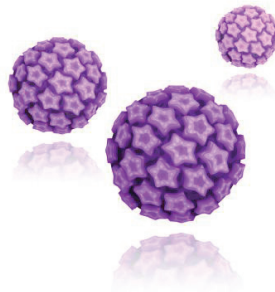


**Caracterización de la infección cervical por el Virus
Papiloma Humano. Aplicación de nuevas técnicas de
microbiología molecular en el estudio de la infección
por el genotipo 16**

**Characterization of cervical infection by Human Papillomavirus.
Application of new techniques of molecular microbiology in the
study of infection by genotype 16**



TESIS DOCTORAL
Ledicia Álvarez Paredes
San Juan (Alicante), 2017

D. JAVIER FERNANDEZ SÁNCHEZ, Director del Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo “Caracterización de la infección cervical por el virus papiloma humano. Aplicación de nuevas técnicas de microbiología molecular en el estudio de la infección por el genotipo 16” presentado por Dña Leticia Álvarez bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz, Dr. Miguel Santibañez Margüello y del Dr. Joaquín Portilla Sogorb.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a 10 de julio de 2017

Prof. J. Fernández

Director

Dpto. Medicina Clínica



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante
Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450
c.electrónico: med.psiqui@umh.es

Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz, Dr. Miguel Santibáñez Margüello y Dr. Joaquín Portilla Sogorb, como directores de Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo “Caracterización de la infección cervical por el virus papiloma humano. Aplicación de nuevas técnicas de microbiología molecular en el estudio de la infección por el genotipo 16” realizado por Dña Leticia Álvarez Paredes ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a 10 de julio de dos mil diecisiete

Fdo. Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz

Fdo. Dr. Miguel Santibáñez Margüello

Fdo. Dr. Joaquín Portilla Sogorb

A mis abuelos; in memoriam (*lo que deja buenos recuerdos nunca muere*)



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer de manera especial la ayuda y el ánimo prestado por mi gente más cercana. Mis padres y mis hermanas; de los que he aprendido que hay que vivir con sentido de la justicia y con alegría y que la capacidad de trabajo es una gran virtud.

Agradecer también a mis directores de tesis, el Dr. Juan Carlos Rodríguez, Dr. Miguel Santibáñez y Dr. Joaquín Portilla por todos estos años de apoyo, ayuda y confianza. Gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y por vuestra paciencia.

Esta tesis doctoral es el resultado del trabajo y esfuerzo de mucha gente, y os lo quiero agradecer:

A Gloria Royo (con quien inicie este proyecto), Montse Ruiz, Pilar Lopez; gracias por vuestra implicación y vuestra cercanía.

A Maria Paz por su gran ayuda y por sus ganas de trabajar contagiosas.

A Antonio Galiana, Rosa Cremades y Laura Sanchez; gracias por enseñarme (con el sentido del humor que os caracteriza) esa parte de la metodología de la investigación tan compleja y desconocida para mí.

A mis compañeros durante el periodo de residencia, que han compartido conmigo algunos momentos de cansancio y frustración; pero muchos más de alegrías.

A todo el personal técnico de laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche, en especial a las “serólogas”; gracias por vuestra comprensión y vuestra ayuda tan desinteresada.

A todas mis compañeras del Hospital General Universitario de Burgos, que han “soportado” el periodo final de este proyecto con infinita paciencia y cariño.

Gracias a mis amigos de siempre y a los que he conocido estos últimos años por vuestros animos y ayuda.

Un pedacito de esta tesis os pertenece. Sinceramente agradecida



FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral se ha desarrollado gracias a la ayuda Fundación de la Comunidad Valenciana para la investigación biomédica, la docencia y la cooperación internacional y para el desarrollo del Hospital General Universitario de Elche (FIBELX10/10) y de la Fundación Bienvenida Navarro - Luciano Tripodi.



RESUMEN

Introducción: La infección persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo genotipo 16 es el factor principal en el desarrollo de Cáncer de Cérvix (CC). La carga y el subtipo viral podrían modular esta asociación, por lo que resulta importante su detección y el establecimiento de su relación con lesiones precursoras de CC.

Metodología: Estudio transversal en 595 mujeres con infección cervical por VPH, con diferentes grados de alteración citológica. De estas, se seleccionaron las mujeres con infección simple o múltiple por VPH 16 (n=176) para la determinación de la carga viral, mediante PCR en tiempo real y la variante viral por PCR anidada y posterior secuenciación. Mediante regresión logística no condicional, se estimaron Odds Ratios (OR) crudas y ajustadas junto con sus intervalos de confianza al 95% (IC95%) para evaluar la asociación entre la carga y variante virales y la existencia de lesiones cervicales.

Resultados: VPH 16 y VPH 52 fueron los genotipos más prevalentes, presentes en el 30,08% y 14,29% de las mujeres con infección por el VPH. El genotipo 16 fue el genotipo asociado de forma más fuerte con el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado (HSIL) o carcinoma: Odds Ratio ajustada (ORa) por edad e inmigración 12,02 (IC95% 4,92-29,39). La edad (por cada 10 años más) y el estatus inmigrante se asociaron de forma independiente con un aumento de 2,35 (IC95% 1,40-3,94) y 4,31 (IC95% 1,06-17,51) veces del riesgo de lesión de alto grado respectivamente. El hecho de tener una carga viral por encima de la mediana (>1367,79 copias/célula), se asoció de forma independiente con un aumento significativo del riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma tras ajustar por edad, estatus inmigrante, y variante viral: ORa=7,60 (IC95% 2,70-21,36); además esta asociación mostró un patrón dosis respuesta estadísticamente significativo al categorizar en base a los tertiles de la carga viral: ORa para una carga superior al tercer tercil=16,57 (IC95% 4,09-67,06), p de tendencia lineal ajustada <0,001. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la variante viral

detectada o infección múltiple, aunque se observó una mayor frecuencia de infección múltiple en mujeres menores de 34 años.

Conclusiones: La carga viral del VPH humano, específicamente la del genotipo 16, podría ser útil como biomarcador pronóstico de la infección. Este trabajo contribuye al entendimiento del efecto de la carga viral en la historia natural del CC; sin embargo, estudios prospectivos son necesarios para confirmar estos resultados.

Palabras Claves: Cáncer de cérvix, Virus del Papiloma Humano de alto riesgo, Carga Viral, Variante viral, España.

ABSTRACT

Introduction: Persistent human papillomavirus (HPV) infection with genotype 16 is the main factor in the development of Cervical Cancer (CC). Viral load and viral subtype could modulate this association, so it is important to detect and establish its relationship with CC precursor lesions.

Method: Cross-sectional study of 595 women with cervical HPV infection, with different degrees of cytological alteration. Of these, women with single or multiple HPV 16 infection (n = 176) were selected for viral load determination using real-time PCR and viral variant by nested PCR and subsequent sequencing. Through non-conditional logistic regression, crude and adjusted Odds Ratios (OR) were estimated along with their 95% confidence intervals (95%CI) to evaluate the association between viral load and variant and cervical lesions.

Results: HPV 16 and HPV 52 were the most prevalent genotypes present in 30,08% and 14, 29% of women with HPV infection. Genotype 16 was the genotype most strongly associated with the risk of high-grade intraepithelial lesion (HSIL) or carcinoma: Adjusted Odds Ratio (OR_a) by age and immigration 12,02 (95% CI 4,92-29,39). Age (for every 10 years) and immigrant status were independently associated with an increased risk for having high grade lesion of 2.35 (95%CI 1,40-3,94) and 4, 31 (95% CI 1,06-17, 51) respectively. Having a viral load above the median (> 1367,79 copies / cell), was independently associated with a significantly increased risk of high-grade intraepithelial lesion

or carcinoma after adjusting for age, immigrant status, and Viral variant: ORa =7,60 (95%CI 2,70-21,36); In addition, this association showed a statistically significant dose response pattern when categorized based on the tertiles of the viral load: ORa for a load higher than the third tertile = 16,57 (95% CI: 4,09-67,06), adjusted linear p trend <0.001. No statistically significant differences were found in relation to the detected viral variant or multiple infection, although a higher frequency of multiple infection was observed in women younger than 34 years.

Conclusions: Human HPV viral load, specifically of genotype 16, could be useful as a prognostic biomarker of infection. This analysis has provided information for understanding the effect of viral load on the natural history of CC. However, prospective studies are needed to confirm these results.

Key Words: Cervical Cancer, High Risk Human Papillomavirus, Viral Load, Viral Variant, Spain.



ABREVIATURAS

AA: Variante Asiático-americana

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Af1: Variante Africana 1

Af2: Variante Africana 2

AIN: Lesión intraepitelial anal

AR: Alto riesgo

ARN: Ácido ribonucleico

As: Variante Asiática

ASCH: Células escamosas atípicas en las que no se puede excluir lesión escamosa intraepitelial de alto grado

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado

BR: Bajo riesgo

CC: Cáncer de cérvix

CV: Carga viral

DE: Desviación estándar

EUR: Variante Europea

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

Genes E: Genes "early" tempranos

Genes L: Genes "late" tardíos

HC2: Captura de híbridos de segunda generación

HSIL: Lesión intraepitelial de alto grado

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC95%: Intervalos de Confianza al 95%

ITS: Infección de transmisión sexual

LCR: Long control región. Región larga de control

LEEP: Escisión electro quirúrgica con asa

LSIL: Lesión intraepitelial de bajo grado

ng: Nanogramos

NIC: Neoplasia intraepithelial cervicouterina

nm: Nanómetros

µl: Microlitro

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORa: Odds Ratio ajustada

ORc: Odds Ratio cruda

p53: Proteína p53

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pmol: Picomol

pRb: Proteína retinoblastoma

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

Tm: Temperatura de alienamiento

VaIN: Lesión intraepitelial de vagina

VHS-2: Virus *Herpes Simplex* tipo 2

VIN: Lesión intraepitelial de vulva

VLP: Partículas similares a virus

VPH: Virus papiloma humano



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1 Reseña histórica.....	13
3.2 Virus del Papiloma Humano (VPH).....	14
3.3 Epidemiología.....	22
3.4 Factores de riesgo.....	31
3.5 Histopatología	34
3.6 Cribado, diagnóstico y tratamiento.....	38
A. Cribado y Diagnóstico	38
A.1. Métodos basados en el diagnóstico citológico	38
A.2. Métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos.....	39
B. Tratamiento.....	45
3.7 Medidas para el control del cáncer de cérvix	46
A. Prevención primaria.....	47
B. Prevención secundaria. Cribado	52
3.8. Antecedentes metodológicos en la determinación de la carga viral y subtipos variantes virales de VPH	54
4. HIPÓTESIS.....	59
5. OBJETIVOS.....	63
5.1. Objetivo principales	63
5.2. Objetivos secundarios	63
6. MATERIAL Y MÉTODOS	67
6.1. Diseño del estudio	67
6.2. Consentimiento informado.....	67
6.3. Población estudio	67
6.4. Lesión histopatológica	70
6.5. Detección de los genotipos virales VPH	70

6.5.1. Toma de muestras.....	70
6.5.2. Extracción ADN VPH	71
6.5.3. Amplificación e hibridación reversa.....	72
6.6. Metodología para determinar la carga viral de las muestras VPH genotipo 16.....	74
A. Extracción ADN viral	74
A.1. Preparación de la muestra.....	74
A.2. Lisis externa.....	74
A.3. Extracción automatizada.....	74
A.4. Cuantificación de la calidad y cantidad de ADN extraído.....	75
B. Cuantificación de la carga viral por q PCR	76
B.1. Selección de dianas.....	76
B.2. Condiciones de trabajo de la PCR en tiempo real.....	79
B.3. Interpretación de los resultados.....	80
B.4. Recta patrón	80
B.5. Validación recta patrón	81
C. Análisis de las variantes papilomavirus genotipo 16.....	83
C.1. Amplificación por PCR anidada.....	83
C.2. Secuenciación y análisis de resultados.....	87
6.7. Fuentes de información y técnicas de recolección.....	90
6.8. Variables.....	90
6.9. Calidad del dato. Control de sesgos y errores	92
6.10. Análisis estadístico	93
7. RESULTADOS	97
7.1. Caracterización infección cervical	97
7.1.1 Riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma para el genotipo 16, 18 y resto de genotipos de alto riesgo.....	97
7.1.2. Infección múltiple.....	104
7.1.3 Lesión intraepitelial de alto grado y genotipos virales.....	107
7.2 Características de la muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16	109
7.2.1 Caracterización viral e histopatológica de infección por VPH 16.....	109

7.2.2 Asociaciones crudas y ajustadas para el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, en la muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16.....	114
7.2.3 Factores de riesgo.....	123
7.3 Prevalencia de genotipos aislados en función de los genotipos incluidos en la vacuna y potencial protección frente al desarrollo de lesiones de alto grado	129
8. DISCUSIÓN.....	137
8.1. Caracterización infección cervical	137
8.1.1 Prevalencia genotipos VPH de alto riesgo y lesión histopatológica	137
8.1.2. Infección múltiple.....	140
8.2. Infección cervical por VPH 16	142
8.2.1 Edad y estatus inmigrante.....	142
8.2.2 Carga viral	144
8.2.3 Variantes virales.....	148
8.2.4 Infección múltiple.....	149
8.3. Prevalencia de genotipos aislados en función de los genotipos incluidos en la vacuna y potencial protección frente a l desarrollo de lesiones de alto grado	151
8.4. Limitaciones.....	153
9. CONCLUSIONES	157
10. BIBLIOGRAFÍA.....	161
11. ANEXOS.....	181

