H}}{\text{LSIL+HSIL+Carcinoma}}$$

**NOTA: Eversole muestra rangos según percentiles(5th, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th y 95th).

1.- OBJETIVO PRINCIPAL: Comprobar si la tinción dual p16/ki67 que se expresa en las células de las citologías ASC-LSIL se asocia con lesión CIN2+ subyacente

Las alteraciones citológicas ASC y LSIL suponen la mayoría de los diagnósticos anómalos en citología. En citología en medio líquido (CML), que es lo que hemos usado en este estudio, de los 8,57% de diagnósticos anómalos, el 6,7% de los mismos fueron ASCUS+ASC-H+LSIL, lo que representa el 78,2% de los mismos.

Para los casos de ASC se utiliza de manera generalizada, como triaje, la determinación de VPH-AR, pero no para las lesiones tipo LSIL.

Conocido que existen biomarcadores como p16 y ki-67 que “señalan” lesiones intraepiteliales de alto grado subyacentes o en desarrollo, en nuestro estudio hemos evaluado el papel de la técnica dual p16/ki67 como marcador de HSIL subyacente o subsecuente, tanto para ASC como para LSIL.

V.1.1. Valoración de la tasa de positividad de las lesiones citológicas anormales para detectar lesión CIN2+ subyacente

En nuestro estudio, de las 306 pacientes iniciales con diagnósticos citológicos de ASC y LSIL, 57 de ellas mostraron lesión histológica confirmada CIN2+, a lo largo del período de seguimiento (30 meses) lo que significa un 18,6% del total de las pacientes.

En la serie de Longhavi (145) con 188 pacientes, un 16% desarrollaron lesión histológica CIN2+. En la de Fujii (155) CIN2+ fue encontrado en el 18,5% de los ASC/LSIL seleccionados.

- En ASC el 11,8% de nuestras pacientes (13 de 111 diagnosticadas de ASC) demostraron lesión CIN2+ subyacente, casi exacto porcentaje obtenido en la

serie de Longhavi (casi el 15%). CIN-2 fue diagnosticada en el 11% de las mujeres con ASC-US, en la serie de Evans (190). En la serie de Fujii hasta en un 17,6%.

Un resultado negativo para VPH-AR en la determinación viral realmente excluye una lesión CIN2+ subyacente, pero un resultado positivo tiene una especificidad de sólo el 14-44%, por lo que una gran proporción de mujeres con determinación viral positiva se verán sometidas a innecesarias colposcopias.

- En LSIL el 22,6% de nuestras pacientes (44 de 196 diagnosticadas de LSIL) demostraron lesión CIN2+ subyacente, casi exacto porcentaje igualmente al de la serie de Longhavi de un 22%. Y en el 13,5% de las mujeres con LSIL, en la serie de Evans (190). 19,2% en Fujii.

La determinación viral no es una herramienta útil en el triaje de estas anomalías citológicas, ya que se sabe que el 80-85% de estos casos son positivos para HPV-AR. Ya que sólo el 12-28% de estas mujeres tendrán un CIN2+ subyacente, parece necesario y obligado el desarrollo de nuevas herramientas para el triaje de estas lesiones citológicas anómalas.

Tabla 43. Tasas de positividades de ASC/LSIL para lesión CIN2+ de las principales series

ESTUDIO	AÑO	Nº PACIENTES	ASC	LSIL	Global
Evans	2006	600	12,5%	15%	--
Wright	2007	---	15%	12-28%	--
Longhavi	2013	206	11%	22%	16%
Fujii	2014	70	17,6%	19,2%	18,5%
Estudio actual	2014	306	11,8%	22,6%	18,6%

La literature recoge que la prevalencia de lesiones histológicas CIN2+ es baja entre mujeres con diagnósticos de ASC (15%) y LSIL(12-28%), (162), por lo que es más que evidente que se necesita alguna técnica o determinación que aumente la tasa de positividad para detectar lesión CIN2+ subyacente.

V.1.2. Valorar la tasa de positividad de la técnica dual p16/ki67 para detectar lesión CIN2+ subyacente

Se observa tanto en ASC como en LSIL un aumento de la tasa de positividad, con respecto a las mismas citologías sin la realización de la técnica dual, para detectar lesión CIN2+ subyacente.

En nuestro estudio ha resultado un 62,1% de positividad para p16/ki-67 en LSIL, y un 21,8% de positividad para ASC.

- Global: en la *tabla 12* de contingencia tinción dual vs citología se observa como la tasa de positividad de las lesiones ASC es de un 21,8% y para LSIL un 62,1%, con una chi-cuadrado de Pearson de 45,36, estadísticamente significativa, por lo que claramente se ve que la positividad de la tinción dual se incrementa significativamente con el incremento de grado de la lesión citológica.
- Por edad: se calcula con tabla de contingencia Tinción dual vs citología por grupos de edad (*tabla 14*), observando que no hay diferencias significativas en cuanto a edad de la paciente. Sí, y en cada grupo de edad, se sigue confirmando que aumenta la tasa de positividad de la tinción dual conforme aumenta el grado de lesión citológica, con una significación estadística $p < 0,05$ (estadísticamente significativa).

<30 años: 67,3% para LSIL

27,3% para ASC

≥30 años: 60,3% LSIL

21,2 ASC

La tinción dual mostró en ambos grupos de edad escasa variación en especificidad y sensibilidad, al igual que en la serie de Ordy (146).

- Para ASC

Al aplicar la tinción dual en las citologías seleccionadas con el diagnóstico de ASC vemos como la tasa de positividad asciende al 21,8%. De esas hasta el 75% tienen lesión CIN2+

La tasa de positividad para ASCUS fue de un 21,8%, por debajo del 34,9% de la serie de Schmidt (148) y del 45% de Longhavi (145). En nuestro estudio se observa, como en todos los demás, que la tasa de positividad de la técnica dual se incrementa con la severidad de la lesión citológica (*tabla 44*). En la serie de Del Toro la tasa para ASCUS es del 25% y para LSIL del 44%.

La tinción dual en citología incrementa la sensibilidad para CIN2+ para ASC de un 11,8% con sólo técnica de Papanicolau hasta un 21,8% aplicando la técnica molecular inmunocitoquímica ($P < 0.001$), en mujeres de todas las edades.

Varios estudios ya han evaluado la utilidad de la detección inmunohistoquímica de p16/ki-67 como marcador potencial de la displasia cervical en extendidos citológicos (192,193). Aquí nosotros también hemos analizado, en el triaje de lesiones citológicas ASC/LSIL, la simultánea detección de p16 y ki-67 dentro de las mismas células epiteliales, lo que constituye un marcador, independiente de la morfología celular, de desregulación del ciclo celular (148). El resultado final de nuestra experiencia (desde Marzo 2012 a Octubre 2014), con estudio simultáneo de las biopsias que se derivan, apoya a la técnica dual como indicador de lesiones cervicales preneoplásicas (CIN2+), con alta sensibilidad y aceptable-buena especificidad.

Tabla 44. Tasas de positividad de la tinción dual en ASC/LSIL de las series más importantes

ESTUDIO	AÑO	TASA DE POSITIVIDAD LSIL	TASA DE POSITIVIDAD ASC
Yoshida(197)	2011	70%	33%
Schmidt	2011	52,5%	34,9%
Longhavi	2013	66%	45%
Vrdoljak (194)	2013	36,1%	
Wentzensen(195)	2014	68,8%	40,2%
Fujii	2014	36,8%	
Singh (196)	2014	36,4%	
Estudio actual	2014	62,1%	21,8%

- Para LSIL:

Al aplicar la tinción dual en las citologías seleccionadas con el diagnóstico de LSIL vemos como la tasa de positividad asciende al 62,1%. De esas el 97,7% de los LSIL con técnica dual positiva tuvieron lesión CIN2+ subyacente. La tinción dual en citología incrementa la sensibilidad para CIN2+ para LSIL de un 22,6% con sólo técnica de Papanicolau hasta un 62,1% aplicando la técnica molecular inmunocitoquímica ($P < 0.001$), en mujeres de todas las edades.

En los casos de LSIL, las tasas de positividad para la tinción dual fue del 62,1% (tasas similares al estudio de Schmidt et al (148) de un 52,5% y a la de Longhavi (145) de hasta un 66%); En nuestro estudio (*tabla 44*), la tinción dual fue positiva en el 62,1% de LSIL, muy por encima del 36,1% de la serie de Vrdoljak-Mozetic (194), y del 36,1% de la serie de Singh (196). Sí son tasas de positividad más acordes con las series de Schmidt, Yoshida (197), Longhavi y Wentzensen (195), de 52,5%, 66,5% y casi el 70%. En estas últimas series al igual que en nuestro estudio, la confirmación histológica CIN2+ era casi inmediata (194).

Al menos en la serie de Fujii atribuyen su baja tasa de positividad para la técnica dual (36,8%) a la inclusión en la categoría LSIL de un alto porcentaje de cambios reactivos celulares.

Se observa un incremento de sensibilidad muy significativo de la tinción dual p16/ki-67 tanto de ASC como de LSIL, en comparación con sólo citología de papanicolau. Así en ASC pasa de un 31,7% hasta un 75% y en LSIL se pasa de un 39,3% a un 97,7%, lo que supone un incremento de más de un 30%, con $p < 0,001$

V.1.3. Valorar la sensibilidad, especificidad de la técnica dual p16/ki67 para detectar lesión CIN2+ subyacente

Con una tasa de positividad del 62,1% en LSIL y una alta sensibilidad para CIN2+, la tinción dual puede permitir un manejo eficiente de las mujeres hacia colposcopia, puesto que está admitido el escaso valor de la determinación VPH en los LSIL, dado que la gran mayoría son positivos para VPH-AR (198). Varios estudios han evaluado la utilidad de la tinción inmunocitoquímica dual p16/ki67 para detectar lesión CIN2+ subyacente.

De manera global (ASC*LSIL) se obtuvo una sensibilidad para CIN2+ de un 91,2% y una especificidad de 55,2%, datos muy similares a los obtenidos en las series más importantes (*tabla 45*).

Tabla 45. Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN de la tinción dual p16/ki-67 para la detección de neoplasia cervical intraepitelial de grado 2 o más en las series publicadas

ESTUDIO	AÑO	Nº PACIENTES	S	E	VPP	VPN
Denton et al	2010	810	92%	62-72%		
Schmidt et al	2011	776	92,2%	80,6		
Petry et al	2011	132	91,9%	82,1%		
Yoshida	2011	69	89,7%	73,1%	---	95,1%
Loghavi et al	2012	188	97,0%	53,0%		
Donà et al	2012	140				
Wentzensen et al	2012	625	85,5%	59,4%		
Singh	2012	122	82%	82%		
Zappacosta et al	2013	405	62,3%	76,8%		
Ikenberg et al (PALMS)	2013	27349	83,9%	94,9%		
Ordi et al	2013	1123	90,9%	72,1%	63,9%	93,6%
koo	2013	73	94,6%	75,8%		
Edgerton et al	2013	63	64%	53%	28%	84%
Waldstrom et al	2013	469	88,5%	51,3%		
Fujii et al	2014	427	87,3%	76,4%	45,7%	96,4%
Uijterwaal (199)	2014	256	89,7%	73,1%	---	95,1%
Estudio actual	2014	306	91,2%	55,2%		

Se necesitarán más estudios longitudinales para asegurar el valor pronóstico de los resultados positivos y negativos de la técnica dual.