Índice de tablas

Tabla 1: Tipos de proteínas de los VPH.....	20
Tabla 2: Especificaciones técnicas de las diferentes pruebas moleculares comercializadas para el diagnóstico de VPH	40-41
Tabla 3: Eficacia, seguridad e inmunogenicidad de las vacunas frente a VPH.....	49-50
Tabla 4: Especificaciones de las vacunas frente a VPH.....	51
Tabla 5: Recomendaciones de las sociedades científicas.....	53
Tabla 6: Cebadores y sondas diseñados por el software Beacon Designer 8.0 para la identificación de genes diana E6 VPH 16 y gen de la albúmina.....	78
Tabla 7: Cebadores diseñados para la PCR anidada de genes diana E6 VPH 16	83
Tabla 8: Volúmenes de reactivos y concentraciones para la PCR anidada	85
Tabla 9: Programa de amplificación PCR anidada	86
Tabla 10. Prevalencia global de genotipos de alto riesgo y probable alto riesgo del VPH en las mujeres que conforman la población a estudio (pacientes con infección cervical por VPH).....	98
Tabla 11: Características de la población estudiada: edad, país de origen, distribución de los genotipos del VPH y clasificación histológica de los frotis vaginales ...	103
Tabla 12: Asociaciones crudas y ajustadas entre el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma y la infección por genotipos del VPH de alto riesgo oncológico.....	108
Tabla 13: Clasificación de los genotipos de VPH AR oncológico detectados en las mujeres infectadas por el genotipo 16.....	109
Tabla 14: Características de muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16: edad, país de origen, distribución de los genotipos VPH en infección múltiple y clasificación histológica de los frotis vaginales	110
Tabla 15: Características de la distribución de los genotipos del papilomavirus restringiendo la muestra a las mujeres infectadas por el genotipo 16 según la clasificación histopatológica de Bethesda	112
Tabla 16: Características de la muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16: infección única o múltiple, variante y carga viral VPH 16.....	113
Tabla 17: Asociaciones crudas y ajustadas entre la edad, el estatus inmigrante y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma	114
Tabla 18: Asociaciones crudas y ajustadas entre infección única por el genotipo 16 o múltiple, y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma	115
Tabla 19: Asociaciones crudas y ajustadas entre la infección por las distintas variantes del genotipo 16, y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado/carcinoma..	117

Tabla 20: Asociaciones crudas y ajustadas entre la infección por los distintos subtipos de genotipo 16 y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, tratando la variante Europea E350T como categoría de referencia	119
Tabla 21: Asociaciones crudas y ajustadas entre la carga viral de la infección por el genotipo 16 y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.....	122
Tabla 22: Distribución de los factores de riesgo relacionados con HSIL-CC de nuestras pacientes	124
Tabla 23: Relación entre origen de la población y número de gestaciones	127
Tabla 24: Relación entre origen de la población y edad de comienzo de las relaciones sexuales.....	128
Tabla 25: Prevalencia genotipos de AR incluidos o no en las vacunas en nuestras pacientes en infección simple y múltiple	131
Tabla 26: Prevalencia de los genotipos VPH de alto riesgo en relación a los genotipos de alto riesgo incluidos en las vacunas	132
Tabla 27: Asociación (OR) e impacto (AFe) crudas y ajustadas del riesgo de 'lesiones de alto grado', en relación al genotipo de VPH y su protección por la vacuna tetravalente y nonavalenteVPH.....	133



Índice de figuras

Figura 1: Clasificación filogenética de VPH.....	15
Figura 2: Clasificación de los diferentes tipos VPH, tropismo y CC.....	16
Figura 3: Estructura genómica VPH.....	17
Figura 4: Ciclo replicativo del VPH y su relación con la invasión tisular.....	18
Figura 5: Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix a nivel mundial, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012.....	24
Figura 6: Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix en España, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012.....	25-26
Figura 7: Prevalencia de VPH por severidad de la lesión cervical y región. 2012.....	27
Figura 8: Los 10 tipos de VPH más frecuentes en cáncer de cérvix por región (1990 - 2010).....	28
Figura 9: Prevalencia de infección por VPH por regiones a nivel mundial.....	29
Figura 10: Prevalencia VPH AR en mujeres españolas con y sin lesión cervical.....	30
Figura 11: Persistencia viral de VPH.....	32
Figura 12: Modelo biológico de la expresión de los genes VPH de alto riesgo en las células del epitelio cervical.....	35
Figura 13: Clasificación de la neoplasia intraepitelial cervical (Richart).....	36
Figura 14: Clasificaciones que describen los cambios anormales en las células escamosas en el cuello del útero.....	37
Figura 15: Visión general de las intervenciones para prevenir la infección VPH y el CC.....	47
Figura 16: Diagrama de flujo de la población y muestras a estudio, en función de los objetivos analíticos del estudio.....	69
Figura 17: Presercyt®.Cepillo cervical.....	71
Figura 18: Soportes y bases metodológicas para la amplificación e hibridación del genoma de VPH.....	73
Figura 19: EasyMAG (Biomérieux).....	75
Figura 20: Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).....	76
Figura 21: Programa de PCR a Tiempo Real empleado.....	79
Figura 22: Recta patrón VPH 16.....	82
Figura 23: Esquema PCR anidada.....	84
Figura 24: Gel de agarosa del amplicon final resultado de la PCR anidada.....	86

Figura 25: Cromatograma obtenido en la secuenciación de una de las muestras problema.....	87
Figura 26: Alienación de las secuencias problema con la secuencia consenso con el programa CLC Sequence Viewer 6.....	88
Figura 27: Posiciones clave para identificación variante Europea E350T y Asiática....	89
Figura 28: Porcentaje de genotipos detectados en las mujeres que conforman la población a estudio (pacientes con infección cervical por VPH.....	99
Figura 29: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con citología normal	100
Figura 30: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con ASCUS.....	100
Figura 31: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con LSIL.....	101
Figura 32: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con HSIL.....	101
Figura 33: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con carcinoma in situ ..	102
Figura 34: Episodios de infección múltiple VPH en función del rango de edad expresado en número total y porcentaje.....	104
Figura 35: Episodios de coinfección (infección por al menos dos genotipos de AR) VPH en función de los rangos de edad expresados en número total y porcentaje.	105
Figura 36: Diagrama de cajas de la carga viral del genotipo 16, en función de la existencia o no, de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.....	121
Figura 37: Relación entre las lesiones de alto grado y número de parejas sexuales en las mujeres con VPH 16.....	125
Figura 38: Relación entre las lesiones de alto grado y antecedentes de aborto en las mujeres con VPH 16.....	126
Figura 39: Relación entre origen de la población y número de gestaciones.....	127
Figura 40: Relación entre origen de la población y edad de comienzo de las relaciones sexuales.....	128

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) representa una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en la población. Se han identificado más de 150 tipos de VPH que establecen infecciones productivas en el epitelio estratificado de la piel y mucosas de humanos, así como de una variedad de animales. La infección persistente con algunos tipos de VPH transmitidos sexualmente denominados de «alto riesgo» puede evolucionar y producir lesiones precancerosas y cáncer invasivo.

La asociación existente entre el VPH y el Cáncer de Cérvix (CC) ha sido claramente establecida (1-3); identificándose la infección persistente por tipos virales de alto riesgo (VPH-AR) como el factor más importante (4, 5). Sin embargo, existen otros factores relacionados con el huésped y el virus que modulan ésta asociación, siendo alguno de éstos la carga viral (CV) del VPH (6-15), la infección múltiple (16, 17), la coinfección con genotipos de AR (18), la integración del genoma viral en el ADN celular (6, 19, 20) o la variabilidad genética dentro un mismo genotipo viral (21-23).

Así el conocimiento de estos datos en el momento del diagnóstico de la infección contribuiría a ayudar a tomar decisiones clínico-terapéuticas adecuadas en cada situación dependiendo del riesgo de progresión a cáncer de la lesión.

Sin embargo, la interacción entre la célula humana y el virus es un fenómeno muy complejo y aún no completamente conocido. Aunque la prevalencia de la infección por VPH es muy alta en mujeres jóvenes; el sistema inmune es capaz de aclarar el virus en la mayoría de los casos. Sólo en algunas mujeres la infección se hace persistente y en un pequeño subgrupo de las mismas, las células del epitelio sufren cambios morfológicos que en algunos casos evolucionan a malignidad (24).

La carga viral del VPH ha sido interés de investigaciones científicas, con el propósito de dilucidar las características y la dinámica de la asociación con CC y de esta manera, contribuir en el establecimiento de medidas que permitan la disminución de su impacto en la población.

Estudios previos se han realizado para determinar la asociación entre la carga viral y la duración de la infección (25, 26); así como su relación con la severidad, progresión y desarrollo de CC (6, 7, 9). Los resultados de estos estudios han encontrado que la cantidad de ADN viral aumenta con la severidad de las lesiones de manera proporcional, siendo detectable incluso antes del desarrollo de lesiones cervicales (9, 11, 12, 26); sin embargo otros estudios no encontraron dicha asociación (14, 15).

Dentro de los tipos virales de alto riesgo, el 16 y el 18 son los genotipos que causan el 70% de los casos de CC y aún una mayor proporción de los cánceres asociados a VPH como el de vulva, vagina, pene, ano y orofaringe (27-29). El VPH 16 es el más frecuente en casos de CC (entre 50–70%) (30); por lo que, la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre la relación entre la carga viral del VPH y el CC, se ha basado en este tipo viral. La mayoría de estudios que han evaluado la carga viral de otros tipos de alto riesgo, no han encontrado resultados comparables a los obtenidos para VPH 16 (6-8, 31). Excepto Moberg et al., quienes encontraron que una carga viral alta de VPH 16, VPH 31 y VPH 18/45 incrementaba el riesgo de desarrollar Carcinoma In Situ (CIS) (32). De acuerdo a estos hallazgos, la carga viral del VPH provee información para determinar el riesgo de CC, pero esta asociación está sujeta a las diferencias tipo-específicas.

Otra de las variables que se han estudiado como moduladores de la asociación entre el VPH y el desarrollo de lesiones de alto grado es la variante viral detectada (21-23, 33-35). La mayoría de los estudios relacionados con las variantes de VPH se han centrado en las variantes del genotipo VPH 16 por ser este el genotipo más oncogénico. Se ha observado que las variantes no europeas de VPH 16, particularmente del linaje AA, tienen una mayor propensión a la persistencia (34), y tal vez por esta razón tienen una asociación

más fuerte con la enfermedad de alto grado (HSIL) (36, 37). Un reciente metaanálisis de los datos de distribución de linaje en todo el mundo del VPH 16 confirmó la asociación de ciertos linajes con un mayor riesgo de enfermedad cervical, pero también señaló cierta dependencia geográfica de estas asociaciones (23). Dentro del linaje variante europea, una sustitución de T350G en el gen E6 conduce a un residuo de aminoácido alterado (L83V) y se ha asociado con persistencia de VPH 16 (38) y enfermedad cervical (33). Aunque no en todos los casos se encontró esta asociación (39-41). Dos metaanálisis recientes demuestran que el codón E350 está asociado con la enfermedad cervical, pero es probable que esta asociación sea geográficamente dependiente (23, 42).

Siendo el genotipo VPH 16 el que más peso tiene sobre el desarrollo de CC, nuestro estudio se va a centrar en el análisis de la posible asociación de la carga viral y las variantes del genotipo VPH 16 y el desarrollo de HSIL.





JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

El Cáncer de Cérvix (CC) es una enfermedad con alto impacto a nivel mundial; si bien, un 85% de los casos ocurre en países en vías de desarrollo. Se estimaron cerca de 528.000 casos nuevos y 266.000 muertes en el 2012 (27).

La infección persistente por VPH de un genotipo de alto riesgo oncogénico (4), así como la coinfección por genotipos de alto riesgo, favorece la progresión neoplásica (16-18). El CC es el segundo cáncer femenino más común en mujeres de 15 a 44 años tanto en EEUU (43-45) como en Europa (46).

La carga viral del VPH se relaciona con la persistencia de la infección, y el desarrollo de CC, por lo que ha sido interés de numerosas investigaciones científicas. Sin embargo, a pesar de esta asociación, todavía no se ha definido un límite de carga de ADN del VPH clínicamente útil. La detección de ADN de VPH de alto riesgo oncogénico en las células cervicales está ganando cada vez más aceptación en el cribado primario del cáncer cervical (47).

Las diversas técnicas validadas para la detección de VPH no solo han demostrado ser más precisas que la citología de Papanicolaou para revelar lesiones precancerosas cervicales preexistentes (48, 49), sino que también tiene un valor pronóstico superior, con respecto al riesgo subsiguiente de lesiones en mujeres sin lesiones en la citología. Por lo tanto, es lógico pensar que la magnitud del valor predictivo de la prueba del VPH, tanto transversal como prospectivamente, puede aumentarse teniendo en cuenta las mediciones auxiliares de la carga viral en muestras cervicales.

Una alta carga viral puede indicar una infección productiva del VPH, que es común en las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado. La replicación viral productiva también puede ser el resultado de una infección primaria en la que el control inmune del huésped aún no se ha desarrollado.

En ausencia de anomalías citológicas, una alta carga de VPH puede explicarse de diferentes formas. En primer lugar puede ser indicativa de una

infección persistente y por lo tanto un aumento de la propensión a la transformación en una lesión displásica. En segundo término, puede deberse a la mayor proporción de células displásicas en relación a las células normales que se coexfolian en el momento de la toma de muestra, revelando así una lesión de alto grado. Por lo tanto, independientemente del motivo, existe plausibilidad para la expectativa de que la medición de la carga de ADN del VPH en las muestras cervicales puede estar asociada con resultados clínicos y, por lo tanto, servir como biomarcador adicional en la carcinogénesis cervical.

Las variantes moleculares del VPH son definidas como aquellos aislados del mismo genotipo que presentan diferencia menor del 2% en la secuencia de nucleótidos del gen viral L1, comparados con el aislado viral referencia (50, 51). Para el VPH 16 se han identificado entre 20 y 240 variantes moleculares (52, 53). Las variantes de VPH 16 han sido clasificadas como Europeas (E), Asiáticas (As), Asiático-americanas (AA), Norteamericana (NA), Africana-1 (Af1) y Africana-2 (Af2), basada en su distribución geográfica, que concuerda con la de los grupos étnicos de la población (54-56). En varias poblaciones se ha mostrado que la infección con variantes no europeas (Af1, Af2, AA, As, NA) del VPH 16 se encuentra asociada con un aumento de dos a nueve veces en el riesgo de CC y lesiones precursoras de alto grado (34, 36). Sin embargo, en poblaciones con bajo nivel de mezcla étnica, como las de Europa, esta asociación no se observa (57). Adicionalmente, la mutación del gen E6 T350G (mutación no sinónima que cambia el aminoácido 83 leucina a valina), que aparece tanto en variantes europeas como no europeas, se asoció con un aumento en el riesgo para el desarrollo de lesiones (33, 38).

Los hallazgos encontrados, tienen implicaciones importantes considerándose que la carga viral y la variante, son factores del virus, que podrían modificar la historia natural del CC. Por lo tanto, el presente proyecto resulta relevante, puesto que permitirá caracterizar esta asociación en nuestras pacientes con infección por VPH 16.

También se aportarán datos relevantes para la caracterización del comportamiento del VPH, la prevalencia, la distribución tipo-específica y la relación con factores de riesgo observados en nuestra cohorte de pacientes.

En la actualidad existen tres vacunas autorizadas frente al VPH que proporcionan protección frente a diferentes genotipos virales. La vacuna nonavalente, recientemente comercializada, y que proporciona protección frente a VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, se estima que tiene el potencial de prevenir cerca del 90 % de los cánceres de cuello cérvix, vulva, vagina y ano, y el 80 % de las lesiones precancerosas (58).

Por último, en base a estos datos del potencial de prevención de desarrollo de lesiones de alto grado de las vacunas comercializadas, pretendemos determinar la prevalencia de genotipos virales de alto riesgo en función de la cobertura de las vacunas existentes, y su asociación e impacto en el riesgo de lesiones de alto grado de nuestra cohorte de pacientes.

Estos resultados ampliarán el conocimiento y contribuirán a la mejora de los programas de promoción y prevención que contemplen la detección y tipificación de VPH, la cuantificación de la carga viral y la variante viral entre otros. Finalmente con lo anterior se logrará la identificación temprana de mujeres en riesgo de desarrollar CC, buscando con esto, contribuir en la reducción de la incidencia y mortalidad debida al CC.



MARCO TEÓRICO

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Reseña histórica

La hipótesis de la relación entre la infección viral y la génesis de determinados procesos oncogénicos se demostró por primera vez en el ser humano cuando en 1964 Epstein y Barr observaron partículas virales pertenecientes a la familia de herpesvirus en células linfoblásticas de linfoma de Burkitt.

El hecho clave que llevó a los investigadores a relacionar la infección por VPH transmitida sexualmente con el cáncer cervical fue las mayores tasas de cáncer cervical registradas en prostitutas en comparación con las tasas registradas en monjas; hecho que reflejaba la existencia de un agente transmisible por vía sexual que estuviera implicado en este tipo de cáncer.

En la década de los setenta y en contra de las teorías científicas que se imponían, el Dr. Harald zur Hausen se atrevió a postular que el VPH tenía un papel protagónico en el desarrollo del cáncer uterino, principalmente en mujeres con actividad sexual frecuente. En 1983 consiguió detectar el ADN de los tipos virales de VPH 16 y 18 en las biopsias de las pacientes con CC (resultados que logró reproducir a partir de procesos de clonación).

Este hallazgo, que le dio un nuevo rumbo a la forma de estudiar causas y tratamientos de las enfermedades oncológicas, lo hizo merecedor del Nobel de Medicina en el 2008.

Sus trabajos científicos junto con los de la epidemióloga colombiana Nubia Muñoz llevaron al desarrollo de una vacuna contra dicho virus.

3.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Debido a que las proteínas de la cápside viral son antigénicamente muy similares entre sí, los VPH no se clasifican por serotipos sino que atendiendo a las características de su ADN se clasifican según genotipos.

Es un microorganismo con un genoma de tamaño limitado que no codifica enzimas limitantes de la replicación viral y por tanto depende de la maquinaria genética de la célula huésped y de su replicación para reproducirse. Tiene preferencia por el epitelio inmaduro del cérvix (células metaplásicas y células del estrato basal o de reserva) que posee actividad mitótica. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres jóvenes, en la zona de transformación cervical y una vez infectadas, con su proliferación favorecen la progresión e infección del virus (59).

Los diferentes tipos de VPH están asociados con la infección en determinados sitios epiteliales. A un nivel evolutivo, los VPH se dividen en varios grupos o géneros distintos y las lesiones que causan tienen características diferentes.

Los VPH están contenidos dentro de cinco grupos evolutivos. Los tipos de VPH que infectan el cuello uterino proceden del grupo Alfa que contiene más de 60 genotipos. Los tipos de VPH de los grupos Beta, Gamma, Mu y Nu afectan principalmente a los sitios cutáneos (Figura 1).

Los VPH Alfa se pueden subdividir en tres categorías (alto riesgo, bajo riesgo y cutáneo), dependiendo de su prevalencia en la población general y de la frecuencia con la que causan cáncer cervical. Los tipos de alto riesgo provienen de los grupos Alfa 5, 6, 7, 9 y 11 (59) (Figura 2).

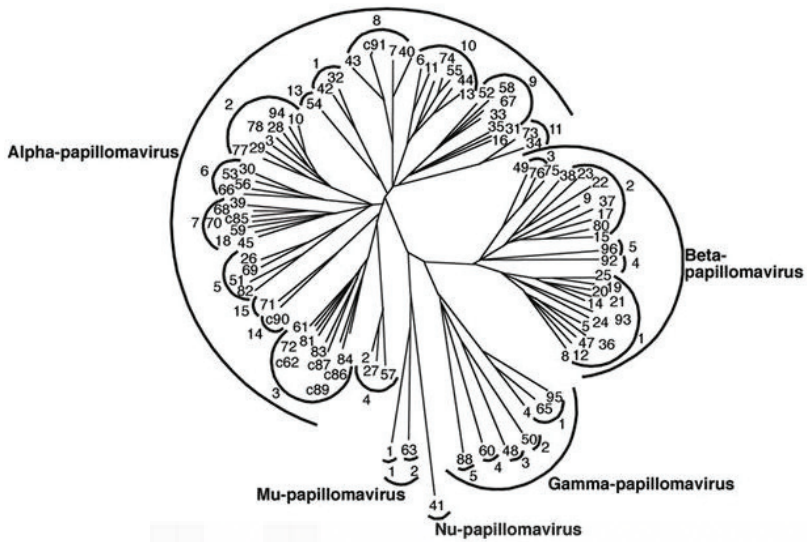


Figura 1: Clasificación filogenética de VPH

Fuente: Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41 (59).

Genus + Species	Type Species	SCC Cervix	Adeno Cervix	Category
Alpha 1	HPV32			low risk
Alpha 2	HPV42			low risk
	HPV3			cutaneous
	HPV10			cutaneous
	HPV28			cutaneous
	HPV29			cutaneous
	HPV77			cutaneous
	HPV78			cutaneous
	HPV94			cutaneous
Alpha 3	HPV61			low risk
	C62			
	HPV72			low risk
	HPV81	0.04%		low risk
	HPV83	0.04%		low risk
	HPV84			low risk
	C86			
	C87			
	C89			
Alpha 4	HPV2			cutaneous
	HPV27			cutaneous
	HPV57			cutaneous
Alpha 5	HPV26	0.22%		high risk
	HPV51	0.75%	0.54%	high risk
	HPV69			
	HPV82	0.26%		high risk
Alpha 6	HPV30			
	HPV53	0.04%		high risk
	HPV56	1.09%		high risk
	HPV66	0.19%		high risk
Alpha 7	HPV18	11.27%	37.30%	high risk
	HPV45	5.21%	5.95%	high risk
	HPV59	1.05%	2.16%	high risk
	HPV39	0.82%	0.54%	high risk
	HPV68	0.37%		high risk
	HPV70			
	C85			
Alpha 8	HPV7			cutaneous (mucosal)
	HPV40			cutaneous (mucosal)
	HPV43			cutaneous (mucosal)
	C91			
Alpha 9	HPV16	54.38%	41.62%	high risk
	HPV31	3.82%	1.08%	high risk
	HPV33	2.06%	0.54%	high risk
	HPV35	1.27%	1.08%	high risk
	HPV52	2.25%		high risk
	HPV58	1.72%	0.54%	high risk
	HPV67			
Alpha 10	HPV6	0.07%		low risk
	HPV11	0.07%		low risk
	HPV13			low risk
	HPV44			low risk
	HPV55	0.04%		low risk
	HPV74			
Alpha 11	HPV34			high risk
	HPV73	0.49%		high risk
Alpha 12				
Alpha 13	HPV54			low risk
Alpha 14	C90			low risk
Alpha 15	HPV71			low risk

Figura 2: Clasificación de los diferentes tipos VPH, tropismo y CC.

Fuente: Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.(59)

El genoma de los VPH contiene una doble hebra de ADN de 7.800 a 7.900 pares de bases, el virión mide 45-55 nm y tiene una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros. El genoma ha sido dividido en tres regiones principales: una región reguladora no codificante, la cual se denomina región larga de control (LCR, long control region); una región que incluye genes de expresión temprana (E1 a E8), que dan origen a proteínas no estructurales y una región que contiene los genes de expresión tardía (L1 y L2), que dan origen a dos proteínas estructurales (60) (Figura 3).

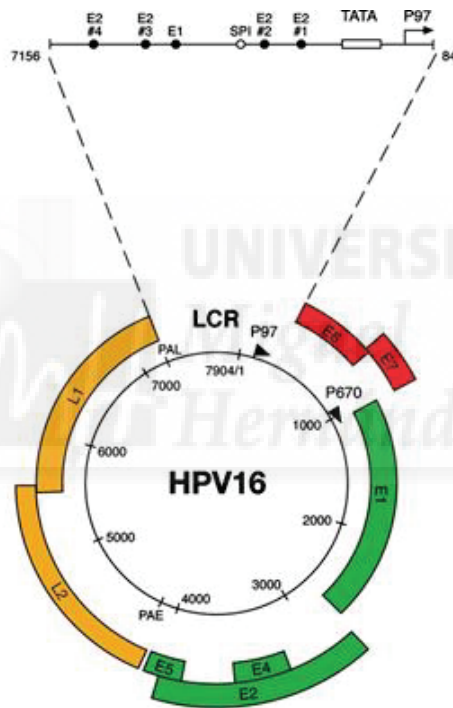


Figura 3: Estructura genómica VPH

Fuente: Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41 (59).

El ciclo replicativo de papilomavirus está ligado al estado de diferenciación de la célula epitelial. El establecimiento del virus en el tejido requiere de la infección de los queratinocitos basales frecuentemente a través de lesiones o

abrasiones en el tejido, lo cual sugiere que es necesaria la presencia de células con actividad mitótica. Las funciones tardías de los papilomavirus, tales como la síntesis de ADN viral, de las proteínas de la cápside, así como el ensamble de los viriones ocurren exclusivamente en queratinocitos diferenciados. La regulación transcripcional de los genes tardíos es dirigida por un promotor específico que solo responde en queratinocitos diferenciados. Se asume que el virus no es citolítico y la liberación de las partículas virales no ocurre antes de la capa cornificada del epitelio queratinizado (59) (Figura 4).

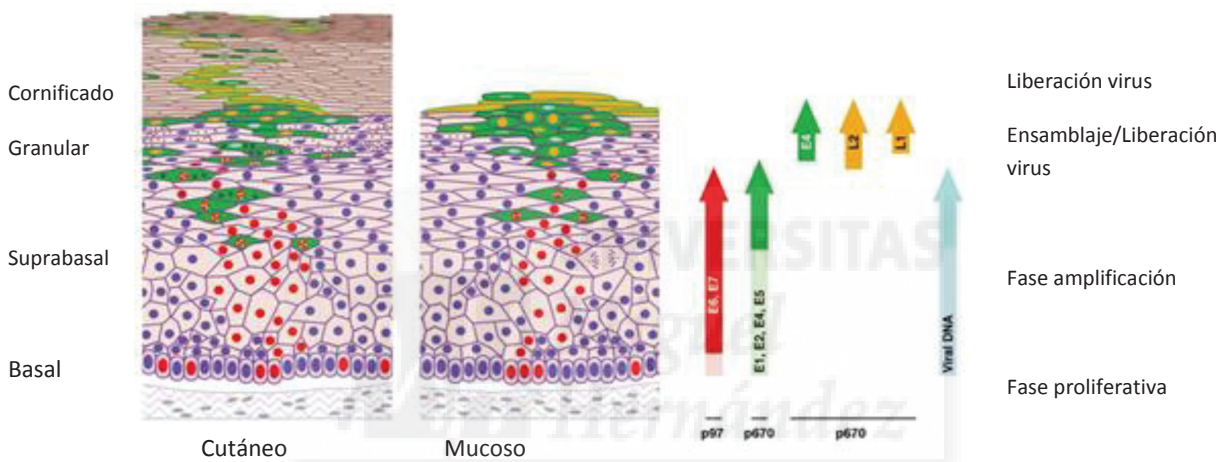


Figura 4: Ciclo replicativo del VPH y su relación con la invasión tisular

Fuente: Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41 (59).

La LCR contiene elementos de respuesta para factores de transcripción celulares, tales como AP1, SP1, Oct1, etcétera, así como para las proteínas virales E1 y E2, que controlan la replicación y la expresión del genoma viral. Particularmente, se ha determinado que el VPH 16 posee elementos conocidos como PE (o p97) y PL (o p670), que son promotores que regulan la expresión de genes tempranos y tardíos, respectivamente, así como la presencia de ARNm con modificaciones de corte y empalme (splicing) durante la diferenciación de las células epiteliales (59).

Los genes E codifican las proteínas reguladoras (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8) necesarias para los procesos de replicación, transcripción y citotransformación.

Las proteínas E1 y E2 juegan un papel importante en la replicación del genoma viral, activan la transcripción de E6 y E7 y por lo tanto la proliferación celular, además contribuye a la partición del genoma viral en las células hijas (favoreciendo la segregación del genoma viral durante la división celular ligándolo a cromosomas mitóticos). En condiciones normales, la proteína E2, por medio de la región reguladora LCR, mantiene silenciados los genes E6 y E7.

El proceso de bloqueo de la proteína p53 (p53) y de la proteína del retinoblastoma (Rb) por los genes virales E6 y E7, conduce a la inmortalización celular. La célula no podrá ni eliminar el ADN viral ni corregir los errores intrínsecos al ADN celular, de modo que la célula acumula alteraciones genéticas y adquiere un fenotipo neoplásico.

Los genes L codifican las proteínas mayores de la cápside viral (L1 y L2) que ensamblan nuevos viriones en las capas cutáneas superiores. La proteína está implicada en la invasión del virus a las células epiteliales (59). La unión entre estas proteínas tiene consecuencias importantes para el empaquetamiento de ADN viral (60). En la [Tabla 1](#) podemos ver una relación de la actividad de las diferentes proteínas codificadas por los genes del VPH.

Tabla 1: Tipos de proteínas de los VPH

Tipo de proteína	Nombre	Funciones o actividades asociadas
NO ESTRUCTURALES	E1	Tiene funciones de helicasa. Es esencial para la replicación y la transcripción
	E2	Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidación
	E4	Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones
	E5	Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular generando aneuploidia e inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmunitaria
	E6	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo la apoptosis; interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa
	E7	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRb; incrementa la actividad de cinasas dependientes de ciclinas; afecta la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histona desacetilasa; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria
	ESTRUCTURALES	L1
L2		Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones
La denominación de E o L se refiere a temprana (early) o tardía (late), de acuerdo con su síntesis o funciones durante el ciclo replicativo. Algunos papilomavirus tienen marcos de lectura para las proteínas E3 y E8, aunque aún se desconocen sus funciones Fuente: (43, 60, 61)		

Se ha asociado selectivamente a la proteína E6 y su efecto sobre p53 en la discriminación de virus de alto riesgo con los de bajo riesgo, ya que los primeros poseen una proteína E6 muy activa contra p53, mientras que la E6 de los virus de bajo riesgo tiene una menor afinidad por p53 y estos casi no tienen efecto sobre ella (61, 62).