- **Lesiones citológicas ASC:**

Se obtuvo una sensibilidad y una especificidad para lesión subyacente CIN2+ de un 75% y 71,4% respectivamente.

Hemos obtenido en nuestro estudio con la técnica dual una especificidad en general más alta para las lesiones ASC con respecto a las obtenidas en lesiones LSIL (71,4% para ASC frente al 47,7% para LSIL), al igual que ocurre en otras series (*tabla 46*):

- en general la sensibilidad para ASC oscila entre el 64% de Edgerton (143) y el 92,2% de Schmidt (148).

- la especificidad para ASC oscila entre el 53% de Edgerton y el 80,6% de Schmidt.

✓ **Lesiones citológicas LSIL:**

Se obtuvo una sensibilidad y una especificidad para lesión subyacente CIN2+ de un 97,7% y 47,7%, respectivamente.

Hemos obtenido en nuestro estudio con la técnica dual una sensibilidad levemente superior para las lesiones LSIL con respecto a la obtenida en lesiones ASC (97,7% para LSIL frente al 75% para ASC), al igual que en mayor o menor medida se obtiene en otras series (*tabla 46*):

- en general la sensibilidad para LSIL oscila entre 86% (de la serie de Wentzensen) al 98% de la serie de Longhavi.

- la especificidad para LSIL oscila entre un 43% (en la serie de Longhavi) y un 68% de la serie de Schmidt.

Tabla 46. Sensibilidad y Especificidad según ASC/LSIL en las series principales

ESTUDIOS	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
	ASC	LSIL	ASC	LSIL
Schmidt	92,2%	94,2%	80,6%	68,0%
Longhavi	91%	98%	61%	43%
Wentzensen	82%	86%	63%	58%
Waldstrom	- --	88%	----	51%
Edgerton	64%	---	53%	---
Estudio actual	75%	97,7%	71,4%	47,7%

V.1.4. Discusión sobre los falsos negativos obtenidos con la tinción dual p16/ki-67

- Definición:
Lesiones citológicas de ASC/LSIL con resultado negativo en la técnica dual p16/ki-67 que sí desarrolla o se asocia a lesión histológica de alto grado CIN2+.
- Análisis:
En nuestro estudio se observa como la mayoría de casos CIN2+ fueron positivos para técnica dual p16/ki-67 (91,2%), mostrando una fuerte asociación entre este biomarcador y la presencia de una lesión CIN2+.
+ 4 casos para citologías ASC (1 de ellos realmente no valorable por mala realización de la técnica)
+ 1 caso para citologías LSIL
+ TOTAL: 5 DE 306= 1,6%

- Posibles interpretaciones:
 - + 1ª Más probable: FALLO EN LA INTERPRETACIÓN de la técnica dual, probablemente inherente al método realizado (falso negativo diagnóstico), aunque estas 5 citologías se diagnosticaron de ASCUS y ninguna de ASC-H. En ninguno de los casos se repitió toma citológica, y tras biopsia de CIN2+ se realizó asa de diatermia, confirmándose la lesión. En un caso fue dudoso el CIN 2, y en el asa de diatermia tampoco se confirmó, no habiéndose detectado ADN viral en el material recogido para genotipado.
 - + 2ª menos probable: lesiones CIN2+ que están sufriendo regresión espontánea, punto este más raro, ya que en los 5 casos las mujeres sobrepasan los 40 años, edad en la cual ya la persistencia viral y la progresión viral es mayor que la prevalencia y el aclaramiento viral.
- Otros estudios:

McCredie (71) y Donà y col. (111) opinan que la mayoría son lesiones CIN2+ que están sufriendo regresión espontánea, puesto que incluso algunas lesiones CIN3 pueden regresar espontáneamente.

Longhavi atribuye los falsos negativos a una mala realización de la técnica al realizarse sobre cristales desteñidos de forma retrospectiva, por lo que el material no es del todo idóneo.

Para Koo (162) los falsos negativos pueden ocurrir en células con escaso citoplasma que no se tiñe, o sólo 1-2 células se tiñen con la doble tinción. O que la p16 que también se exprese en el núcleo “tape” la tinción roja nuclear del ki-67.

V.1.5. Discusión sobre los falsos positivos obtenidos con la tinción dual p16/ki-67

- Definición:

Lesiones citológicas de ASC/LSIL con resultado positivo de la técnica dual p16/ki-67 que no desarrolla o se asocia a lesión histológica de alto grado CIN2+.

- Análisis:

+ casos de ASC: 8; en 4 había VPH-AR, 2 eran negativos para VPH-AR, y en 2 casos no se hizo determinación viral.

+ casos de LSIL: 35; en 16 había VPH-AR, 2 eran negativos para VPH-AR, y en 17 casos no se hizo determinación viral.

+ ACTITUD CLÍNICA QUE SE TOMA:

- se realizan 11 asas de diatermia (1 en ASCUS y 10 en LSIL)

- sólo en 2 asas hay VPH-AR 16, lo que indica que no influye el genotipado de la lesión para la decisión quirúrgica.

- en otros tres casos de LSIL sí hay VPH-AR diferentes al 16

+ CONFIRMACIÓN HISTOLÓGICA: en los 43 casos de FP,

- en 37 se confirmó CIN 1: 30 LSIL y 7 ASCUS.

- en 6 no se objetivó displasia: 5 LSIL y 1 ASCUS.

Tabla 47. N^a de ASC/LSIL de Falsos positivos (FP) según resultado de biopsia

<u>CITOLOGÍAS</u>	NEGATIVA	<u>BIOPSIAS</u>	
		CIN 1	TOTAL
ASC	1	7	8
LSIL	5	30	35
	6	37	43

- Posible interpretación:

1ª más probable: no hay tiempo de seguimiento de la evolución de la lesión, la actuación clínica es más rápida.

La conducta clínica que marcan las guías de actuación ante citología anómala LSIL es colposcopia+biopsia.

La corrección en este factor (conducta clínica más o menos precoz en el tiempo) aumentaría más la sensibilidad de la técnica en casos de LSIL.

2ª menos probable: fallo diagnóstico en la interpretación de la técnica dual (falso positivo diagnóstico), ya que si aparece positividad no se puede atribuir a un defecto de realización de la técnica (valoramos una técnica como apta para diagnóstico si vemos células positivas). Koo (162) atribuye falsos positivos a la interpretación de células de metaplasia escamosa, metaplasia tubárica, células endocervicales,.. con tinción para p16 o ki-67 como células positivas.

- Otros estudios:

Donà (111): Se observó tinción dual en 13 pacientes con lesiones CIN2- (no displasia o CIN1), todos fueron CIN1. 11 de esos casos fueron VPH-AR positivos. Entre los CIN1-HPV-AR positivos puede ser que la tinción dual haya “pillado” lesiones con un mayor riesgo de progresión, aunque sólo esto podría haberse comprobado tras un periodo de seguimiento largo para confirmar esta hipótesis. Del Pino et al (200) ya mostró algunos estudios con p16 como indicador de riesgo de progresión.

Habrà que determinar también la positividad de la técnica en caso de ASC y LSIL que se han seguido a corto plazo de negativo para displasia o CIN1.... ¿podrían haber desarrollado lesión preneoplásica CIN2+ con el tiempo, o son resultados falsos positivos de la técnica dual?

El mayor nº de falsos positivos se da en casos de LSIL porque la actuación clínica es más rápida, no pudiendo saberse la evolución natural de esos 15 pacientes. La corrección en este factor aumentaría más la sensibilidad de la técnica en casos de LSIL.

Es importante conocer que la presencia de VPH 16 comporta un riesgo del 32,1% para CIN2+ a 2 años (13), por lo que quizás los LSIL con HPV16 sí que serían susceptibles de realizar una colposcopia inmediata y ser seguidos de manera estricta.

En las distintas series se recogen los verdaderos positivos (VP), los falsos positivos (FP), los verdaderos negativos (VN) y los falsos negativos (FN) (201):

Tabla 48. *N^o de casos de VP, FN, FP, VN, sensibilidad y especificidad en las principales series.*

	VP	FN	FP	VN	Sensibilidad	Especificidad
LSIL						
Schmidt	129	8	89	189	94%	68%
Loghavi	20	0	41	31	98%	43%
Wentzensen	79	12	73	100	86%	58%
Waldstrom	77	10	186	196	88%	51%
Estudio actual	83	1	35	71	97%	47%
ASC						
Schmidt	9	5	23	26	92%	81%
Longhavi	71	6	55	229	91%	61%
Wentzensen	10	1	33	52	82%	63%
Edgerton	27	6	40	67	64%	53%
Estudio actual	16	4	8	82	75%	71%

2° OBJETIVO: Comparar tasa de positividad entre técnica dual p16/ki67 y determinación VPH-AR., para detectar lesiones CIN2+.

- **Prevalencia del VPH en nuestro estudio**

- a) Análisis:

En nuestro trabajo destaca la alta prevalencia global de la infección por el VPH-AR de un 71,9% (100 casos); en 39 pacientes fue negativa (28,1%). En 7 pacientes: 1 con ADN viral ni de AR ni de BR y 6 sin detectarse ADN viral.

En nuestro estudio se vio que el porcentaje de positividad para el VPH-AR en las lesiones citológicas ASC fue del 50% y que dicho porcentaje subió al 85,1% para las lesiones citológicas LSIL.

Por tanto, se ve como los porcentajes de positividad de la infección por el VPH-AR aumentaron significativamente a medida que aumentaron los grados de las citologías (χ^2 de Pearson: Valor=19,82; gl=1; $p<0,001$).

En nuestro estudio, 21 de 32 mujeres menores de 30 años tenían VPH-AR, lo que supone el 65% de las pacientes en ese grupo etario a las que se les realizó determinación viral. En mujeres mayores, 79 de 115 fueron positivas para VPH-AR (68,7%), lo que no es estadísticamente significativo.

- b) Comparación con otros estudios:

La prevalencia de VPH-AR fue incluso superior a la serie de Tena (202), en donde fue de un 61,8%, y algo superior a la serie de Donà (111) que fue de un 70,9% (frente a nuestro 71,9%).

No se detectó VPH-AR en el 17,6% de la serie de Donà (111), inferior a nuestro 28,1%.

En la serie de Tena (202) el porcentaje de positividad para ASCUS fue del 31,2% (aquí de un 50%, más afín a la mayor parte de las series) y para LSIL fue de un 63,6% (frente a nuestro 85,1%).

V.2.1. Valorar la tasa de positividad de la determinación viral VPH-AR para detectar lesión CIN2+ subyacente

En nuestro estudio hemos obtenido una sensibilidad del 100% en la determinación viral VPH-AR, tanto para lesiones citológicas ASC como para LSIL. La especificidad ha sido muy baja, globalmente de un 30%, superior en ASC de hasta un 45% que baja hasta el 20% en lesiones LSIL.