Otra importante característica, usualmente asociada a los virus de alto riesgo, es que el genoma viral se integra al genoma de la célula, mientras que en los virus de bajo riesgo el genoma permanece de manera episomal. Este proceso de integración se ha asociado con el paso de una lesión de alto grado a cáncer invasivo. Se ha reportado que en más de la mitad de los casos de cáncer con infección VPH 16 y la mayoría en los que se detecta infección por VPH 18 el genoma viral está integrado en la célula huésped (61, 62).

La transcripción de L1 y L2 está regulada por factores reguladores de transcripción que se producen únicamente en aquellas células epiteliales más diferenciadas de la capa superficial del cérvix; esto explica porque la producción de viriones y el efecto citopático son más pronunciados en las lesiones histológicamente de más bajo grado.

La secuencia más utilizada para la clasificación de los VPH es la del gen L1, que es altamente conservado, aunque se han utilizado también otros genes como E6 y E7. Se establece un nuevo tipo de VPH cuando las secuencias del gen L1 varían en más de 10 % respecto a tipos virales ya conocidos. Si la diferencia es de 2 a 10 %, se les clasifica como subtipos virales y si la diferencia es menor a 2 % se definen como variantes virales (63).

La vía principal de transmisión del virus es mediante contacto piel-piel o mucosa-mucosa, no necesariamente por penetración sexual. Generalmente se transmiten varios tipos virales, resultando un porcentaje de coinfección cercano al 20-30%, proporción que es incluso mayor en pacientes con lesiones de alto grado (30, 64, 65).

La replicación viral ocurre en las células epiteliales, por lo que la ausencia de viremia no nos permite detectar estadios preclínicos de la infección por VPH, y así mismo evade la activación del sistema inmune, lo cual se debe tener en

consideración en el momento de establecer estrategias de cribado donde el principal objetivo sea detectar mujeres en riesgo de padecer la enfermedad (30).

3.3. Epidemiología

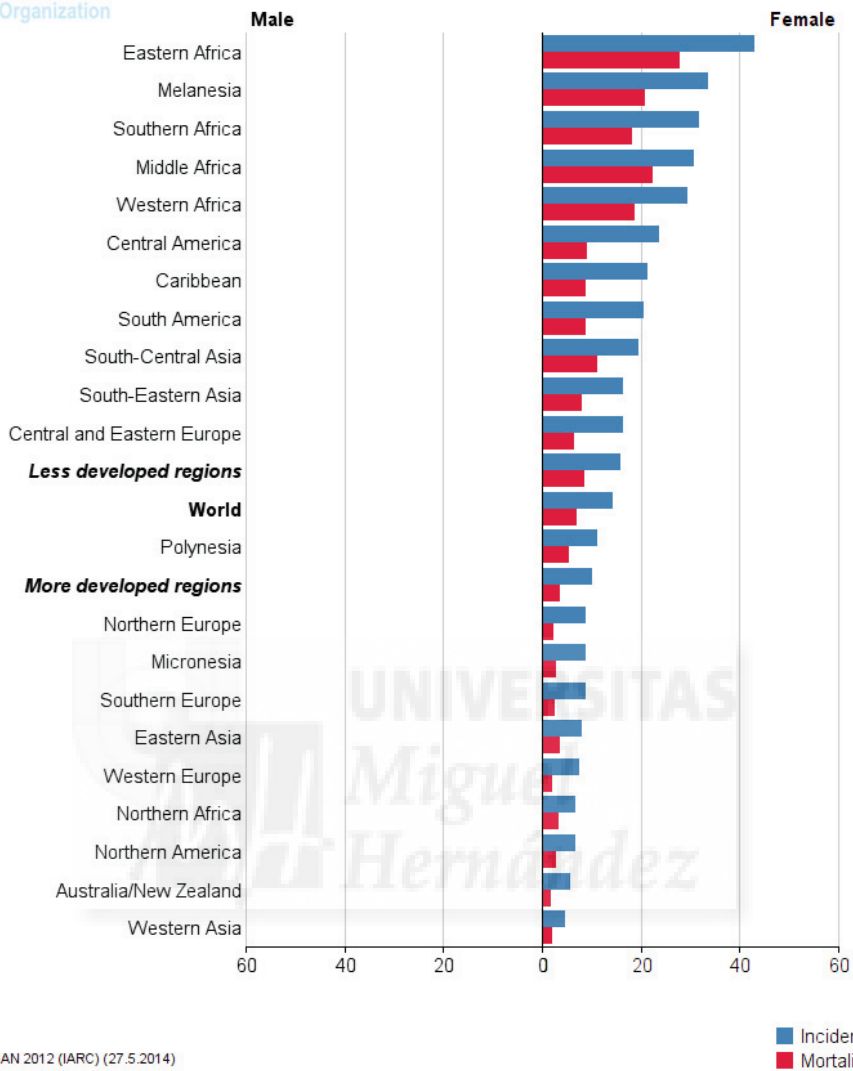
El Cáncer de Cérvix (CC) representa el tercer cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial, después del cáncer de mama y el cáncer colorrectal. Según el último informe de The International Agency for Research on Cancer (IARC), se estimaron cerca de 528.000 casos nuevos en el 2012, teniendo una tasa de incidencia ajustada por edad de 14 por 100.000 mujeres/año. Cerca del 85% del impacto a nivel mundial, ocurre en países en vías de desarrollo, principalmente de África, sur y centro de Asia, y Sudamérica. En contraste, en países desarrollados, se han reportado incidencias menores a 10 por cada 100.000 mujeres/año. Se ha identificado que el pico de detección de neoplasia intraepitelial cervical grado 3 ocurre entorno a los 30 años; mientras que el pico de CC se evidencia a los 40 años (43, 66).

El CC fue responsable de 266.000 muertes a nivel mundial durante el 2012 (tasa ajustada: 6,8 por 100.000 mujeres/año), de las cuales cerca del 87% ocurrieron en países en desarrollo de África, Asia, América Latina y el Caribe. Se estima una tasa de mortalidad de 10 a 25 mujeres por cada 100.000 mujeres/año en países en vías de desarrollo, mientras que en países desarrollados (Asia occidental, Europa occidental y Australia/Nueva Zelanda) se estima una tasa de mortalidad de 2 a 8 por cada 100.000 mujeres/año (43) (Figura 5).

En España se diagnosticaron unos 2.511 casos en 2012, lo que representa el 3,3% de los tumores femeninos, por detrás de los tumores de mama, colorrectales, estómago, cuerpo de útero, ovario y hematológicos. Con una incidencia ajustada de 9,1 por cada 100.000 mujeres al año, Se estima una mortalidad ajustada de 2,7 por cada 100.000 mujeres al año (45) (Figura 6).

El Virus de Papiloma Humano (VPH) está asociado a un 99,7% de casos de CC, principalmente los genotipos de alto riesgo (VPH-AR) (4). Las más altas prevalencias de infección por el VPH se registran en África (94,2%) y la más baja en Oceanía (88,3%) (68). Dificultades en el acceso a los servicios de cribado, no adherencia a los programas de prevención y promoción, son factores sociales asociados a un bajo estrato socioeconómico y a menores niveles de educación, que suelen ser más frecuentes en regiones donde la prevalencia de VPH es mayor (30).

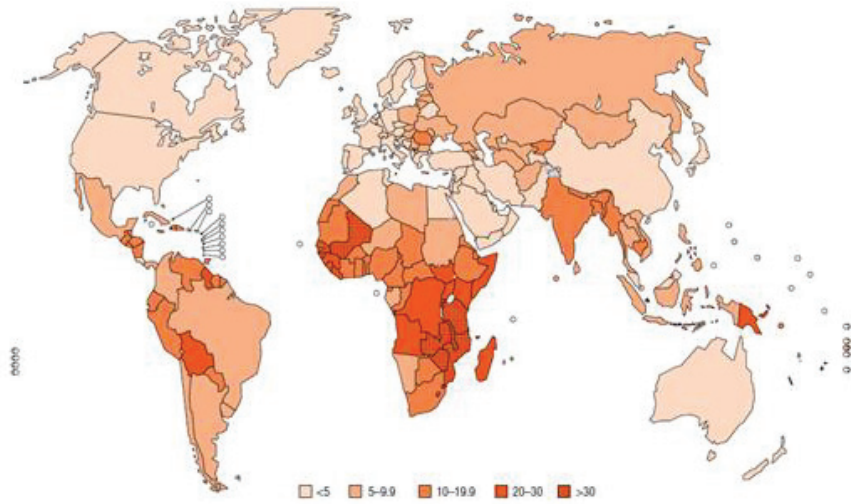




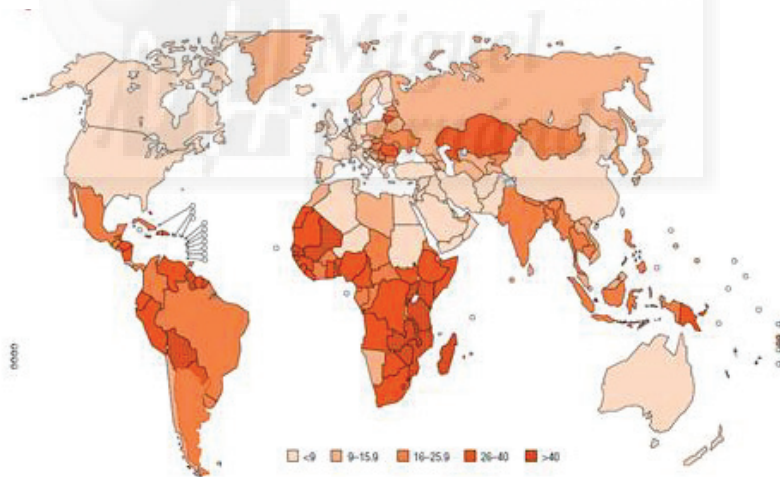
GLOBOCAN 2012 (IARC) (27.5.2014)

Figura 5: Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix a nivel mundial, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012.

Mortalidad estimada Cáncer cérvix . 2012



Incidencia estimada Cáncer cérvix . 2012



Fuente: Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 136(5): p. E359-86 (43).

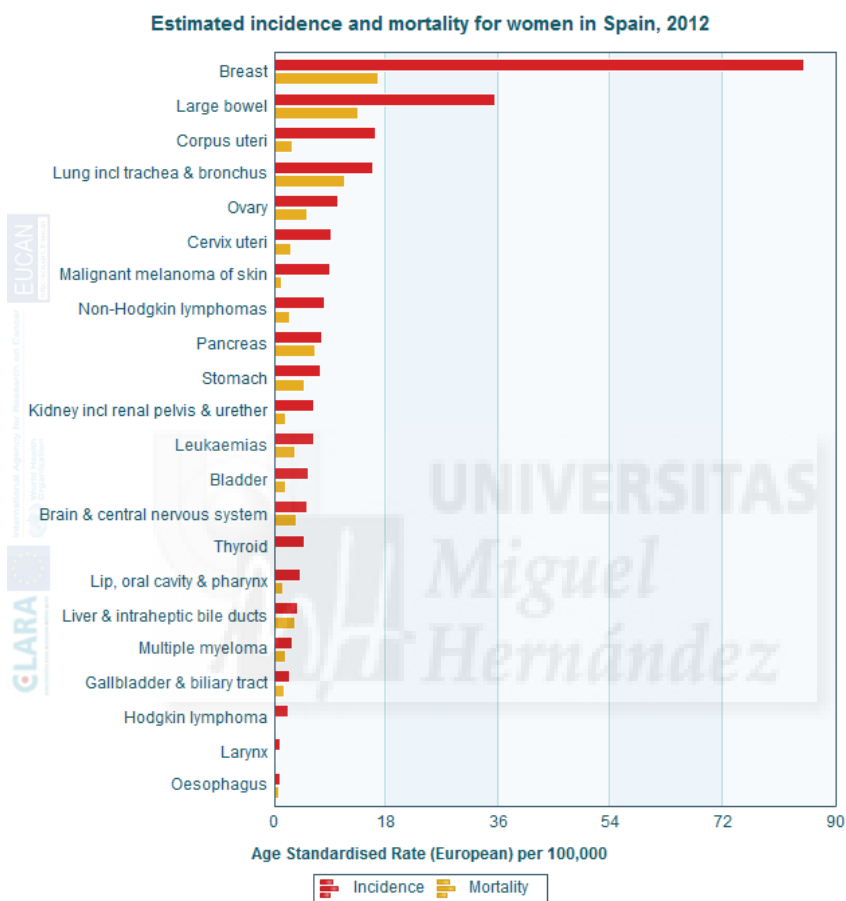
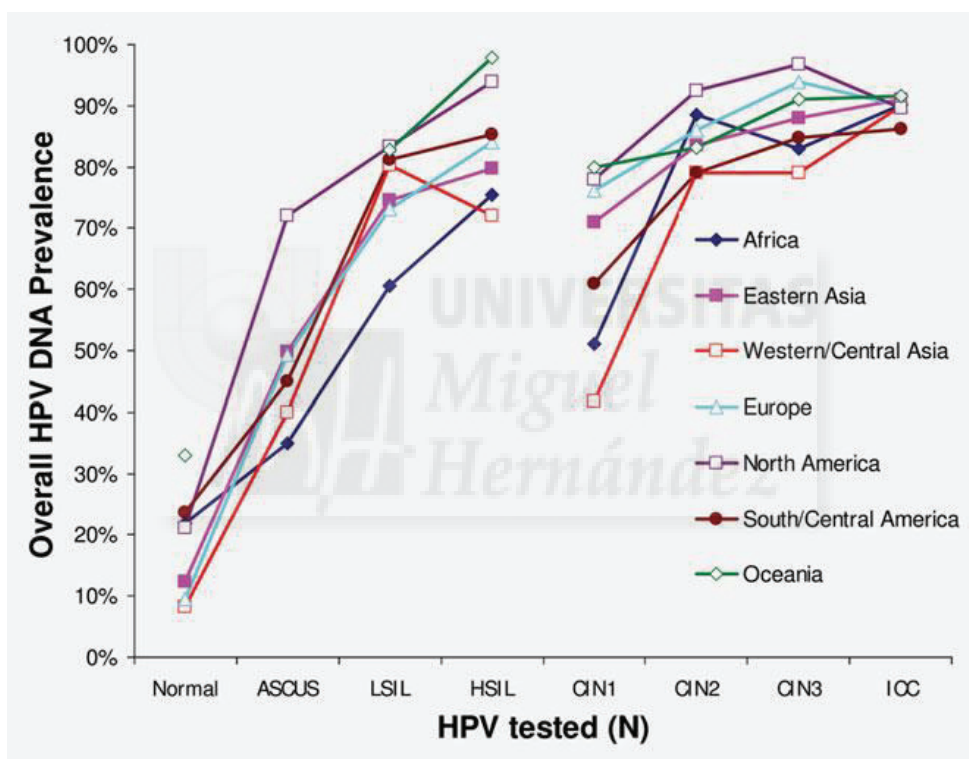


Figura 6: Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix en España, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012.