Szareewski (203) ha estudiado diversos tests para comparar S, E, VPP y VPN, y no halló diferencias significativas.

Con respecto a la edad (< o ≥ 30 años) no se observan diferencias significativas, variando en el estudio actual entre el 28-30%.

Tabla 49. Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN de la determinación viral VPH-AR para la detección de neoplasia cervical intraepitelial de grado 2 o más en las series publicadas

ESTUDIO	AÑO	Nº PACIENTES	S	E	VPP	VPN
Koo	2013	73	67,6%	66,7%	69,4%	64,7%
Denton et al	2010	810	92%	37.8%		
Edgerton et al	2013	63	100%	21%	50%	100%
Fujii 2014	2014	427	94,9%	33,0%	24,4%	96,6%
PALMS			96,4%	90,2%		
WOLFSBURG			100%	94,1%		
Nuestro estudio	2014		100%	30%	58,8%	100%

V.2.2. Comparación de ambas técnicas: Tinción dual p16/ki-67 versus determinación viral VPH-AR para detectar lesión CIN2+ subyacente

En ambos tipos de lesiones citológicas ASC y LSIL hemos visto ya que la tasa de positividad de la tinción dual p16/ki-67 se asocia significativamente con el grado histológico de las lesiones cervicales intraepiteliales.

Desde hace unos años se ha adoptado como triaje para colposcopia la determinación de VPH-AR, además de como seguimiento en pacientes con resultados citológicos anómalos como ASC y LSIL (162). Sin embargo, la baja especificidad de la determinación VPH-AR acompañada de alta sensibilidad ha creado la necesidad de encontrar marcadores para predecir la lesión cervical de alto grado.

En nuestro estudio se obtiene para VPH-AR una sensibilidad del 100% acompañada, sin embargo, de una especificidad de solo el 30%.

Con la técnica dual en general la sensibilidad baja a un 92,8% pero logra una especificidad del 54,74%.

Separados por diagnósticos vemos que en lesiones citológicas ASC la sensibilidad para VPH-AR sigue siendo del 100%, con una especificidad algo mayor de hasta el 45%; en la técnica dual la sensibilidad baja al 75%, pero con una especificidad mayor estadísticamente significativa de 71,4%, lo que podría disminuir significativamente el número de mujeres que se derivan a colposcopia (148).

En las lesiones citológicas LSIL la sensibilidad para VPH-AR es del 100% pero con una especificidad de sólo el 20%; con la técnica dual la sensibilidad se mantiene en un 97,7% y la especificidad alcanza el 47,8% con diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la especificidad.

La explicación es que, mientras que la determinación viral HPV-AR es positiva en todas las infecciones transitorias (que suponen la gran mayoría de casos), la positividad de la técnica dual p16/ki-67 “señala” sólo las células displásicas que han sufrido transformación por el VPH-AR, lo que le otorga ser una técnica altamente sensible y específica.

En los distintos estudios consultados sobre aplicación de la técnica dual p16/ki-67, las sensibilidades y especificidades han sido del 64-100% y del 43-82% para la técnica dual, y del 76-100% y del 19-56% para la determinación viral HPV-AR. En dichos estudios la técnica dual ha resultado superior a la determinación viral para detectar lesiones de alto grado.

Sin embargo, hay que notar que las especificidades registradas varían enormemente de un 43% hasta un 82% para la técnica dual p16/ki-67, y de un 19% a un 56% para la determinación viral VPH-AR. Waldstrøm (149) opina que en esas diferencias no tiene nada que ver el método de detección viral. En nuestro estudio puede haber influido el método de obtención del ADN a partir del bloque de parafina, como ya apuntaron algunos autores (206,207,208,209), puesto que en 6 casos no se detectó ADN y en 1 caso no se detectó ni BR ni AR.

Tabla 50. Comparación de sensibilidades y especificidades entre la técnica dual y la determinación viral VPH-AR en las distintas series

TECNICA DUAL P16/KI67					DETERMINACIÓN VIRAL VPH-AR			
ESTUDIOS	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD		SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
	ASC	LSIL	ASC	LSIL	ASC	LSIL	ASC	LSIL
Schmidt	92,2%	94,2%	80,6%	68,0%	91%	96%	37%	19%
Longhavi	91%	98%	61%	43%				
Wentzensen	85,5%		59,4%		93,5%		31,9%	
Waldstrom	- -	88%	---	51%				
Edgerton	64%	---	53%	---				
Petry	92%		82%					
Koo								
Uijterwaal	89,7%		73,1%		96,3%		57,6%	
Estudio actual	75%	97,7%	71,4%	47,8%	100%	100%	45%	20%

Aparte de la validación de las pruebas diagnósticas otra ventaja de la técnica dual es que no está bajo la influencia de la citomorfología. En nuestro estudio se consideró la positividad únicamente con la doble tinción, independientemente del aspecto celular. Sólo un autor evaluó el número de células positivas (197), pero lo relacionó con la alteración citológica gradada en más severidad, y no con el “gold standard” de la biopsia.

Killeen (210) encuentra discretos aumentos de sensibilidad, VPP y VPN, siendo la especificidad estadísticamente significativa a favor de la técnica dual.

En screening Ikemberg (144) demostró sensibilidad superior y no inferior especificidad con la técnica dual respecto a la citología con Papanicolau.

Wentzensen mostró que la realización de esta técnica podría disminuir el número de innecesarias colposcopias.

Nuestro estudio recoge una sensibilidad global de 91,2%, similar a la gran serie de Schmidt, con un 92-94% de sensibilidad.

La especificidad global en nuestro estudio es de un 55,2%, bastante inferior al 90% de Schmidt, pero en la serie de Wentzensen baja a 52%; en cualquier estudio, siempre la diferencia estadísticamente es significativa, entre la técnica dual y la determinación de VPH-AR.

El aumento de especificidad que se demuestra con la técnica dual p16/ki-67 sobre la determinación viral podría valorarse desde el punto de vista de coste-efectividad, ya que podrían evitarse colposcopias con el consecuente gasto que conlleva (211).

A priori la determinación viral parece ser superior para estratificar el riesgo de desarrollar una lesión neoplásica a largo plazo, y en cambio la técnica dual puede ser importante para predecir su comportamiento inmediato, a corto plazo (148).

V.2.3. Concordancia entre los dos métodos evaluados

Se ha observado un acuerdo o concordancia entre ambos tests de un 77%, con un valor kappa de 0,49 que indica un acuerdo moderado.

Estos hallazgos están en consonancia con los hallados en la serie de Koo (162), con una tasa de acuerdo o concordancia del 76% y un valor kappa de 0,511.

En la serie de Singh (205) la tasa de acuerdo alcanzó el 80% con un valor kappa de 0,6, ya considerado un acuerdo moderado a bueno.

Nieh S (204) hace un estudio comparativo en citologías anómalas con sus biopsias de seguimiento entre la expresión de p16 y la determinación viral.

Waldstrøm (149) examinó las variaciones inter e intraobservador, y encontró de moderada a buena reproducibilidad para interobservador (0,43-0,49 y 0,50-0,66) e intraobservador (valores kappa de 0,42, 0,46 y 0,78).

3° OBJETIVO: Ver si existe relación entre la técnica dual p16/ki67 con los distintos genotipos virales de alto riesgo en los casos confirmados histológicamente como CIN2+. Frecuencia de genotipos

V.3.1. Prevalencia de genotipos en las biopsias CIN2+

En los 57 casos finalmente seleccionados como CIN2+:

- En 50 se demostró VPH-AR
- En 6 biopsias no se detectó ADN viral tras el protocolo de TEP
- En un paciente no se detectó ni VPH-AR ni VPH-BR
- Por tanto, la muestra que se seleccionó fue la de 50 pacientes

Idoneidad del material genético obtenido

a) por método de extracción del ADN: de las 57 muestras que se manejaron para genotipado tras extracción de ADN, en 6 de ellas no se detectó ADN, ya que la obtención de ADN genómico de alta calidad a partir de TEP (tejido embebido en parafina) es una tarea difícil, como ya apuntaron otros autores (206,207,208,209).

b) por grado de fragmentación del ADN: nuestro método de genotipado usa *primers* (MGMY09/11) que amplifican una región de 450 pares de base, lo que la hace menos sensible que otros cebadores como el SPF10 que amplifican una región muy pequeña de la región L1 (de 65 pares de bases) común a los diferentes VPHs. Esto le confiere una gran sensibilidad especialmente para ADNs archivados en parafina o muy degradados.

Nuestras biopsias demostraron un 87,7% de prevalencia de VPH-AR, similar a la serie de González-Bosquet (212), de un 84%. También en ese estudio se detectó lesiones CIN2+ con negatividad para VPH-AR (19 casos) y 14 casos positivos para VPH-BR. En nuestro estudio, en las biopsias CIN2+ donde sí se halló ADN viral, todas tenían VPH-AR, algunas con algún VPH-BR adicional, pero nunca este último sólo. En un único caso se detectó ADN ni de AR ni de BR y en otros 6 no se detectó ADN viral.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

- La presencia de HPV-AR se encontró en 50/57 casos diagnosticados histológicamente como CIN2+ (87,7%)
- El 56% de los casos fue infección por un único genotipo, frente al 44% en que fueron infecciones múltiples
- Se hallaron 16 genotipos distintos
- El más frecuente fue el genotipo 16 (en el 58% de los casos)
- VPH 16 y 31 fueron los genotipos más frecuentes en infecciones únicas y/o múltiples
- Los 6 genotipos más frecuentes en nuestra serie (16,31,18,51,45,58) detectados en lesiones histológicas CIN2+ suponen una prevalencia del 92%
- Les siguen VPH 18, VPH 51 y VPH 58, los tres con 12% de frecuencia, respectivamente
- En el 62% de nuestras pacientes con biopsia de CIN2+ se detectó VPH 16 ó 18
- En el 38% de las pacientes con biopsia de CIN2+ se detectaron otros genotipos diferentes al 16 y 18
- El VPH 45 aparece en un 6% de los casos, y
- VPH 53 sólo un 4% de los casos

JUSTIFICACIÓN DE LOS DATOS:

- En biopsias CIN2+ se observa un predominio de las infecciones únicas en el material histológico, aunque no es significativamente distinto a las infecciones múltiples en el mismo material
- Los genotipos más frecuentes han sido el VPH 16, 31, 18, 51, 45, 58

COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS O SERIES:

1. Infección única / infecciones múltiples:

- En la serie de Pérez Castro (213) en Galicia, sobre un total de 94 pacientes con lesión CIN2+ se obtuvo un 47% de infecciones únicas y 53% de infecciones múltiples.
- Van der Marel (214) demuestra en un estudio ambicioso con microdissección con láser en el material biopsico que sólo el 9% de las lesiones histológicas CIN2/CIN3 se asocia a múltiples genotipos VPH-AR. Aunque el 28% de mujeres con CIN2/CIN3 mostró múltiples virus citológicos, la mayoría de lesiones CIN2/3 contenían un único VPH-AR. Encuentra también que el genotipo 16 es el más frecuente en CIN2/3, aunque resulte de una o múltiples infecciones.
- Quint (215) encuentra que en aproximadamente el 95% de los cánceres cervicales sólo se encuentra un tipo de VPH-AR. Esto apoya el concepto de un desarrollo clonal resultado de una infección persistente con un único VPH-AR. En 60% de los casos de CIN2/3 se encuentran infecciones múltiples.
- Las infecciones múltiples ocurrieron en un 17,2% de las pacientes con CIN2+ del estudio de Tjalma (216)
- Las infecciones múltiples eran más frecuentes en mujeres más jóvenes, y con la edad disminuían a únicas

2. Genotipos más frecuentes:

- El virus de alto riesgo que aparece más frecuentemente es el VPH 16; se demuestra en un 58% de los casos, proporción similar a la serie de Pérez-Castro (213)
- HPV 31 es el 2º más frecuente (20% de los casos), tanto en infecciones simples como en múltiples, al igual que el estudio de Tjalma (216), pero más alta que la de Mazarico (217)
- En la serie de Pérez Castro también es el genotipo 31 el 2º en frecuencia
- Un estudio referido también a la región de Murcia (218), aunque no en material biopsico sino en anomalías citológicas y en el grupo de los HSIL se encuentran

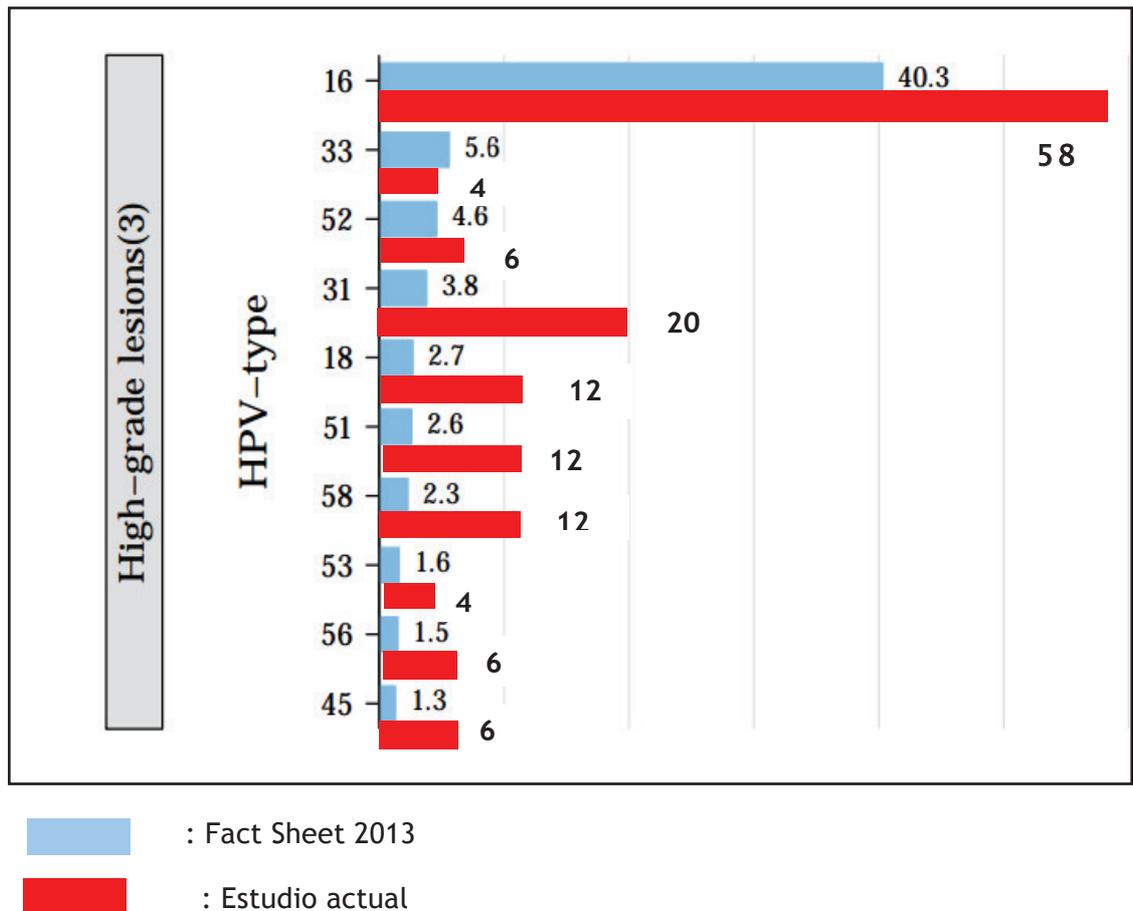
que los genotipos más comunes eran el 16, 45, 51, 33 y 31. Sorprendentemente VPH 45 en otros estudios, al igual que en el nuestro, no ha tenido gran prevalencia, por lo que concluyen que tal vez se haya sobreestimado su presencia por el bajo tamaño de la muestra (39 citologías HSIL)

- Castle (224) en lesiones CIN3 encuentra, en orden de frecuencia: VPH 16, 31, 52, 51 y 18, con una presencia de infecciones múltiples de hasta 51,3%
- Sandri (225) encuentra los más prevalentes en lesiones preneoplásicas de alto grado al VPH 16, 51 y 31, con un 7,3% para el VPH 18, con más del 70% de CIN3 producidos por el VPH 16
- En mujeres infectadas por un único genotipo los más frecuentes fueron 16 (59,9%), 33 (10,5%), 31 (9%), 52 (3,9%) y HPV18 (3,6%) , según Tjalma (216)
- En mujeres infectadas con múltiples gnotipos los más frecuentes fueron 16 (59,9%; 55.6-64.1), HPV 31 (26,0%; 22,4-30.0), HPV 52 (23,4%; 19,9-27,2), HPV 33 (18,0%; 14.8-21.5), HPV 51(15,0%; 12,1-18,3) y HPV 18 (14,2%; 11,4-17,5)
- Una posible explicación a la variabilidad de genotipos encontrados en los diferentes estudios es que la prevalencia de los diferentes tipos virales de VPH varía según la región estudiada (219), y que además se ha producido un incremento de la inmigración en los últimos años.
- Nuestros resultados son equivalentes a los obtenidos por Moreno Docón (220). Dicho estudio está referido a la totalidad de áreas de salud de Murcia y el estudio actual a sólo un área, la I de Murcia. Además, el estudio de Moreno Docón (220) se aplica a resultados citológicos y en mi estudio es ya sobre resultados comprobados histológicamente como CIN2+. El citado estudio obtiene un orden de prevalencia de: 16 (45,5%), 31(13,4%), 51 (11,4%),58 (11,1%),52 (8,5%) y 33 (7,3%),... con 18 (4,9%)
- Los 8 tipos más frecuentes de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) detectados son similares a los encontrados por Pérez-Castro (213). Notar que en nuestra serie ha faltado un genotipo, VPH 35, que no se ha detectado ni como infección múltiple.
- En la información recogida en el fact Sheet 2013 de la OMS/ICO con referencia a los tipos más frecuentes de VPH en España, en relación con lesión

intraepitelial escamosa de alto grado, se obtiene la siguiente información de frecuencia de tipos virales:

- * El más frecuente es el genotipo 16, con un 40%
- * A distancia (5,6%) le sigue el genotipo 33
- * El 31 ocupa el 4º puesto, con un 3,8% de frecuencia
- * El tipo 18 el 5º puesto, con un 2,7% de frecuencia
- * El tipo 45 el 10º puesto, con un 1,3% de frecuencia

Figura 66. Frecuencia de tipos de VPH en lesión intraepitelial de alto grado (HSIL) (modificada de ICO Information centre on HPV and Cancer, fact sheet 2013)



3. Genotipos 16 y/o 18:

- Hasta un 55,4% de las mujeres estudiadas con lesiones histológicas de CIN2+ fueron infectadas exclusivamente por VPH 16 ó 18 (212), y hasta un 69,9% si se trata de infecciones múltiples, lo que indicaría una protección con la vacuna de casi un 70%
- La detección de los genotipos de VPH-AR en lesiones CIN2+ es de 55-63% para VPH 16 y 18, 3-7% para HPV 45, 23% para 31-33-35-52-58, y alrededor del 10% para otros tipos (213)
- Apuntar que también en el 62% de nuestras pacientes con biopsia de CIN2+, se detectó VPH 16 ó 18, superior al estudio de González-Bosquet, de un 42,7% y al de Pérez Castro de un 58%. En el fact sheet de la oms/ico se recoge una frecuencia de 57,4% para VPH 16 y/o 18.
- Los casos en que no existía ni VPH 16 ni VPH 18 en nuestro estudio fue de un 38%, frente al 42,8% de los casos en la serie de Pérez Castro, o al 55,8% de los casos de la serie de González-Bosquet.

4. Genotipo 18:

- Van der Marel (176) apoya que la relativa infrecuencia de la detección del VPH 18 en los casos con CIN2/3, pese a que es el 2º más frecuente ya en CCU, podría ser explicado por la infección de las células glandulares en el canal endocervical o en las células metaplásicas inmaduras que son menos accesibles a la toma de muestra y a que también las anomalías citológicas que causa están más pobremente definidas que infradiagnostican la severidad de la lesión subyacente. Las lesiones ck7+/p16+ se deberían de manejar como borderline lesiones de alto grado, aunque morfológicamente sean CIN1. AIM (metaplasia escamosa inmadura atípica) se distingue de la metaplasia inmadura por agrandamiento nuclear y atipia en un epitelio multicapa indiferenciado en la parte más interna de la unión escamocolumnar (35), positivo para p16, ck17 y algunas veces para ck7.

AIM es una forma particular de infección por el VPH 18 en mujeres con CIN2/3. Usando sólo como gold standard del screening la lesión CIN2+, se infradiagnostica la presencia de VPH 18 (221)

- Safaeian (222) encuentra una baja prevalencia del VPH 18 y 45 en las lesiones preneoplásicas, a diferencia de los cánceres invasivos, probablemente por hallarse en una patología oculta (222)
- El VPH 18 es relativamente infrecuente en CIN2/3, a diferencia del carcinoma cervical y, sobre todo, del adenocarcinoma (221).