Fuente: World Health Organization. International Agency for Research of Cancer. EUCAN. 2012. Disponible en: <http://eco.iarc.fr/eucan/> (45)

Se ha encontrado, que de acuerdo al grado de severidad de las lesiones cervicales, la prevalencia en general de VPH se incrementa de un 12% en mujeres con citología normal, a un 89 % en mujeres con CC. En mujeres con citología normal, la prevalencia de VPH varía de un 8-9% en Asia central/occidental y Europa, a más de un 20% en África, América y Oceanía. Entre los diferentes grados de severidad de las lesiones, se encuentran diferencias en las prevalencias de VPH por región (67) (Figura 7).

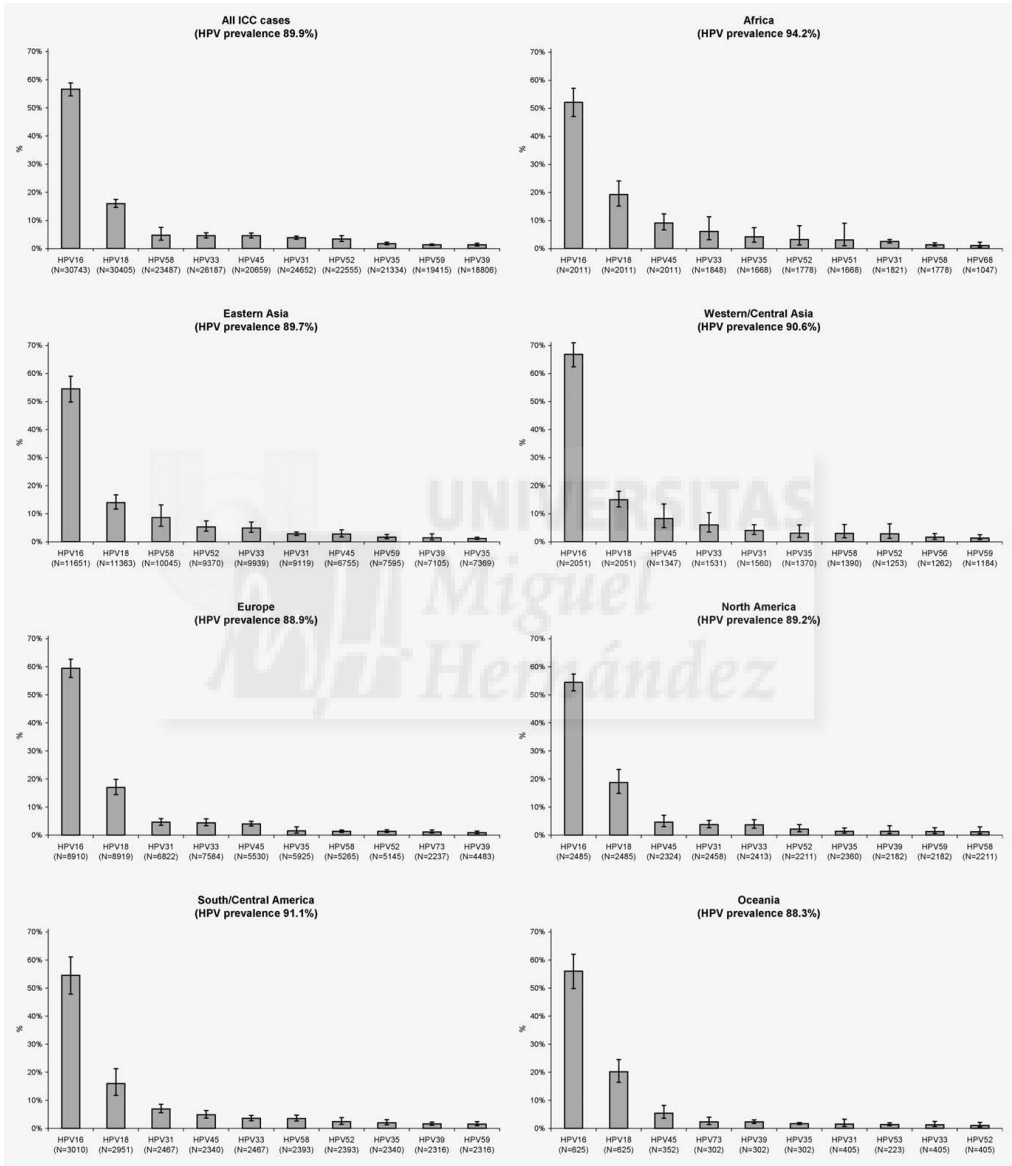


Abreviaturas: VPH: human papillomavirus; ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; LEI-BG: low-grade squamous intraepithelial lesion; LEIAG: high-grade squamous intraepithelial lesion; CIN: cervical intraepithelial neoplasia grade; ICC: invasive cervical cancer.

Figura 7: Prevalencia de VPH por severidad de la lesión cervical y región. 2012.

Fuente: Guan P, et al. Human papillomavirus types in 115,789 VPH -positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. International journal of cancer Journal international du cancer. 2012 Nov 15; 131(10):2349-59. (67)

Los tipos virales más frecuentes son VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58. Sin embargo, se encuentran diferencias de prevalencias tipo específicas de acuerdo a la región analizada. VPH 16 y 18 son los dos tipos más prevalentes a nivel mundial (68, 69) (Figura 8).



Abreviaturas: ICC: invasive cervical cancer; VPH: human papillomavirus.

Figura 8: Los 10 tipos de VPH más frecuentes en cáncer de cérvix por región (1990 - 2010)

Fuente: Li, N., et al., Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 128(4): p. 927-35 (68).

También se encuentran diferencias de prevalencia tipo específicas de acuerdo a la región analizada (Figura 9) en las mujeres con infección cervical sin alteración histopatológica. Esta prevalencia, que es mayor en las mujeres menores de 35 años de edad, disminuye en las mujeres de edad avanzada. Se estima que alrededor de 291 millones de mujeres en todo el mundo son portadoras de ADN del VPH, de las cuales el 32% están infectadas por los genotipos VPH 16 o VPH 18, o por ambos. Los tipos de VPH más comúnmente detectados son similares a los descritos más frecuentemente en casos pre-neoplásicos y de cáncer, aunque la contribución relativa de VPH 16 y VPH 18 es sustancialmente menor en mujeres sin alteración citológica (70).

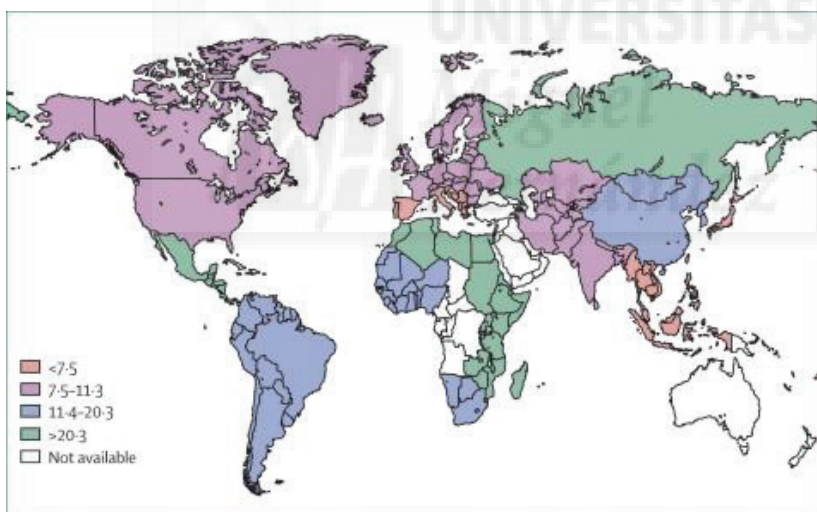


Figura 9: Prevalencia de infección por VPH por regiones a nivel mundial

Fuente: Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. De Sanjosé, Silvia et al. *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 7, Issue 7, 453 – 459 (70).

En España, la prevalencia de infección por el VPH en mujeres sexualmente activas en la población general alcanza el 14% aunque puede variar según el

grupo de edad estudiado y los factores de riesgo asociados. A partir de los 40 años, la cifra es más baja, aproximadamente entre el 5-6% (65). En la [Figura 10](#) se muestran los porcentajes de prevalencia de los genotipos de alto riesgo en mujeres españolas con diferente grado de lesión histopatológica (71).

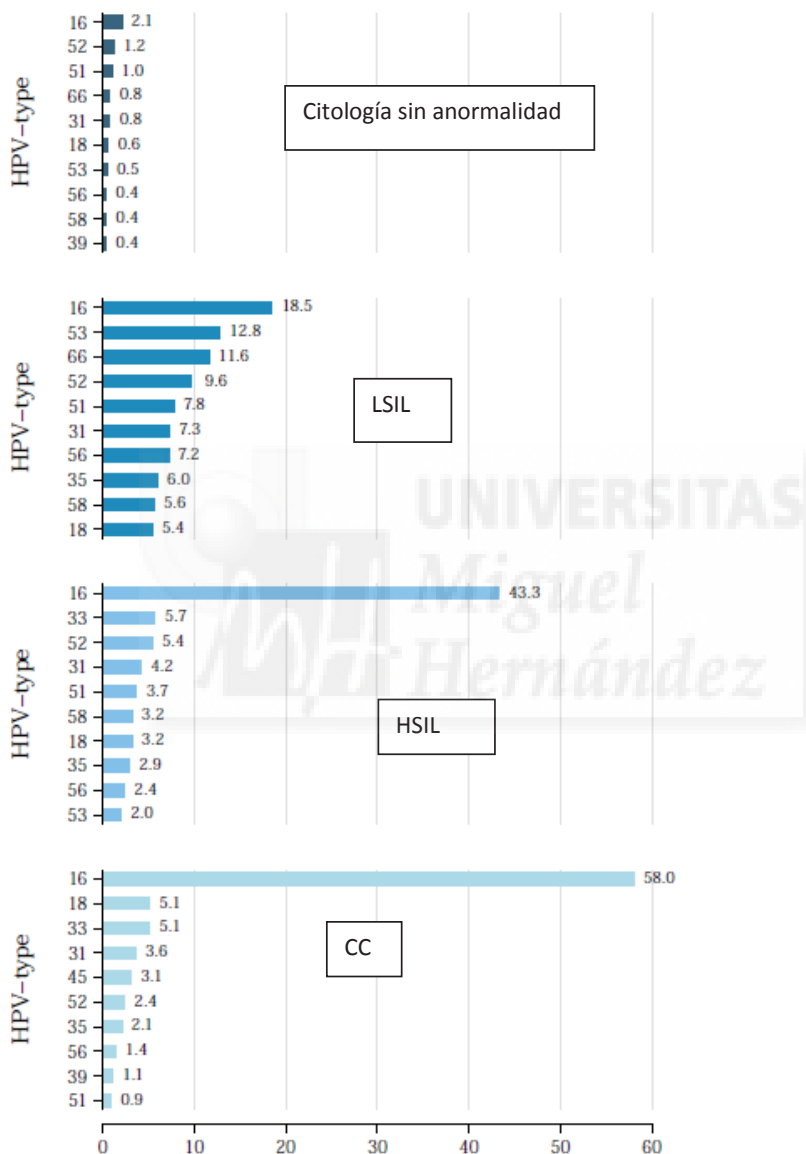


Figura 10: Prevalencia VPH AR en mujeres españolas con y sin lesión cervical

Abreviaturas: LSIL (lesión intraepitelial de bajo grado), HSIL (lesión intraepitelial de alto grado), CC (cáncer cérvix)

Fuente: ICO Information Centre on VPH and Cancer. Spain Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2016 (71)

El CC se considera un problema importante en el campo de la salud pública, y es reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una prioridad, al igual que la infección por el VPH. El CC produce una reducción en los años de esperanza de vida, estimada en 29 años, considerablemente mayor que para las mujeres que mueren por cáncer de mama. Esta situación provoca una importante y evitable carga para las familias jóvenes y tiene importantes costes sociales. La realidad biológica es que la exposición a la infección y reinfección frecuente con los tipos de VPH mucosotrópicos en jóvenes pueden tener consecuencias graves en la salud a largo plazo (3).

3.4. Factores de riesgo

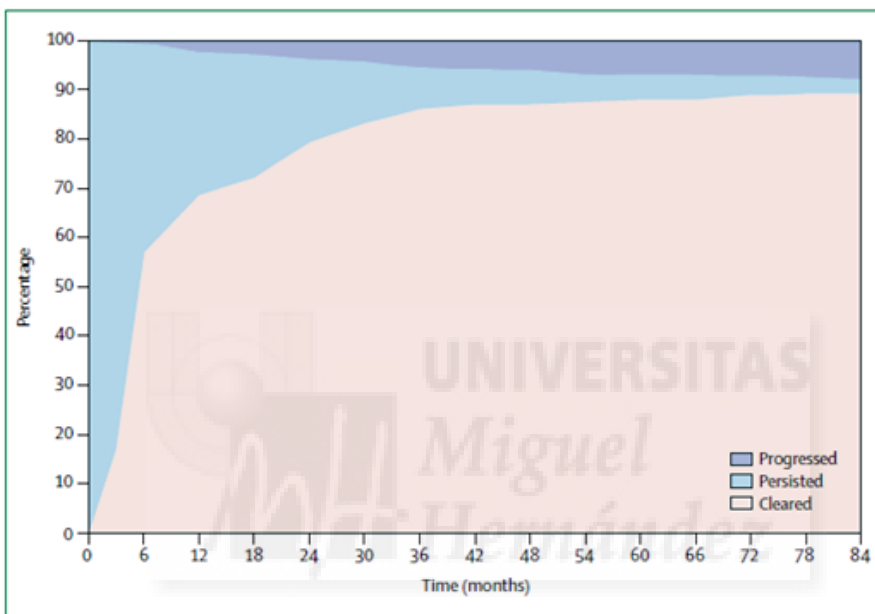
Para el desarrollo de CC, se ha identificado que el factor central es la infección persistente por tipos de alto riesgo del VPH. Se entiende como persistente una infección de VPH, cuando es posible detectar el mismo tipo viral en dos o más ocasiones, en un tiempo determinado. No existe consenso sobre cuál debe ser la duración de este período, hay autores que entienden que son necesarios hasta dos años de persistencia (72).

Sin embargo, se requieren otros factores tanto a nivel del virus como del huésped, que facilitan la infección y/o persistencia del VPH, la regresión o progresión de las lesiones (30).

Más del 70% de las mujeres sexualmente activas adquieren una infección por VPH. La prevalencia de infección cervical por VPH alcanza su punto álgido en edades jóvenes (<25 años), reflejando la adquisición sexual y el aclaramiento típicamente rápido de la infección. La mayoría de las infecciones son transitorias y son eliminadas mediante inmunidad celular entre 1-2 años después de la exposición al virus (73-75).

En algunas poblaciones, la prevalencia del VPH demuestra un segundo pico en las mujeres mayores de 55 años (73).

Aproximadamente un 25% de las mujeres infectadas progresan a lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL); de estas entre el 20 y el 40% evolucionan a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Esto indica, que del total de mujeres que en alguna ocasión adquieren VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una HSIL, mientras que en cerca del 90% de las mujeres infectadas se producirá el aclaramiento viral, por lo que no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses (76) (Figura 11).



Fuente: Schiffman, M., et al., Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet, 2007. 370(9590): p. 890-907 (76).

Figura 11: Persistencia viral de VPH

Las mujeres con alguna inmunodeficiencia, heredada o inducida farmacológicamente, tienen mayor riesgo de presentar persistencia de la infección, y progresión a CC (77-79). El tiempo estimado desde la infección inicial hasta la carcinogénesis es de 10 a 20 años (30).

Otros factores relacionados con el huésped asociados al riesgo de infección o a la susceptibilidad y progresión de las lesiones son aquellos relacionados con el comportamiento sexual tanto de la mujer como de su pareja (inicio temprano de la actividad sexual, múltiples compañeros sexuales, exposición a otras

enfermedades de transmisión sexual, uso de preservativo), la paridad (más de 4 partos, menor edad al primer parto), el estado inmune (infección por VIH y tratamiento inmunosupresor) y la exposición a mutágenos y factores hormonales (tabaquismo, y uso de anticonceptivos orales) (72, 77, 80-82).

El tabaco aumenta el riesgo de progresión de la infección entre 2-4 veces, ya que tiene un efecto carcinogénico directo y además produce alteración de la inmunidad local en el cuello uterino.

El consumo de anticonceptivos orales durante más de 10 años se asoció con un aumento del riesgo con respecto a las mujeres que nunca han usado anticonceptivos orales, ya que se postula que los estrógenos y progestágenos podrían potenciar la expresión de genes del VPH en el cérvix a través de mecanismos mediados por receptores de progesterona y elementos de respuesta hormonal en el genoma viral.

La alta paridad se ha relacionado con un aumento de las lesiones de alto grado, ya que el mantenimiento durante muchos años de la zona de transformación en el exocérvix, puede facilitar la exposición al VPH, aunque podrían también estar implicados factores hormonales

También se ha reportado la existencia de susceptibilidad en mujeres coinfectadas con *Chlamydia trachomatis* y/o Virus Herpes Simplex tipo 2 (VHS-2). Posiblemente la razón se deba a la respuesta inflamatoria asociada a la infección que da lugar a la generación de radicales libres y el desarrollo de inestabilidad genética (83).

Por otro lado se han descrito factores de riesgo sociales como estrato socioeconómico bajo y bajo nivel educativo y cultural, sin lograr establecer con claridad si implica mayor exposición al virus o dificultades para acceder a los servicios (84).

3.5. Histopatología

El canal endocervical está constituido en su parte proximal por epitelio columnar y en su parte distal por epitelio escamoso. La unión escamo-columnar es conocida como la zona de transición, la cual suele ser el origen de la mayoría de las lesiones displásicas, y carcinomatosas. Esta zona cambia dependiendo del estado hormonal de la mujer, ya que durante la preadolescencia y en la postmenopausia, ésta se hace difícil de visualizar al examen ginecológico. La infección por VPH induce el cambio de la arquitectura celular hacia la displasia a nivel de la zona de transición y áreas adyacentes.

Durante la edad reproductiva, el ambiente ácido predominante en la vagina, lleva a la destrucción de las células columnares e induce una metaplasia escamosa en la zona de transición, clínicamente considerada benigna. La zona de transformación cervical es un anillo de metaplasia escamosa activa donde el epitelio escamoso estratificado del ectocérvix socava progresivamente y reemplaza al epitelio glandular del endocérvix. Por razones poco claras, el tejido metaplásico es especialmente susceptible al potencial carcinogénico de las infecciones persistentes por VPH (30, 76, 85).

En las mujeres, durante la pubertad y el embarazo, se agranda la zona de transformación en el exocérvix. La exposición al VPH en esos momentos puede facilitar la infección y puede explicar las asociaciones del CC de células escamosas con un inicio precoz de la actividad sexual, con un primer parto a una edad temprana o con antecedentes de múltiples embarazos.

El VPH entra a través de la capa basal del epitelio (usualmente la zona de transición) donde el virus se replica a medida que las células basales se dividen. El virus puede persistir en la capa basal en forma latente (inactiva) o puede continuar su replicación a medida que las capas basales se diferencian y ascender a través del epitelio donde el efecto citopático puede ser reconocido en cortes histológicos y frotis citológicos como: coilocitos, paraqueratosis y queratinización de células individuales.

La expresión de los genes de VPH se va a producir de forma paralela a la diferenciación de las células escamosas epiteliales (Figura 12).

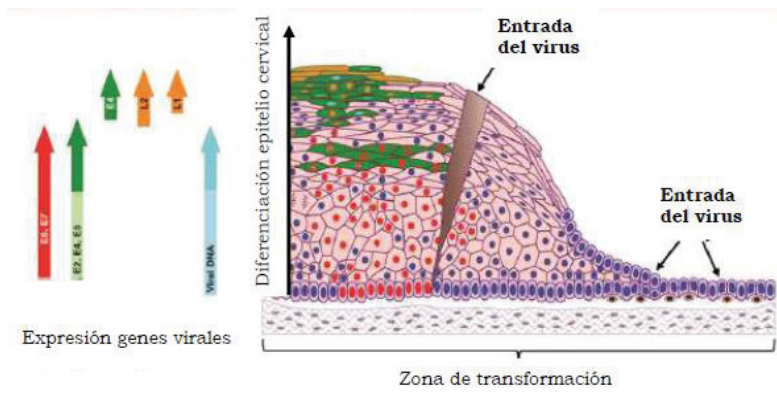


Figura 12: Modelo biológico de la expresión de los genes VPH de alto riesgo en las células del epitelio cervical

Fuente: Doorbar et al, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. John Doorbar Clinical Science May 01, 2006, 110 (5) 525-541 (59).

La infección aguda puede resolverse con una regresión espontánea de las lesiones o puede persistir como infección latente que puede reactivarse en cualquier momento.

Aproximadamente el 80% de los casos de CC, corresponden a cáncer de células escamosas, mientras que un 20% son adenocarcinomas. La distribución de los tipos de VPH dentro de los tipos histológicos de cáncer difiere (los adenocarcinomas se asocian más a VPH tipo 18 y las lesiones escamosas a VPH 16) (30, 85).

Existen diferentes clasificaciones que describen los cambios anormales en las células escamosas en el cuello del útero y sirven para caracterizar las lesiones precancerosas.

El sistema de clasificación de las Neoplasias Intraepiteliales Cervicouterinas (NIC) o CIN por sus siglas en inglés, se estableció en 1968 y fue introducido por Richart, para tener en cuenta las diversas evoluciones naturales

observadas en displasias de diferentes grados (de NIC1 o displasia leve, a NIC2 o displasia moderada y a NIC3 o displasia grave). La clasificación de las NIC todavía se utiliza en muchos países para los informes citológicos, aunque en sentido estricto se debe utilizar solo para los informes histológicos (es decir, informes sobre los resultados de exámenes microscópicos de muestras tisulares) (Figura 13).

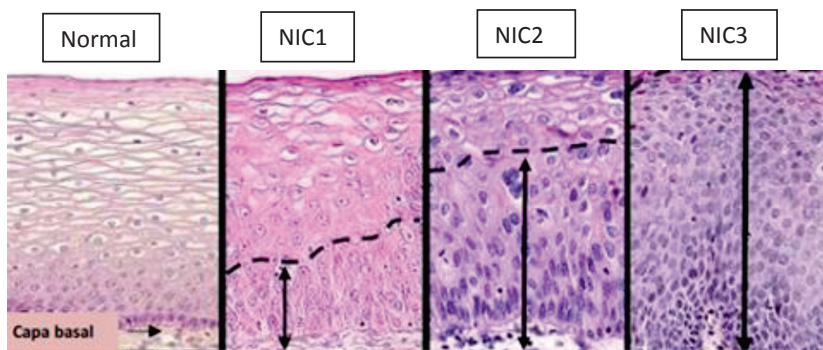


Figura 13: Clasificación de la neoplasia intraepitelial cervical (Richart)

Abreviaturas: NIC 1: la alteración afecta al tercio basal; NIC2: la alteración afecta entre uno y dos tercios; NIC3: la alteración afecta a más de dos tercios.

El Sistema de Bethesda se desarrolló en los años noventa en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos y en la actualidad es el sistema de clasificación recomendado por la OMS para los informes citológicos. En este sistema, que se debe utilizar solo para los informes citológicos (es decir, informes sobre los resultados de exámenes microscópicos de frotis). En esta clasificación la NIC2 y la NIC3 se combinan en un grupo, denominado lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés), porque citológicamente es difícil, cuando no imposible, distinguir estos dos niveles de displasia. Entretanto, los resultados que muestran una NIC1 se denominan lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés) (Figura 14).

En el Sistema de Bethesda del 2001 (86), las células atípicas se clasifican en ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) y ASCH

(células escamosas atípicas en las que no se puede descartar una lesión intraepitelial escamosa de alto grado).

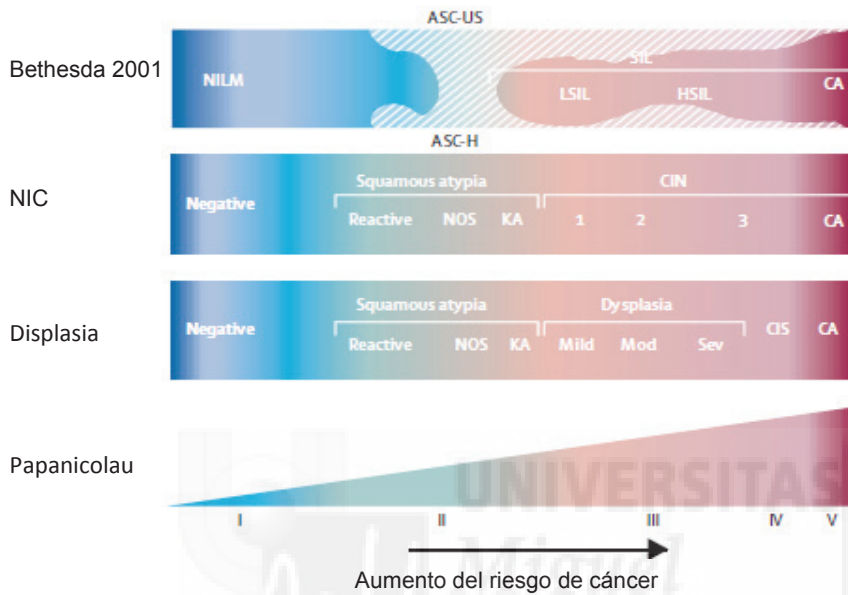


Figura 14: Clasificaciones que describen los cambios anormales en las células escamosas en el cuello del útero.

Abreviaturas: ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), LSIL (lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado) HSIL (lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado) NIC (neoplasias intraepiteliales cervicouterinas).

Fuente: Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907 (76).

3.6. Cribado, diagnóstico y tratamiento

A. Cribado y Diagnóstico

A.1. Métodos basados en el diagnóstico citológico

Dado que la evolución a CC tiene una larga historia natural, existe la posibilidad de detectar mujeres de riesgo, de manera temprana. La citología, prueba utilizada tradicionalmente en el cribado, ha sido muy eficaz en estos años reduciendo notablemente la incidencia de CC y la mortalidad hasta un 50% (87, 88).

El cribado por citología ha sido especialmente exitoso en países donde existen recursos adecuados para asegurar una alta cobertura y alcance de la población de riesgo; esto se ha demostrado más claramente en los Países Nórdicos y en el Reino Unido (88-90). Estudios de casos y controles de mujeres que desarrollaron CC también proporcionan evidencia adicional en este aspecto (91, 92).

Sin embargo, el procedimiento es generalmente ineficiente e inviable en muchas partes del mundo donde no existe una infraestructura apropiada. En América Central y América del Sur, la cobertura puede ser alta, pero la calidad de los programas de citología y el acceso al tratamiento son limitados, a excepción de Chile (93).

El estudio citológico se puede realizar de dos formas diferentes. En primer lugar la citología convencional, que consiste en un proceso manual de extensión de células en el portaobjetos cuyos principales inconvenientes son: la dificultad en la estandarización, y la presencia de moco cervical, sangre, superposición de células o la existencia de células inflamatorias que dificultan la observación de las extensiones y favorecen la variabilidad interobservador.

En segundo término, la citología líquida, en la que la muestra es introducida en un medio líquido y posteriormente en los laboratorios se realiza una extensión

en capa fina, evitando muchos de estos inconvenientes y reduciendo el número de falsos negativos y falsos positivos (94).

A.2. Métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos

Hasta la aparición de las nuevas técnicas de detección de ácidos nucleicos, el diagnóstico de la infección por VPH se había basado en la evaluación de los efectos citopáticos del virus en el epitelio cervical.

Existen dos métodos fundamentales que se han utilizado hasta el momento para la detección de ácidos nucleicos; las técnicas basadas en la amplificación de la señal y las que se fundamentan en la amplificación de los ácidos nucleicos.

Entre los métodos que amplifican la señal, la captura de híbridos, es la técnica de referencia hasta el momento. Consiste en la detección en solución de híbridos de ADN viral con sondas de ARN sintético complementario y posterior revelado con fluorescencia.

Con respecto a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos existen múltiples formatos de aplicación de esta metodología (reacción cadena polimerasa, PCR a tiempo real, NASBA...) (Tabla 2).