5. Genotipos menos frecuentes:

- Es de notar que en nuestro estudio la prevalencia relativa del genotipo 45 es significativa. Comparado con estudios de prevalencia a nivel Europeo vemos que el 45 no es de los más prevalentes (219); hay que ir a buscar en las series de Africa fundamentalmente y en menor medida también América del sur y Centroamérica para ver que allí el genotipo 45 es relativamente prevalente. Eso hace suponer que, probablemente, el aumento del genotipo 45 que vemos también sea debido a la inmigración, como ya apuntó en su tesis doctoral Moreno (220).
- EL VPH 53 presenta en nuestro estudio una prevalencia muy baja, del 4%, sensiblemente inferior a las series publicadas , pero similar a la serie del estudio de Conesa-Zamora (218), en nuestra región de Murcia.
- La persistencia de los VPH 31 y 45 predice progresión a lesión intraepitelial escamosa (223).
- La prevalencia de los distintos genotipos en carcinoma escamoso invasor difiere sensiblemente de los prevalentes en lesiones CIN2+ (226,227), siendo los más frecuentes: VPH 16, 18, 33, 31, 45, 35, 52 y 56. Llama la atención cómo la prevalencia del 18 no es tan significativa en las lesiones CIN2+ como sí lo es en las lesiones infiltrantes (228) (carcinoma escamoso y fundamentalmente adenocarcinoma)
- Es de destacar la alta prevalencia que obtenemos con el VPH 31 y en menor medida también con VPH 45, ambos ya en lesiones CIN2+. Otros autores (223)

han comprobado una mayor progresión, estadísticamente significativa, de los genotipos 31 y 45 a lesiones neoplásicas, con respecto a los otros genotipos no- VPH 16 ni VPH 18.

- Se comprueba también la bajo prevalencia de HPV 18 y HPV 45, 39, 59 y 68 en lesiones intraepiteliales escamosas de algo grado (224) , siendo más frecuentes 16, 31, 33, 35, 51, 52, 58 y 66 (216).

V.3.2. Relación entre técnica dual y los diferentes genotipos

No hay diferencias estadísticamente significativas. No se ha confirmado relación entre la positividad de la técnica dual con ningún genotipo concreto.

Sí parece observarse cierta tendencia del genotipo 56 a dar resultados positivos en la técnica dual, pero los casos son mínimos (n=3), y no ha sido estadísticamente significativo.

Tal vez el tamaño muestral, dados los 16 genotipos implicados en nuestros 57 casos de CIN2+, sea pequeño y no se pueda sacar conclusiones.

C O N C L U S I O N E S

1. Con la introducción de la tinción dual p16/ki-67 en el triaje de ASC/LSIL la sensibilidad global es del 91,2%, para detectar lesiones CIN2+. Por tanto, aumenta la precisión para detectar lesiones de alto grado, en comparación con sólo la citología.
2. La sensibilidad de la técnica dual para detectar lesiones CIN2+ es muy alta en LSIL (97,8%), por lo que podemos afirmar que casi el 100% de mujeres diagnosticadas con LSIL y con lesión CIN2+ van a ser correctamente identificadas con esta prueba.
3. La especificidad para ASC es bastante más alta que para LSIL, y muy superior a la determinación viral VPH-AR, de un 75%, por lo que casi las tres cuartas partes de las mujeres sanas diagnosticadas con ASC van a ser correctamente identificadas con la negatividad de esta prueba. Se reducen así los falsos positivos, y se ofrece un manejo más eficaz en las mujeres con este diagnóstico.
4. En ambos casos, tanto para LSIL como para ASC, la técnica dual tiene un alto VPN, por lo que ante un resultado negativo podremos descartar con alta probabilidad la presencia de lesión cervical precursora CIN2+.
5. Existen diferencias estadísticamente significativas en la especificidad entre la técnica dual y la determinación de VPH, tanto para ASC como para LSIL, ya que la ausencia de lesión precursora se sigue de un bajo nº de negativos en la determinación viral (muy baja especificidad), que no ocurre con la técnica dual.
6. La concordancia entre ambos tests (dual y determinación viral VPH-AR por HC2) ha resultado moderada.

R
E
F
E
R
E
N
C
I
A
S

B
I
B
L
I
O
G
R
Á
F
I
C
A
S

1. **WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer.** Human papillomavirus and related cancers in Spain. Fact Sheet 2013. Disponible en: <http://www.hpvcentre.net>
2. **Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S et al.** ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Spain. Summary Report 2014-03-03. [acceso 15 diciembre 2014)]Disponible en <http://www.hpvcentre.net>
3. **Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010; 127(12): 2893-917.
4. **Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX et al. CLEOPATRE Spain Study Group.** Prevalence and Genotype Distribution of Human Papillomavirus Infection of the Cervix in Spain: The CLEOPATRE Study. *J. Med. Virol.* 2012; 84: 947-556.
5. **Castellsagué Piqué X, de San José Llongueras S, Bosch José FX.** Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas. En: Carreras Collado R, Xercavins Montosa J, Checa Vizcaíno MA, editores. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de cuello de útero.* Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana 2007. p. 1-25.
6. **Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, ShaH KV.** The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55(4): 244-65.
7. **Zappacosta R, Caraceni D, Ciccocioppo L, Rotondo T, Capanna S, Gatta DM et al.** Implementing specificity of HPV-DNA primary screening in a successful organised cervical cancer prevention programme. *Gynecol Oncol.* 2013; 128: 427-32.
8. **Zur Hausen H.** Human papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1288: F55-78.

9. **Nucci MR, Crum CP.** Redefining Early Cervical Neoplasia: Recent Progress. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14:1-10.
10. **Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR et al.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5: F55-70.
11. **Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, Gissmann L.** Human Papillomavirus in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006; 24(S3):1-10.
12. **Mancebo Moreno G, Fusté Brull P, Checa Vizcaíno MA, Carreras Collado R.** Papel del virus del papiloma humano en la carcinogénesis cervical. En: Carreras Collado R, Xercavins Montosa J, Checa Vizcaíno MA, editores. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de cuello de útero.* Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana 2007. p. 27-41.
13. **Alameda Quitllet.** Simposio Sociedad Española de Anatomía Patológica-Sociedad Española de Citología: detección de virus del papiloma humano en programas de cribado de cáncer cervical. *Rev Esp Patol.* 2014 ; 47(4) : 245-54.
14. **Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(5):525-41.
15. **zur Hausen H.** Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260-5.
16. **Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-27.
17. **Guimerà N, Lloveras B, Lindeman J, L Alemany, van de Sandt M, Alejo M et al;** RIS VPH grupos de estudio TTHPV VVAPO. The occasional role of low-risk human papillomaviruses 6, 11, 42, 44, and 70 in anogenital carcinoma defined by laser capture microdissection/PCR methodology: results from a global study. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37(9):1299-310.
18. **Torné Blade A, del Pino Saladrigues M, Cusido Gimferrer M, Alameda Quitllet F, Andia Ortiz D, Castellsagué Piqué X et al.** Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Rev Esp Patol.* 2014; 47(1):1-43.

19. **Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Marrón D, Cuzick J, Ferris D et al.** Attribution of 12 High-Risk Human Papillomavirus Genotypes to Infection and Cervical Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(10):1997-2008.
20. **Stanley MA.** Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:215-22.
21. **Wang JW, Roden RBS.** L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology.* 2013; 445:175-86.
22. **Campo MS.** The essential transforming proteins of HPV: E5,E6 and E7. *HPV Today.* N° 07. October 2005.pp:8-10.
23. **Alba A, Bosch FX, Castellsagué X, Junquera M, Muñoz N, Pérez C et al.** La infección por VPH. 2º ed: Oviedo; Bypass 2008
24. **Schiffman M, Castle PE.** Human Papillomavirus. *Epidemiology and public health. Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127(8):930-4.
25. **Roche diagnostic.** CINtec PLUS. Clarity and confidence. Innovadora combinación de dos biomarcadores para la detección precoz de lesiones de alto grado. Disponible en: <http://roche-diagnostics.com>
26. **Bosch FX, Díaz M, de San José S, Font R, Castellsagué X, Abril G et al.** Epidemiología de las infecciones por virus del papiloma humano (VPH): riesgo de carcinoma cérvicouterino y de otros tumores ano-genitales. Nuevas opciones preventivas. En: de San José S y García AM, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención.* 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006. P.31-50.
27. **Puig-Tintoré, LM, Alba Menéndez A, Bosch X, Castellsagué X, Coll C, Cortes X et al.** La infección por papilomavirus. Documentos de Consenso de la SEGO, SEC y AEPCC. Documentos de Consenso SEGO 2002. Madrid: Meditex-Sanex. 2003,p.41-104 (consultado el 20 diciembre 2014). Disponible en: <URL:www.aepcc.org>
28. **Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S et al.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005; 366:991-8.

29. **Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM.** Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011;128:927–35.
30. **De Sanjose, S, Cortés X, Méndez C, Puig-Tintoré L, Torné A, Roura E et al.** Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population Results from the AFRODITA survey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008 Oct;140(2):234-40.
31. **Plummer M, Vaccarella S, Franceschi S.** Multiple human papillomavirus infections: the exception or the rule? *J Infect Dis*. 2011;203(7):891–3.
32. **Schiffman M, Wentzensen N.** From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2010; 116:177-85.
33. **Del Amo J, González C, Losana J.** La infección por virus del papiloma humano (VPH) en poblaciones de alto riesgo de cáncer de cuello uterino en España. En: de San José S y García AM, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención*. 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006. P.71-87.
34. **Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH.** WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2014
35. **Baak JPA, Stoler MH, Bean SM, Anderson MC, Robboy SJ.** Cervical Precancer (intraepithelial neoplasia), including functional biomarkers and colposcopy. En: Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, et al. *Pathology of the Female Reproductive Tract*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
36. **Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, de Boer BA, Helmerhorst TJ.** Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res*. 2004; 24: 771–775.
37. **Ortiz M, Torres M, García A.** Determinación del virus del papiloma humano (VPH): aspectos técnicos. En: de San José S y García AM, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención*. 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006. P.89-105.
38. **Kurman RJ, Ronnett B, Ellenson R.** Blaustein’s Pathology of the Female Genital Tract, 6th edn. New York: Springer, 2011

39. **Alameda Quítle F, Carreras Collado R.** Histopatología, citopatología, inmunohistoquímica y determinación de virus del papiloma humano. En: Carreras Collado R, Xercavins Montosa J, Checa Vizcaíno MA, editores. Virus del Papiloma Humano y Cáncer de cuello de útero. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana 2007. p. 43-53.
40. **Lacruz Pelea C, Fariña González J. Eds.** Citología Ginecología. De Papanicolau a Bethesda. Madrid: Editorial Complutense; 2003.
41. **Lacruz Pelea C.** Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). Rev Esp Patol. 2003; 36: 5-10.
42. **Galcerán J, Marcos-Gragera R, Izquierdo A, Borrás J.** Carcinoma invasor y lesiones premalignas del cuello uterino en los registros poblacionales: utilidad y limitaciones. En: de San José S y García AM, editores. Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006. P.15-29.
43. **Kurman RJ, Solomon D.** The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. New York, NY: Springer-Verlag;1994.
44. **Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Presa M, et al.** The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002;287:2114-2119.
45. **Davey DD, Zarbo RJ.** Introduction and Commentary, Strategy Science Symposium. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127(8): 927-9.
46. **Solomon D, Nayar R.** El sistema Bethesda para informar la citología cervical. Definiciones, criterios y notas aclaratorias. 2ª edición- New York, NY:Springer-Verlag;2004
47. **Bethesda system website atlas.** <http://nih.cytopathology.orgatlas.php>
48. **Raab SS.** Human Papillomavirus Reporting. Impact on Bethesda Cytology Reports. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127(8): 969-72.
49. **Informe del grupo de expertos sobre concreción de cartera común de servicios para cribado de cáncer. Estrategia en Cáncer en el Sistema Nacional de Salud.** Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Detección precoz del cáncer de cuello de útero Actualización 2013. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social. p.14-6.