Tabla 2: Especificaciones técnicas de las diferentes pruebas moleculares comercializadas para el diagnóstico de VPH

VPH Test	Ácido nucleico	Tipo de amplificación	Gen diana	Genotipado separado	Control interno de los genes humanos
HC2	ADN	Señal	Genoma viral completo	No	No
GP5+/6+ PCR-EIA	ADN	Diana	L1	No	No
APTIMA VPH	ARN	Diana	E6/E7	No	No. Control interno para RNA y ADN no infeccioso
Abbott RealTime High Risk VPH test	ADN	Diana	L1	16,18 y otros 12 VPH AR	β-globina
BD Onclarity VPH	ADN	Diana	E6/E7	16,18,31,45,51,52; 33-58; 56-59-66; 35-39-68	β-globina
Cervista VPH HR	ADN	Señal	L1/E6/E7	14 genotipos AR. Tipado reflex aparte para 16 y 18	Histona humana 2
Cobas 4800 VPH test	ADN	Diana	L1	16,18 y otros 12 VPH AR (HC2 + 66)	β-globina
qPCR(E6/E7)	ADN	Diana	E6/E7	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68; 53, 6, 11.	β-globina

VPH Test	Ácido nucleico	Tipo de amplificación	Gen diana	Genotipado separado	Control interno de los genes humanos
VPH -Risk test	ADN	Diana	E7	16, 18 y otros 13 VPH AR (HC2 +66+67)	β -globina
PapilloCheck VPH screening test	ADN	Diana	E1	16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68.	ADAT1
GP5+/6+-LMNX	ADN	Diana	L1	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68; También detecta: 26, 53, 73,82.	Fragmento de ADN humano localizado en el cromosoma 14
CareVPH Test	ADN	Señal		No	No
MALDI-TOF	ADN	Diana	L1	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68.	β -globina

Adaptado: Fuente. Arbyn, M., et al., Which high-risk VPH assays fulfill criteria for use in primary cervical cancer screening? Clinical Microbiology and Infection. 2015.p. 817-826 (95).

En la detección y tipado de VPH se han utilizado diferentes diseños de sistemas de PCR que incluyen los específicos de tipo y los sistemas denominados de amplio espectro o consenso (96).

La PCR específica de tipo es un método muy sensible, ya que se basa en el diseño de cebadores para regiones diferenciales entre los diferentes VPHs. Un ejemplo sería la amplificación específica de los oncogenes virales (E6/E7) de un determinado tipo o variante viral. El uso de cebadores específicos permite ajustar las condiciones de reacción a sensibilidades de fentogramo con especificidades cercanas al 100%. Por otra parte permiten la realización de análisis de detección de variantes virales, cuantificación normalizada frente a genes constitucionales (albúmina, β -globulina), análisis de integración viral, etc.

Los sistemas de PCR que usan cebadores consenso, son los más utilizados hasta el momento. Estos sistemas suelen amplificar la región L1 que es de las más conservadas del genoma del virus. Existen tres tipos de cebadores consenso:

1. Una única pareja de cebadores que sólo presenta “afinidad” por algunos tipos virales. Para compensar los desapareamientos, la PCR se realiza a bajas temperaturas de alienamiento. Un ejemplo son los cebadores GP (general primer) P5+/6+.
2. Varias parejas de cebadores, que contienen varias posiciones degeneradas para compensar las variaciones intratípicas en los lugares de la secuencia donde se unen los cebadores. Un ejemplo son los cebadores tipo MY09/11.
3. Combinación de diferentes cebadores que se unen en las mismas posiciones del genoma. Estos cebadores suelen tener en su secuencia inosina que se puede unir a cualquier nucleótido. Ejemplos de este tipo de cebadores son los PGMY09/11 y SPF10.

Por lo descrito anteriormente, los sistemas de PCR que utilizan múltiples cebadores son más eficientes para la detección de infecciones múltiples.

La detección molecular del VPH de AR, ya se ha incorporado en los programas de prevención del CC en entornos de recursos altos, como una prueba de cribado primaria. Esta técnica parece ser especialmente útil en casos en los que la citología carece de sensibilidad adecuada para detectar algunas lesiones premalignas y sobre todo el adenocarcinoma de cérvix cuya incidencia está aumentando en estos últimos años (47, 97, 98).

La detección de VPH ha demostrado, una mayor sensibilidad que la citología (entre 23% y 43% en el caso de captura de híbridos) en función del umbral de detección elegido (\geq a NIC2 o \geq a NIC3) o del punto de corte de la citología (ASCUS o LSIL). Por otra parte, la especificidad se reduce respecto a la citología (entre el 6-8% para HC2) (99).

Las técnicas validadas para la detección molecular de VPH han demostrado una mejor reproducibilidad respecto a la citología (menor variabilidad interlaboratorio) (90, 100). Además, poseen un elevado valor predictivo negativo (VPN), cercano al 99%, en mujeres mayores de 30 años; lo que significa que una determinación negativa se traduce en una muy baja probabilidad de tener una lesión \geq a HSIL/NIC2 actual y en los próximos 5-7 años (49, 90).

Tras un resultado negativo en la detección de VPH el riesgo de desarrollar HSIL/NIC3 en los siguientes 6 años es del 0,27%, valor similar al riesgo tras un resultado negativo de cotest de 0,28. La estimación de riesgo para el mismo periodo tras una citología negativa es de 0,97% (49). El cribado basado en el VPH proporciona un 60-70% más de protección contra los carcinomas cervicales invasivos en comparación con la citología. Los datos de ensayos aleatorios a gran escala apoyan la iniciación del cribado basado en VPH desde los 30 años y la extensión de los intervalos de cribado a al menos 5 años (97, 101).

Por último, la detección de VPH incrementa sustancialmente la detección de adenocarcinoma cervical y de sus lesiones precursoras. La incidencia de este subtipo de neoplasia no ha disminuido o incluso ha aumentado en algunos países en los que el cribado se basa exclusivamente en la citología (102-104).

Entre los múltiples métodos comercializados para la detección del VPH deben utilizarse aquellos clínicamente validados y fiables (105). Idealmente estas pruebas no deben buscar la máxima capacidad de detección (sensibilidad analítica) sino la mejor detección de lesiones (HSIL o CC) relacionadas con el VPH (sensibilidad clínica).

Por otra parte, también hay que considerar que el punto débil de estas técnicas es su especificidad, ligeramente inferior a la de la citología. Como consecuencia, en el caso de obtener un resultado positivo en la prueba inicial de detección del VPH, se necesita una segunda prueba, llamada “de triaje”, con el objetivo de estratificar a las mujeres según el riesgo de sufrir lesiones premalignas en los próximos años. El objetivo de esta prueba de triaje es ahorrar colposcopias innecesarias a aquellas mujeres con citología negativa y test de VPH positivo, ya que está comprobado que tienen un riesgo mínimo de padecer CC en los próximos años.

La prueba de triaje que se aconseja en la Guía de la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología es la citología y es la que se ha estado utilizando en Holanda y en todos los países con más experiencia y mayor efectividad en los cribados de CC. Sin embargo, recientemente se han publicado varios estudios evaluando otras opciones con muy buenos resultados como el genotipado parcial (detección separada de los genotipos 16 y 18) o la tinción dual, si bien esta última necesita aún más estudios que avalen los buenos resultados obtenidos en los preliminares (106).

En el caso de obtener un resultado anormal en la citología, se procede a una evaluación mediante colposcopia, que consiste en el examen del cuello uterino, de la vulva, vagina y región perianal, para establecer el grado de la lesión (bajo o alto), la extensión, descartar la presencia de carcinoma invasor y toma de biopsia si fuera necesario (107). Esta prueba ha mostrado tener una sensibilidad que puede variar entre 11 y 90% y una especificidad entre 14 y 97%.

La estadificación del cáncer se determina en el momento del diagnóstico, mediante el sistema de clasificación de la FIGO (Federación Internacional de

Ginecología y Obstetricia). Se tiene en cuenta la evaluación clínica, los hallazgos en el examen físico, los estudios radiológicos y procedimientos tipo biopsias, los estudios de endoscopia, y el tamaño del tumor o su extensión hacia la pelvis. Todos estos hallazgos influyen tanto en el tratamiento a seguir, como también, determinan el pronóstico de cada mujer (85).

B. Tratamiento

Se han desarrollado guías y algoritmos para el manejo de las mujeres con lesiones histopatológicas de mayor o menor grado.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las lesiones de bajo grado revierten espontáneamente, en estos casos, el tratamiento recomendado es la observación y el seguimiento de las pacientes.

Toda lesión de alto grado diagnosticada por biopsia debe ser tratada.

La tasa de curación del CC invasor está estrechamente relacionada con el estadio de la enfermedad en el momento en que se realiza el diagnóstico y con la disponibilidad de tratamiento.

La elección del tratamiento más adecuado se realiza basándose en la edad de la mujer, el deseo de preservar la fertilidad que se tenga, la estadificación de la FIGO y el compromiso local o sistémico (30, 86, 108). El CC casi siempre es mortal si no se trata (108). La neoplasia intraepitelial cervicouterina (NIC) es una lesión premaligna que puede existir en cualquiera de los tres estadios siguientes: NIC1, NIC2 o NIC3. Si no son tratadas, la NIC2 o la NIC3 (conjuntamente denominadas NIC2+) pueden progresar hacia CC.

Existen dos tipos de tratamiento: los destructivos, que producen una destrucción física de la lesión (criocoagulación, termocoagulación, electrocoagulación y vaporización con láser de CO₂) y los escisionales (conización e histerectomía).

En principio las técnicas escisionales son de elección en el caso de lesión de alto grado (escisión electro quirúrgica con asa: LEEP). Debido a que el tamaño

de la lesión se relaciona con la persistencia de la misma; en los casos en los que este afectado más de dos cuadrantes del exocérnix se debe de recurrir a la conización como tratamiento de elección.

En lugar del método de cribado y diagnóstico con la secuencia estándar de citología, colposcopia, biopsia y confirmación histológica de NIC, un método alternativo consiste en un enfoque de “cribado y tratamiento” en el que la decisión de tratar se basa en una prueba de cribado y el tratamiento se inicia con prontitud o, idealmente, inmediatamente después de la prueba de cribado positiva (107).

3.7. Medidas para el control del cáncer de cérvix.

Teniendo presente que tan sólo un 5 a 10% de las mujeres con infección por VPH, desarrollan una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL), y que la progresión a CC tarda hasta 20 años, se establece que la mayor parte de los casos pueden prevenirse mediante la detección oportuna y el tratamiento anticipado de las lesiones precancerosas.

Por lo anterior, la tasa de curación está estrechamente relacionada con el momento en que se realiza el diagnóstico, el estadio de la enfermedad y la disponibilidad del tratamiento. Con el propósito de disminuir el impacto que ha generado el CC a nivel mundial, se han desarrollado estrategias encaminadas a la prevención, control y reducción de la morbimortalidad de ésta neoplasia (107, 108).

Un programa de prevención y control del CC comprende un conjunto organizado de actividades encaminadas a prevenir y reducir la morbilidad y la mortalidad. Forma parte de las acciones prioritarias indicadas en el Plan de Acción Mundial para la prevención y el control de las NCD 2013-2020 (25% reducción relativa del 25% de la mortalidad prematura debido a enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas). Un programa integral abarca tres componentes interdependientes que son la

prevención primaria (vacunación), la secundaria (cribado) y la terciaria (109) (Figura 15).

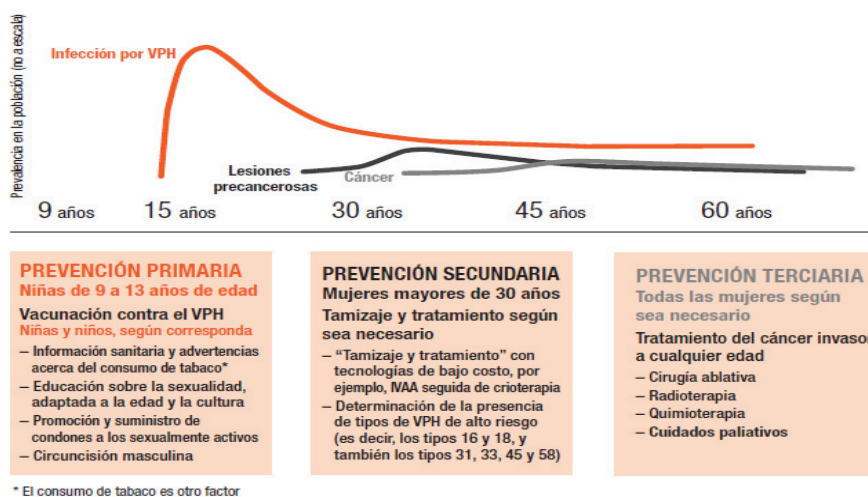


Figura 15: Visión general de las intervenciones para prevenir la infección VPH y el CC.

Fuente: WHO.Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. 2014. (109).

A. Prevención primaria

En la actualidad existen tres vacunas autorizadas frente al VPH. La vacuna bivalente VPH Cervarix® proporciona protección frente a los genotipos 16, 18; la vacuna tetravalente VPH Gardasil® proporciona protección frente a VPH 16, 18, 6, 11 (genotipos 6 y 11 de bajo riesgo oncogénico relacionados con la aparición del 90% de las verrugas vulvares) (110) junto con 16 y 18; y la recientemente aprobada vacuna nonavalente VPH Gardasil 9® que proporciona protección frente a VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (111). Esta nueva vacuna amplía la protección frente a 5 tipos oncogénicos más (VPH 31, 33, 45, 52, 58), además de los 4 tipos originales incluidos en Gardasil®. De este modo, la vacuna nonavalente VPH se estima que tiene el potencial de prevenir cerca del 90 % de los cánceres de cuello cérvix, vulva, vagina y ano, y

el 80 % de las lesiones precancerosas (58). La evidencia científica sobre el perfil de seguridad (112) inmunogenicidad (113, 114) y eficacia (115-118) de estas vacunas está bien establecida (Tabla 3).

Son vacunas compuestas principalmente por partículas similares al virus (VLP), se autoensamblan a partir de copias de L1 (la proteína estructural principal del virus), dando lugar a una estructura similar a la cápside viral, que es capaz de inducir la producción de anticuerpos protectores frente al virus auténtico. Las VLP son partículas no infecciosas y no oncogénicas, puesto que carecen de ADN viral. Las 3 vacunas difieren en algunos aspectos, como la valencia, la dosis, los adyuvantes y el sistema de producción (Tabla 4).