50. **Arbyn M, Van OH, Lynge E, Micksche M, Faivre J, Jordan J.** European Commission's proposal for a council recommendation on cancer screening. *BMJ*. 2003; 327: 289-90.
51. **Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N et al.** European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition-Summary Document. *Annals of Oncology*. 2010; 21:448-58.
52. **Wright TC, Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D.** 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 197:346-55.
53. **Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A et al.** A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess*. 1999; 3(14):1-196.
54. **Van Rosmalen J, Kock IMCM, van Bellgooijen M .** Cost-effectiveness of cervical cancer screening: cytology versus human papillomavirus DNA testing. *BJOG*. 2012; 119(6): 699-709.
55. **Ronco G, Giorgio-Rossi P, Carozzi F.** New technologies for cervical cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial: *Lancet Oncol*. 2010; 11: 249-57.
56. **Torné Bladé A, Alonso Vargas I, Puig-Tintoré LM.** Utilidad clínica de la detección del virus del papiloma humano. En: Carreras Collado R, Xercavins Montosa J, Checa Vizcaíno MA, editores. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de cuello de útero*. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana 2007. p.55-63
57. **Moyer VA, US Preventive Service Task Force.** Screening for cervical cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2012; 156(12):880-92.
58. **Arbyn M, Roelens J, Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PP et al.** Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Mar 28; 3:CD008054. Epub 2013 Mar 28.

- 59. Rossi PG, Ronco G.** The present and future of cervical cancer screening programmes in Europe. *Curr Pharm Des.* 2013; 185:35-45.
- 60. Cortés J, Martínón-Torres F, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M et al.** Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol.* 2010; 53(supl1): 1-19.
- 61. Peirson L, Fitzpatrick-Lewis D, Ciliska D, Warren R.** Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2013;2:35 doi: 10.1186/2046-4053-2-35
- 62. Lyng E, Törnberg S, von Karsa L, Segnan N, van Delden JJ.** Determinants of successful implementation of population-based cancer screening programmes. *Eur J Cancer.* 2012;48(5):743-8.
- 63. Puig-Tintoré LM, de San José S, Méndez C, Cortés X, Torné-Bladé A, Roura E et al.** Prevención secundaria: situación actual del cribado de cáncer de cuello uterino en España. En: de San José S y García AM, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención.* 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006. P.131-40.
- 64. Puig-Tintore LM, Cortés X, Castellsagué X, Torne A, Ordi J, de Sanjosé S et al.** Prevención del cáncer de cuello uterino, ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstrect Ginecol.* 2006; 49 Supl.2 : 5-62.
- 65. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J et al.** American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2012; 137: 516-42.
- 66. McGraw SL, Ferrante JM.** Update o prevention and screening of cervical cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(4):744-52.
- 67. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M et al,** for the 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2013 ; 17(5) : S1-S27.

68. **Volerman A, Cifu AS.** Cervical Cancer Screening. JAMA Clinical Guidelines Synopsis. JAMA. 2014; 312(21):2279-80.
69. **Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G et al.** Comparison of Predictors for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17(11):3033-42.
70. **Shiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S.** Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet. 2007; 370:890-907.
71. **McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW et al.** Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. Lancet Oncol. 2008; 9:425-34.
72. **Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J.** Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2008;111:167-77.
73. **Akamatsu S, Kodama S, Himeji Y, Ikuta N, Shimagaki N.** A comparison of liquid based cytology with conventional cytology in cervical cancer screening. Acta Cytol. 2012; 370-74.
74. **Cummings MC, Cuarto LM, Pelecanos AM, Perkins G, Papadimos D, O'Rourke P et al.** Which are more correctly diagnosed : Conventional Papanicolaou Smears or ThinPrep Samples? A comparative study of 9 years of external quality-assurance Testing. Cancer Cytopathol. 2015; 123(2): 108-16.
75. **Nance KV.** Evolution of Pap testing at a community hospital: a ten year experience. Cancer Cytopathol. 2007; 35(3): 148-53.
76. **Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME, Herrero R, M Alfaro, Bratti MC et al.** Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma. Cancer. 1999; 87(2): 48-55.
77. **Monsonogo J, Bergeron C, Dachez R, Liaras J, Saurel J, Zerat L et al.** Liquidbased cytology for primary cervical cancer screening : a multi-centre study. British J Cancer. 2001;84, 360-6.

- 78. Castle PE, Cox JT, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D.** Factors Influencing Histologic Confirmation of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Cytology. *Obstet Gynecol.* 2008; 112(3):637-45.
- 79. de Bekker-Grob E, de Kok I, Johan Bulten J, van Rosmalen J, Vedder JEM, Arbyn M et al.** Liquid-based cervical cytology using ThinPrep technology: weighing the pros and cons in a costeffectiveness analysis. *Cancer Causes & Control.* 2012: 1323-31.
- 80. Sigurdsson K.** Is a liquid-based cytology more sensitive than a conventional Pap smear? *Cytopathology.* 2013;24:254-63.
- 81. Pan QJ, Hu SY, Zhang X, Ci PW, Zhang WH, Guo HQ et al.** Pooled Analysis of the Performance of Liquid-Based Cytology in Population-Based Cervical Cancer Screening Studies in China. *Cancer Cytopathol.* 2013;121:473-82.
- 82. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Sharma K, Apple R.** Interlaboratory variation in the performance of liquid-based cytology: Insights from the ATHENA trial. *Int J Cancer.* 2014; 134(8): 1835-43.
- 83. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C et al.** Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ.* 2007 Jul 7;335(7609):28.
- 84. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, Mody DR.** Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 2004 Nov;128(11):1224-9.
- 85. Ronco G, van Ballegooijen M, Becker N, Chil A, Fender M, Giubilato P et al.** Process performance of cervical screening programmes in Europe. *Eur J Cancer.* 2009 Oct;45(15):2659-70.
- 86. Kenyon S, Sweeney BJ, Happel J, Marchilli GE, Weinstein B, Schneider D.** Comparison of BD Surepath and Thinprep Pap systems in the processing of mucus-rich specimens. *Cancer Cytopathol.* 2010; 118(5): 244-9.
- 87. Siebers AG, Klinkhamer PJ, Grefte JM, Massuger LF, Vedder JE, Beijers-Broos A et al.** Comparison of Liquid-Based Cytology With Conventional Cytology for Detetion of Cervical Cancer Precursors. *JAMA.* 2009; 302(16): 1757-64.

88. **Sweeney BJ, Hag Z, Happel JF, Weinstein B, Schneider D.** Comparison of the effectiveness of two liquid-based Papanicolaou systems in the handling of adverse limiting factors, such as excessive blood. *Cancer*. 2006; 108(1):27-31.
89. **Civagen Biomedical Group.** Disponible en: <http://civagen.com/Productos-Citologia-Liquida-Test-SurePath.aspx>
90. **Ko V, Tambouret RH, Kuebler DL, Black-Schaffer WS, Wilbur DC.** Human papillomavirus testing using hybrid capture II with SurePath collection: initial evaluation and longitudinal data provide clinical validation for this method. *Cancer Cytopathol*. 2006; 108(6): 468-74.
91. **Soler I, Romero E, Pijuán L, Lloveras B, Carreras R, Serrano S, Alameda F.** Aplicación de la lectura automatizada de citología ginecológica. El punto de vista de los citotécnicos. *Rev Esp Patol*. 2020; 43: 69-72.
92. **Lee CY, Ng WK.** A Follow-up Study of Atypical Squamous Cells in Gynecologic Cytology Using Conventional Papanicolaou Smears and Liquid-Based Preparations. The Impact of the Bethesda System 2001. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:548-55.
93. **Arney A, Bennett KM.** Molecular diagnostic of human papillomavirus. *Laboratory Medicine*. 2010; 41(9): 523-30.
94. **Hubbard RA.** Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 127(8): 9405
95. **Lörincz AT, Richart RM.** Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cytology in Cervical Screening Programs. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(8): 959-68.
96. **Litjens RJ, Hopman AH, van der Vijver KK, Ramaekers FC, Kruitwagen RF, Kruse AJ.** Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal. *Expert Opin Med Diagn*. 2013; 7(4): 365-77.
97. **Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink ET, Franco EL, Ronco G et al.** Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009; 124: 516–20.
98. **Stoler MH.** Human Papillomavirus Biology and Cervical Neoplasia. Implications for Diagnostic Criteria and Testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(8): 935-9.
99. **Schiffman M, Solomon D.** Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic contesting. *N Engl J Med*. 2013; 2324-2331.

- 100. Ramirez A, Musset M, Vilamala M, Laso E, Serrano L, Alameda F.** Hybrix Capture 2 HRHPV. Should “grey zone” results justify repeating the test? *Ann Quant Cytol Histol.* 2013; 35: 152-6.
- 101. Wiwanitkit V.** Cervista HPV HR test kit in cervical cancer screening. *J Low Genit Tract Dis.* 2013;17:99.
- 102. Chranioti A, Spathis A, Aga E, Meristoudis C, Pappas A, Panayiotides I et al.** Comparison of two commercially available methods for HPV Genotyping. CLART HPV2 and Linear Array HPV genotyping tests. *Anal Quant Cytol Histol.* 2012; 34: 257-63.
- 103. Dutra I, Foroni I, Couto AR, Lima M, Bruge-Armas J.** Molecular diagnosis of human papillomavirus, human papillomavirus and related diseases-from bench to bedside-research aspects, Dr. Davy Vanden Broeck (ed.) , 2012 ISBN: 978-953-307-855-7, Intech, available from: <http://www.interchopen.com/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedsideresearch-aspects/molecular-diagnosis-of-human-papillomavirus>.
- 104. Bonde J, Rebolj M, Ejegod DM, Preisler S, Lynge E, Rygaard C.** HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART HPV2 human papillomavirus genotype microarray system. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1):413 doi: 10.1186/1471-2334-14-413
- 105. Solé JM.** Utilidad del genotipado del virus del papiloma humano con el método cobas 4800 en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) [Tesis doctoral]. Barcelona: Departament de Pediatria, d’Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona; 2013
- 106. Herraiz-Hernandez E, Alvarez-Perez M, Navarro-Bustos G, Esquivias J, Alonso S, Aneiros-Fernandez J et al.** HPV Direct Flow CHIP: A new human papillomavirus genotyping method based on direct PCR from crude-cell extracts. *J Virol Methods.* 2013;193:9-17.
- 107. Lloveras B, Gomez S, Alameda F, Bellosillo B, Mojal S, Muset M, et al.** Correction: HPV testing by cobas HPV test in a population from Catalonia. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58153.

108. **Litjens RJ, Hopman AH, van de Vijver KK, Ramaekers FC, Kruitwagen RF, Kruse AJ.** Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal . *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7(4):365-77.
109. **Morgan TK, Berlin M.** Immunocytochemical analysis of the cervical Pap smear. En : Daniel Keppler and Athena W. Lin (eds.), *Cervical Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1249, DOI 10.1007/978-1-4939-2013-6_15, © Springer Science+Business Media New York 2015
110. **Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH.** Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34 : 1077-87.
111. **Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M.** p16/ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012 ; 126(2). 198-202.
112. **Martin CM, O' Leary JJ.** Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(5):605-15.
113. **Stoler MH.** Toward Objective Cervical Cancer Screening. Maybe the Eyes Do Have It. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134: 5-6.
114. **Schiffman M, Solomon D.** Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(8): 946-9.
115. **Pinto AP, Crum CP, Hirsch MS.** Molecular markers of early cervical neoplasia. *Diagn Histopathol.* 2010; 16(10): 445-54.
116. **Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frias, Acosta-Ortega J et al.** Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol.* 2009;132:378–90.
117. **Guo M, Baruch A, Silva E, Jan Y, Lin E , Sneige N et al .**Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135:212–20.

118. **Pinto AP, Schlecht NF, Woo TY, Crum CP, Cibas ES.** Biomarker (ProEx C, p16(INK4A), and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Mod Pathol.* 2008;21:1067–74.
119. **Ge Y, Mody DR, Smith D, Anton R.** p16(INK4a) and ProEx C immunostains facilitate differential diagnosis of hyperchromatic crowded groups in liquid-based Papanicolaou tests with menstrual contamination. *Acta Cytol.* 2012; 56(1):55-61.
120. **Won Byun S, Lee A, Kim S, Jin Choi Y, Soo Lee Y, Sup Park J.** Immunostaining of p16^{INK4a}/ki-67 and L1 Capsid Protein on Liquid-based Cytology Specimens obtained from ASC-H and LSIL-H cases. *Int. J. Med. Sci.* 2013; 10(12): 1602-7.
121. **Shi J, Liu H, Wilkerson M, Huang Y, Meschter S, Dupree W et al** Evaluation of p16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase IIalpha, ProEX C, and p16INK4a/ProEX C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol.* 2007;38(9):1335-44.
122. **Carozzi F, Confortini M.** Group, New Technologies for Cervical Cancer Screening (NTCC) Working. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9: 937-45.
123. **Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L et al.** NTCC working group. 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.* 2013; 14: 168-76.
124. **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.* 2012; 120. 294-307.
125. **Razmpoosh M, Sansregret A, Oligni LL, Patey N, Dormoy-Raetlet V, Ducruet T et al.** Assesment of correlation between p16^{INK4a} staining, specific subtype of human papillomavirus and progression of LSIL/CIN1 lesions : first comparative study. *Am J Clin Pathol.* 2014; 142(1):104-10.

126. **Shroyer K, Chivukula M, Ronnett B, Morgan T.** CINtec p16 cervical histology compendium & staining atlas. Editado por Roche/mtm labs ; 2011.
127. **Liao GD, Sellors JW, Sun Hong Kong, Zhang X, Bao YP, Jerónimo J et al.** p16^{INK4A} immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: A prospective study in China. *Int J Cancer.* 2014; 134(7):1715-24.
128. **Pacchiarotti A, Ferrari F, Bernardini P, Chini F, Collina G, Dalla Palma P et al.** Prognostic value of p16INK4a protein in women with negative o CIN1 histology result: a follow-up study. *Int J Cancer.* 2014; 134(4):897-904.
129. **Shah AA, Jeffus SX, Zhao Z, Stoler MH, Stelow EB.** Adjunct p16(INK4a) immunohistochemistry aids the detection of high-grade squamous intraepithelial lesions in endocervical curettage specimens. *Am J Clin Pathol.* 2014; 141(3):342-7.
130. **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; 45(4):826-33.
131. **Pinto AP, Degen M, Villa LL, Cibas ES.** Immunomarkers in Gynecologic Cytology: The Search for the Ideal ‘Biomolecular Papanicolaou Test’. *Acta Cytologica.*2012;56:109-21.
132. **Van Bogaert LJ.** P16INK4a immunocytochemistry/immunohistochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. *Ann Diagn Pathol.* 2012;16(5): 422-6.
133. **Schledermann D, Andersen BT, Bisgaard K, Dohse M, Ejersbo D, Hoelund B,et al.** Are adjunctive markers useful in routine cervical cancer screening? Application of p16(INK4a) and HPV-PCR on ThinPrep samples with histological follow-up. *Diagn Cytopathol.* 2008;36(7): 453-9.
134. **Hariri J, Oster A.** The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26:223-8.
135. **von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C.** Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16(INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9:149-63.

- 136. Denton K, Bergeron C, Klement P, Trunk T, Keller T, Ridder R;** European CINtec Cytology Study Group. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology versus HPV testing for detecting High-Grade cervical disease in the triage of ASC-us and LSIL Pap cytology results. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134: 12-21.
- 137. Pirog EC, Quint KD, Yantiss RK.** P16/CDKN2A and Ki-67 enhance the detection of anal intraepithelial neoplasia and condyloma and correlate with human Papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(10): 1449-55.
- 138. Ziemke P, Marquardt K , Griesser H.** Predictive Value of the Combined p16 and Ki-67 Immunocytochemistry in Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Acta Cytol.* 2014; 58(5): 489-94.
- 139. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM.** Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *Biomed Research International.* 2013, Article ID 519619, 10 pages doi: 10.1155/2013/519619
- 140. Trutnovsky G, Kolovetsiou-Kreiner V, Reich O.** p16/Ki-67 dual-stained cytology testing may predict postpartum outcome in patients with abnormal papanicolaou cytology during pregnancy. *Acta Cytol.* 2014; 58(3):293-6.
- 141. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C et al.** Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105 : 1550-7.
- 142. Toll AD, Kelly D, Maleki Z.** Utility of p16 expression and ki-67 proliferation index in ASCUS and ASC-H pap tests. *Diagn Cytopathol.* 2014; 42(7): 576-81.
- 143. Byun SW, Lee A, Kim S, Choi YJ, Lee YS, Park JS.** Immunostaining of p16 (INK4a)/ Ki-67 and L1 Capsid Protein on Liquid-based Cytology Specimens Obtained from ASC-H and LSIL-H Cases. *Int J Med Sci.* 2013; 10(12): 1602-7.
- 144. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT.** Evaluation of CINtec PLUS® Testing as an Adjunctive Test in ASC-US Diagnosed Surepath® Preparations. *Diagn Cytopathol.* 2013; 41: 35-40.
- 145. Longhavi S, Walts A, Bose S.** CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined

- significance and low grade squamous intraepithelial lesión. *Diagn Cytopathol.* 2013; 41: 582-87.
- 146. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodriguez-Carunchio L, Torné A, Del Pino M.** Usefulness of p16/ki67 Immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol.* 2014; 122 (13) : 227-35.
- 147. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C et al.** Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol.* 2011; 121: 505-9.
- 148. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, for the European CINtec Cytology Study Group.** p16/Ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology. Results from the European Equivocal or Mildly Abnormal Papanicolaou Cytology Study. *Cancer Cytopathol.* 2011; 25: 158-66.
- 149. Waldstrøm M, Christensen RK, Ørnskov D.** Evaluation of p16(INK4a)/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 Mar; 121(3):136-45.
- 150. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith KK, 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.* 2012; 18 : 4154-62.
- 151. Zappacosta R, Colasante A, Viola P, D'Antuono T, Lattanzio G, Capanna S et al.** Chromogenic In Situ Hybridization and p16 / Ki67 Dual Staining on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cervical Specimens : Correlation with HPV-DNA Test, E6/E7 mRNA Test, and Potential Clinical Applications. *BioMed Res Int* 2013; Article ID 453606, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/453606>
- 152. Usted K, Guo YL, Geng L, Quiao J.** Correlation of cervical intraepithelial neoplasia with expressions of p16 and Ki67 in exfoliated cervical cells in fluid-based thin-layer samples. *Eur J Gyneacol Oncol.* 2013;34(6): 535-9.
- 153. Chivukula M, Austin M, Matsko J, Duwe A, Freidman T, Mauser N et al.** Use of Dual-Stain for P16 and Ki-67 in the Interpretation of Abnormal Pap

- Cytology Results : A Prospective Study. *Cancer Cytopathol.* 2010; 118 (supl 5): 333-4.
- 154. Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR.** Dual stain immunohistochemical localization of p16^{INK4a} and ki67 : a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011; 19:514-8.
- 155. Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K et al.** Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Int J Clin Oncol.* 2015;20(1);134-42.
- 156. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J et al.** Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and longitudinal data. *Int J Cancer.* 2015; 136 (10): 2361-8.
- 157. Bergeron C, Schmidt D, Ikenberg H, Ridder R.** High sensitivity and high specificity of p16/Ki-67 dual-stained cytology for high-grade CIN-results from screening and triage trials in over 28,000 women. *Cancer Cytopathol.* 2010; 118: 305-6.
- 158. Safaeian M, Sherman ME.** From Papanicolaou to Papillomaviruses: Evolving Challenges in Cervical Cancer Screening in the Era of Human Papillomavirus Vaccination. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105(20):1524-6.
- 159. Atkins K.** p16/ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage Of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology. P16/Ki-67 in Cervical Papanicolaou Tests. *Cancer Cytopathol.* 2011; 25: 145-7.
- 160. 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.* 2012;138: 652-6.

161. **Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macri L, Fiorito C et al.** Interpretation of p16INK4a/Ki-67 Dual Immunostaining for the Triage of Human Papillomavirus-Positive Women by Experts and Nonexperts in Cervical Cytology. *Cancer Cytopathol.* 2014. Doi:10.1002/ency.21511
162. **Koo YJ, Hahn HS, Lee IH, Lim KT, Lee KH, Kim HS et al.** Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion. *Virchows Arch.* 2013 Nov; 463(5):689-96.
163. **Wentzensen N, Zuna RE, Sherman ME, Gold MA; Schiffman M, Dunn ST et al.** Accuracy of cervical specimens obtained for biomarker studies in women with CIN3. *Gynecol Oncol.* 2009; 115:493-6.
164. **Nucci MR, Oliva E.** Squamous intraepithelial lesion/dysplasia. En: *Diagnostic Pathology Gynecological.* Canada: Amirsys, 2014: 3.46-3.5
165. **Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD et al.** The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis.* 2012;16:205–242.
166. **Maniar KP, Nayar R.** HPV-related squamous neoplasia of the lower anogenital tract: an update and review of recent guidelines. *Adv Anat Pathol.* 2014; 21(5):341-58.
167. **Stoler MH.** New Bethesda terminology and evidence-based management guidelines for cervical cytology findings. *JAMA.* 2002; 287:2140-1.
168. **Soslow RA, Longacre TA.** *Uterine Pathology.* Cambridge University Press 2012.
169. **Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB.** Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Obstet Gynecol.* 2012; 120(6):1465-71.
170. **Stoler MH, Vichnin MD, Ferenczy A, Ferris DG, Perez G, Paavonen J et al.** The accuracy of colposcopic biopsy: analyses from the placebo arm of the Gardasil clinical trials. *Int J Cancer.* 2011; 128: 1354-62.

171. **Herfs M, Parra-Herran C, Howitt BE, Laury AR, Nucci MR, Feldman S et al.** Cervical Squamocolumnar Junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37:1311-8.
172. **Herfs M, Vargas SO, Yamamoto Y, Howitt BE, Nucci MR, Hornick JL et al.** A novel blueprint for “top down” differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. *J Pathol.* 2013;229:460–468.
173. **Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME et al.** A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(26):10516-21.
174. **Herfs M, Crum CP.** Laboratory management of cervical intraepithelial neoplasia: proposing a new paradigm. *Adv Anat Pathol.* 2013;20:86–94.
175. **Skapa P, Robova H, Rob L, Zamecnik J.** p16 immunoprofiles of squamous lesions of the uterine cervix-implications for the reclassification of atypical immature squamous metaplasia. *Pathol Oncol Res.* 2013;19:707–714.
176. **van der Marel J, van Baars R, Alonso I, del Pino M, van de Sandt M, Lindeman J et al.** Oncogenic human papillomavirus-infected immature metaplastic cells and cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:470–479.
177. **Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K.** Evaluation of p16INK4a Expression in ThinPrep Cervical Specimens With the CINtec p16 INK4A Assay. Correlation with biopsy Follow-up Results. *Cancer Cytopathol.* 2007; 111: 83-92.
178. **Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R; European CINtec Histology Study Group.** Conjunctive p16^{INK4a} Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133 (3): 395-406.
179. **Wentzensen N, Walker JL, Gold MA, Smith KM, Zuna RE, Mathews C et al.** Multiple Biopsies and Detection of Cervical Cancer Precursors at Colposcopy. *J Clin Oncol.* 2015; 33:83-9.

- 180. Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, Pirog EC.** p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:1343–9.
- 181. Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33:159-174.
- 182. Dirección General de Planificación , Ordenación Sanitaria y Farmacéutica e Investigación. Consejería de Sanidad y Política Social.** Hospitales de referencia de las áreas de salud y zonas básicas de la región de Murcia. Mapa Sanitario 2009. Disponible en : www.murciasalud.es/planificacion (acceso 22-diciembre-2014)
- 183. Instituto Nacional de Estadística,2013^a.** Cifras de población a 1 de enero de 2013. Resultados nacionales. Población residente por fecha, sexo y edad. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path:/t20/p321/serie/10/&file=01001>(consultado 22-10-2014)
- 184. Bellosillo B.** Métodos de determinación del virus del papiloma humano (HPV) en cribado de cáncer de cérvix. En : [www.seap.es /c/document_library/get_file](http://www.seap.es/c/document_library/get_file)
- 185. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS et al.** Prevalence of HPV Infection Among Females en the United States. *JAMA.* 2007; 297: 813-9.
- 186. Eversole GM, Moriarty AT, Schwartz MR, Clayton AC, Souers R, Fatheree LA et al.** Practices of Participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology, 2006. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:331-5.
- 187. Verma I, Jain V, Kaur T.** Application of Bethesda System for cervical cytology in unhealthy cervix. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014;8(9):26-30.
- 188. Vilaplana E, Puig-Tintoré LM, Cortés J.** Encuesta española sobre Resultados Citológicos anómalos. *Boletín de la AEPCC.* 2006;20:19.
- 189. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Kickey JD et al.** Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 810-9.
- 190. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St. John TL, Leiman G, Cooper K.** Distribution of Human Papillomavirus Types in ThinPrep Papanicolaou Tests

- Classified According to the Bethesda 2001 Terminology and Correlations with Patient Age and Biopsy Outcomes. *Cancer*. 2006; 106 : 1054-64.
191. **Toro de Méndez M, Fernández Izquierdo A, Llombart-Bosch A.** Tinción dual inmunocitoquímica de p16^{INK4a}/ki-67 para la detección de lesiones del cuello uterino asociadas a infección por el virus del papiloma humano. *Invest Clin*. 2014; 55(3): 238-48.
192. **Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin Hirsch P et al.** p16 (INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009;35:210-20.
193. **Longatto Filho A, Utagawa ML, Shirata NK, Pereira SM, Namiyama GM, Kanamura CT et al.** Immunocytochemical expression of p16INK4A and ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol*. 2005;24:118-24.
194. **Vrdoljak-Mozetic D, Krasevic M, Versa Ostojic D, Stemberger-Papic S, Rubesa-Mihaljevic R, Bubonja-Sonje M.** HPV genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions. *Cytopathology*. 2015; 26:10-8.
195. **Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN et al.** Interobserver Reproducibility and accuracy of p16/ki-67 Dual-Stain Cytology in Cervical Cancer Screening. *Cancer Cytopathol*. 2014; 122:914-20.
196. **Singh C, Manivel C, Truskinovsky AM, Savik K, Amirouche S, Holler J et al.** Variability of Pathologists' Utilization of p16 and Ki-67 Immunostaining in the Diagnosis of Cervical Biopsies in Routine Pathology Practice and Its Impact on the Frequencies of Cervical Intraepithelial Neoplasia Diagnoses and Cytohistologic Correlations. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138: 76-87.
197. **Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C et al.** Usefulness of CINtec®PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol*. 2011; 55(5). 413-20.
198. **Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Parakesvaidis E, Dillner J.** Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J Cell Mol Med*. 2009; 13:648-59.

199. **Uijterwaal MH, Witte BI, Van Kemenade FJ, Rijkaart D, Ridder R, Berkhof J et al.** Triaging borderline/mild dyskaryotic pap cytology with p16/ki67 dual-stained cytology testing : cross-sectional and longitudinal outcome study. *British Journal of cancer.* 2014; 110; 1579-86.
200. **Del Pino M, García S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A et al.** Value of p16^{INK4a} as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201:488.e1-7.
201. **Kisser A, Zechmeister-Koss I.** A systematic review of p16/Ki-67 immunotesting for triage of low grade cervical cytology. *BJOG.* 2015; 122(1):64-70.
202. **Tena D, Garrido N, Delgado JJ, Menéndez JM, Romanik J, González MR, et al.** Prevalencia de la infección por el virus del papiloma humano en mujeres con citologías anormales del cérvix uterino y factores de riesgo asociados a la infección. *Prog Obstet Ginecol.* 2006; 49(5): 247-54.
203. **Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L et al.** Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the predictors 2 study. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012; 50(6) : 1867-73.
204. **Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, Gau CH.** Is p16INK4A expression more useful than hamn papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol.* 2005; 97: 35-40.
205. **Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer AL, Shroyer KR.** Immunocytochemical Colocalization of p16 INK4a and Ki-67 Predicts CIN2/3 and AIS/Adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2012; 120: 26-34.
206. **Baena Del Valle JA, Ramos Moreno AJ, Gómez Alegría CJ, Gómez Camargo DE.** Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 2013; vol. XV, núm. 1, pp. 172-179.
207. **Bustamante JA, Astudillo M, Jairo A, Bravo LE, Miryam Astudillo.** Evaluación de dos métodos de Extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en

- formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biológica*. 2011; 16(2): 83-97.
- 208. De Armas Y, Capó V, González E, Mederos L, Díaz R.** Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. *Rev Esp Patol*. 2006; 39(3): 171-4.
- 209. De Armas Y, Capó V, López LX, Mederos L, Diaz R.** Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. *Biotechnología Aplicada*. 2011; 28: 40-43.
- 210. Killeen JL, Dye T, Grace Ch, Hiraoka M.** Improved Abnormal Pap Smear Triage Using Cervical Cancer Biomarkers. *J Low Genit Tract Dis*. 2014; 18(1): 1-7.
- 211. Kulasingam SL, Kim JJ, Lawrence WF et al.** Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer*. 2005; 105:461-7.
- 212. Gonzalez-Bosquet E, Esteva C, Munoz-Almagro C, Ferrer P, Perez M, Laila JM:** Identification of vaccine human papillomavirus genotypes in squamous intraepithelial lesions (CIN2-3). *Gynecol Oncol*. 2008; 111(1): 9-12.
- 213. Pérez Castro S, Lorenzo Mahía Y, Iñarrea Fernández A, Lamas González MJ, Sarán Diez MT, Rubio Alarcón J et al.** Cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in Galicia, Spain: HPV 16 prevalence and vaccination impact. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(8): 479-85.
- 214. Van der Marel J, Berkhof J, Ordi J, Torné A, del Pino M, van Baars R et al.** Attributing Oncogenic Human Papillomavirus Genotypes to High-grade Cervical Neoplasia Which Type Causes the Lesion?. *Am J Surg Pathol*. 2015; 39(4):496-504.
- 215. Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, van de Sandt M, Doorbar J et al.** One virus one lesion -individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol*. 2012;227:62–71.
- 216. Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B et al** for the HERACLES/SCALE Study Group. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2013; 132: 854-67.

217. **Mazarico E, González-Bosquet E.** Prevalence of infection by different genotypes of human papillomavirus in women with cervical pathology. *Gynecol Oncol.* 2012; 125(1): 181-5.
218. **Conesa-Zamora P, Ortiz-Reina S, Moya-Biosca J, Doménech-Peris A, Orantes-Casado F, Pérez-Guillermo M et al.** Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:124.
219. **Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a metaanalysis update. *Int J Cancer.* 2007; 121(3): 621-32.
220. **Moreno Docón A.** Infección por el virus del papiloma humano en mujeres con lesión intraepitelial cervical: aspectos virológicos y clinicopatológicos [tesis doctoral]. Universidad de Murcia, Departamento de Genética y Microbiología; 2014.
221. **Bulk S, Berkhof J, Rozendaal L, Fransen Daalmeijer NC, Gök M, de Schipper Fa et al.** The contribution of HPV18 to cervical cancer is underestimated using high-grade CIN as a measure of screening efficiency. *Br J Cancer.* 2007;96:1234-6.
222. **Safaeian M, Schiffman M, Gage J, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE.** Detection of precancerous cervical lesions is differential by human papillomavirus type. *Cancer Res.* 2009;69:3262–3266.
223. **Schettino MT, Amatturo FP, Grimaldi E, Legnate A, Marcello A, Donnarumma G et al.** Persistent papillomavirus tipo-31 y tipo-45 infections predicts the progression to squamous intraepithelial lesion. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2014; 53(4): 494-7.
224. **Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Wentzensen N, Gravitt PE.** Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 1675-81.
225. **Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, Passerini R, Zorzino L, Boveri S et al.** Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: prevalence and distribution of different genotypes. *J Med Virol.* 2009; 81(2):271-7.

- 226. Alemany L, Pérez C, Tous S, Llombart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, and Spanish study group RIS HPV TT .** Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol.* 2012; 124: 512-7.
- 227. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B et al.** Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11:1048–1056.
- 228. Pista A, Freire de Oliveira C, Lopes C, Cunha MJ, on behalf of the CLEOPATRE Portugal Study Group.** Human Papillomavirus Type Distribution in cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Cervical Cancer in Portugal. A CLEOPATRE II Study. *Int J Gynecol Cancer.* 2013; 23(3): 500-6.