Aunque las especificaciones de las vacunas son de una pauta de tres dosis, en Octubre de 2014 la OMS recomendó para las beneficiarias de la vacuna (niñas menores de 15 años) una pauta de dos dosis, ya que existían evidencias científicas de que esta pauta no era inferior en cuanto a protección e inmunogenicidad (119, 120). La Asociación Española de Pediatría en su calendario de vacunaciones más reciente recomienda la vacunación sistemática de todas las mujeres preadolescentes o adolescentes entre 9 y 14 años, independientemente de su actividad sexual con dos dosis.

Estudios recientes sugieren que las diferencias biológicas y funcionales entre las llamadas variantes virales, pueden tener impacto en la etiología del cáncer, así como la distribución geográfica y el potencial oncogénico de estas pueden proporcionar datos que ayudarán a un diseño más eficiente de vacunas y protocolos de vacunación (121).

Tabla 3: Eficacia, seguridad e inmunogenicidad de las vacunas frente a VPH

Población estudiada	Resultado	Vacuna tetravalente	Vacuna bivalente	Vacuna nonavalente
Mujeres jóvenes (16-26 años)	Eficacia frente a infección	✓	✓	✓
	Eficacia frente a NIC2+	✓	✓	✓
	Eficacia frente a NIC3	✓	✓	✓
	Eficacia frente a VIN/VaIN 2/3	✓	✓	?
	Eficacia frente a verrugas genitales	✓	NA	✓
	Eficacia frente a infección anal	?	✓	?
	Eficacia frente a infección oral	?	✓	?
	Protección cruzada parcial	✓	✓	?
	Protección cruzada parcial frente a NIC2+	✓	✓	?
	Eficacia terapéutica	x	x	x
Mujeres adultas (25-45 años)	Seguridad	+++	+++	+++
	Eficacia frente a infección	✓	✓	?
	Eficacia frente a NIC2+	✓	?	?
	Inmunogenicidad	✓	✓	?
	Protección cruzada parcial	?	✓	?
	Seguridad	+++	+++	?

Población estudiada	Resultado	Vacuna tetravalente	Vacuna bivalente	Vacuna nonavalente
Hombres jóvenes (16-26 años)	Eficacia frente a infección	✓	?	?
	Eficacia frente a verrugas genitales	✓	NA	?
	Eficacia frente a infección anal	✓	?	?
	Eficacia frente a AIN2+	✓	?	?
Pre-adolescentes (10-14 años)	Seguridad	+++	+++	?
	Inmunogenicidad	✓	✓	?
	Seguridad	+++	+++	?

Abreviaturas. ValN: lesión intraepitelial de vagina; VIN: lesión intraepiteliales de vulva; AIN: lesión intraepitelial anal

Fuente: Bruni, L., et al., Vacuna frente al virus del papiloma humano. Eficacia y seguridad. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015. 33(5): p. 342-354 (122).

Tabla 4: Especificaciones de las vacunas frente a VPH

	Gardasil® Merck & Co., Inc	Cervarix™ GlaxoSmithKline	Gardasil®9 Merck & Co., Inc
Tipos de VLP	6/11/16/18	16/18	6/11/16/18/31/33/45/52/58
Dosis de proteína L1	20/40/40/20µg	20/20µg	30/40/60/40/20/20/20/20µg
Células productoras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> que expresa L1	Línea celular del insecto <i>Trichoplusia ni</i> (Hi-5) infectada con baculovirus recombinante que expresa L1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> que expresa L1
Adyuvante	225µg de hidroxifosfato sulfato de aluminio	AS04 (500µg de hidróxido de aluminio, 50µg de 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A)	500µg de hidroxifosfato sulfato
Pauta de administración	0, 2, 6 meses Intramuscular en deltoides	0, 1, 6 meses Intramuscular en deltoides	0, 2, 6 meses Intramuscular en deltoides

Fuente: Bruni, L., et al., Vacuna frente al virus del papiloma humano. Eficacia y seguridad. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015. 33(5): p. 342-354 (122).

B. Prevención secundaria. Cribado

Aunque la implementación de los programas de vacunación frente al VPH se esté llevando a cabo, el cribado rutinario mediante el examen ginecológico del cuello de útero sigue siendo necesario, ya que ninguna de las vacunas es efectiva 100% y no proporcionan protección frente a todos los tipos de VPH o frente a infecciones ya existentes.

Como se ha expuesto anteriormente, la citología, prueba utilizada tradicionalmente en el cribado, ha sido muy eficaz en estos años reduciendo notablemente la incidencia de CC y la mortalidad hasta un 50%. El cribado por citología ha sido especialmente exitoso en países donde existen recursos adecuados.

Por recomendación de la OMS, los programas de cribado deben comenzar en mujeres de 30 años de edad en adelante e incluir mujeres más jóvenes únicamente después de que el grupo de mayor riesgo esté cubierto (107).

La edad óptima para el cribado es entre los 35 y los 45 años. En mujeres entre 25 y 49 años de edad, el test se podría realizar cada tres años y en mujeres mayores de 50 años, un intervalo de cinco años resulta adecuado. En pacientes inmunocomprometidas se realizará con más frecuencia.

El cribado finalizará en mujeres mayores de 65 años de edad cuando constatemos tres citologías ó 2 cotest/VPH previos negativos (107, 123).

La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia en su Documento de Consenso de 2014, la prueba inicial que se debe utilizar para el cribado poblacional de CC debe ser la prueba de detección del VPH. Lo más remarcable de este Documento de Consenso es que no se debe comenzar el cribado antes de los 25 años, que entre los 25 y 30 años se recomienda la citología como prueba inicial por la elevada prevalencia de infección por el VPH en esta edad, y que a partir de los 30 años, como se ha comentado previamente, la prueba de detección del VPH es la opción preferente porque es la que aporta mayores beneficios (106) (Tabla 5).

Actualmente en España no existe una política común de cribado del cáncer de cérvix sino que existen estrategias de Salud Pública diferentes en cada una de las 17 Comunidades Autónomas. Mayoritariamente los programas de cribado de CC son oportunistas, con coberturas no óptimas y con déficits en la equidad y en la eficiencia. Se estima que más del 60% de las neoplasias de cérvix diagnosticadas recaen en mujeres sin cribado previo o con cribado inadecuado.

El cribado oportunista no posee estructura propia; utiliza la consulta del personal sanitario para la captación de las pacientes que se podrían beneficiar del mismo.

Establecer una política de cribado poblacional para el CC, tanto en España como en el resto de países europeos, debería ser una prioridad tal como se expone en las “European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening” (124).

Tabla 5: Recomendaciones de las sociedades científicas

Población	Recomendación American Cancer Society 2012	Recomendación SEGO 2014
<21 años	No cribado	No cribado (<25 años)
21-29 años	Citología cada 3 años	Citología cada 3 años (25-30 años)
30-65 años	*Cotest cada 5 años Citología cada 3 años	*VPH cada 5 años Cotest cada 5 años Citología cada 3 años
>65 años	Finalizar el cribado**	Finalizar el cribado
*De elección		
**Si tres citologías previas negativas ó 2 cotest/VPH previos negativos		

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

Adaptado: Fuente: Torné-Bladé, A., Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. Prog Obstrect Ginecol, 2014. 57: p. 1-53 (106).

3.8. Antecedentes metodológicos en la determinación de la carga viral y subtipos/variantes virales del VPH.

La determinación de la carga viral se convirtió en un desafío metodológico ya que se ha sugerido que el alto número de copias se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales asociadas al VPH. La cuantificación del ADN del VPH en la muestra biológica se puede lograr mediante métodos basados en PCR (PCR siglas en inglés de: Polymerase chain reaction) o mediante el ensayo de HC2 (captura e hibridación) de una manera semicuantitativa (96, 125-129) . Las estimaciones del número de copias virales dependen directamente del número total de células y, en última instancia, de la cantidad de ADN viral. Por lo tanto, el ajuste para la carga celular es un requisito absoluto que frecuentemente no se cumple, como es el caso de HC2 y algunos protocolos basados en PCR.

Actualmente, no hay consenso sobre el mejor método para cuantificar el VPH en muestras biológicas. Uno de los ensayos más precisos y controlados disponibles es la PCR en tiempo real que muestra valores de sensibilidad y especificidad muy buenos (130); pero como cualquier metodología basada en PCR, está sujeta a variaciones de acuerdo con las secuencias de cebador, el ADN diana, el método de detección, etc. Además, requiere equipo y reactivos costosos. Sin embargo, su uso en estudios epidemiológicos parece estar justificado por la información proporcionada. Junto con los estudios realizados con PCR en tiempo real, estos estudios proporcionan una indicación de que altas cargas virales, al menos para el VPH 16, pueden proporcionar un mecanismo para distinguir entre las infecciones clínicamente relevantes y aquellas que es poco probable que progresen.

La verdadera relevancia clínica de la medición de la carga viral puede estar dificultada por errores en la toma de muestras cervicales. Incluso con la normalización con un control celular (6, 12, 26), el tamaño de la lesión y la proporción de células infectadas serán factores extremadamente difíciles de controlar.

Recientemente, se desarrollaron protocolos de PCR basados en un ensayo de 5'-exonucleasa y detección en tiempo real de la acumulación de fluorescencia. La liberación de fluorescencia en cada ciclo de amplificación es directamente proporcional a la cantidad de amplicón generado y, por lo tanto, se considera que es un método preciso para estimar la carga viral. Además, el ensayo está diseñado para mantener la contaminación a un mínimo (131, 132).

El sistema de PCR cuantitativo de Taqman ha sido reportado para evaluar la carga viral de VPH, mientras que controla la variación en el contenido celular de la muestra por cuantificación del gen nuclear para la beta-actina (133).

Los desarrollos recientes explotan un formato multiplex, incluyendo más de un tipo de VPH, así como la orientación de un gen celular, que controla la cantidad de ADN de entrada (134). Recientemente, se ha sugerido una variación de la PCR en tiempo real que utiliza amplicones autoprovocantes conocidos como Escorpiones para la detección, tipificación y cuantificación de más de 40 tipos diferentes de VPH en muestras clínicas (135). Aunque prometedor, la aplicación clínica de los métodos basados en tiempo real todavía está por demostrar.

Con respecto a la determinación de los subtipos virales de papilomavirus, se sabe que los VPH mutan muy lentamente debido a que son virus de ADN de doble cadena que utilizan la excelente capacidad de corrección de la polimerasa de ADN de su huésped. Sin embargo, los polimorfismos de nucleótidos pueden ocurrir a través de una mutación aleatoria y pueden establecerse en una población. Esta deriva genética se ha observado entre las variantes de VPH 16, lo que sugiere su coevolución con la humanidad (136).

El genoma de VPH 16 de referencia se secuenció por primera vez en 1985 por Seedorf et al. y fue revisado por Myers et al. en 1995. Desde entonces se han encontrado muchas variantes naturales. El primer estudio mundial de las variantes de VPH 16 se realizó tras amplificación y secuenciación del gen LCR en 1993 por Ho et al, quienes informaron que las variantes de LCR de VPH 16 se segregan robustamente en un árbol filogenético con cinco linajes

principales: Europeo (EUR), Asiático (As), Asiático-americano (AA) y dos linajes Africanos (Af1 y Af2).

Los subtipos de VPH se han identificado comparando las secuencias de los genes E6 y L1 y de la región de control largo (LCR) (22, 56, 57, 137) con secuencias consenso descritas (53). En la mayoría de los artículos descritos se recurre a la amplificación de la secuencia de interés ya sea PCR convencional o nested PCR (22) seguida de secuenciación para la determinación de la variante viral. Se han reportado estudios en los que se ha realizado la hibridación con sondas linaje específicas frente a las regiones L1, E6 (54). En el caso de VPH 16, el gen E6 se utiliza con frecuencia porque en un fragmento corto y continuo de su secuencia contiene suficiente información para identificar todos los subtipos y variantes que se han descrito hasta el momento.

Con este trabajo se pretende determinar la carga viral del VPH 16 (identificado como el genotipo más prevalente tanto en cáncer cervical como en mujeres sin anormalidades citológicas) mediante una técnica cuantitativa como lo es la PCR en tiempo real (normalizando la técnica con la detección en paralelo de un gen presente en todas las células; en este caso la albúmina, para dar los resultados normalizados en función de la cantidad de células epiteliales de la muestra), y la variante viral mediante una PCR anidada seguida de secuenciación, teniendo como base una población de mujeres heterogénea como la que se encuentra en nuestro país, con la finalidad de comparar la carga y la variante viral de este genotipo del VPH de alto riesgo, estableciendo así su asociación.



HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

El genotipo 16, es el genotipo de alto riesgo mas prevalente en mujeres infectadas por VPH en nuestro ámbito de estudio y el más asociado al riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Restringiendo a las pacientes infectadas por el genotipo 16, determinadas características moleculares como la carga viral del genotipo 16 o la variante viral del VPH 16 detectada, pueden ser predictores independientes importantes de un mayor riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.





OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo principales

- ✓ Identificar la asociación entre la carga viral del Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo (AR) 16 y la frecuencia de lesiones histopatológicas en nuestra cohorte de pacientes.
- ✓ Identificar la asociación entre las variantes virales del VPH 16 y la frecuencia de lesiones histopatológicas en nuestra cohorte de pacientes.

5.2. Objetivos secundarios.

- ✓ Describir las características sociodemográficas de las mujeres participantes en el estudio.
- ✓ Identificar los factores de riesgo presentes en dos grupos de mujeres (con y sin lesiones cervicales) y determinar si existen diferencias entre éstos.
- ✓ Determinar las prevalencias tipo-específicas de la infección cervical por VPH y ver su asociación con las lesiones histopatológicas que presentan nuestras pacientes.
- ✓ Determinar la prevalencia de genotipos virales de AR en función de la protección de la vacuna tetravalente y nonavalente y su asociación e impacto en el riesgo de lesiones de alto grado.



MATERIAL Y MÉTODOS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño del estudio

Estudio transversal. El diseño del estudio se realizó siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki para la investigación biomédica y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Elche.

6.2. Consentimiento informado

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Elche autoriza, una vez valorado el proyecto, considerar que se puede “dispensar” de solicitar un consentimiento informado (CI) por darse determinadas condiciones, que vienen especificadas en la Ley (art 58.2). Se ha trabajado con excedente de muestras biológicas ya existentes en los archivos del Servicio de Microbiología, en las que no consta un CI para investigación y se han anonimizado los datos de las pacientes para su análisis.

6.3. Población estudio

Mujeres que acudieron al Servicio de Ginecología del Hospital General Universitario de Elche para estudio en los exámenes de salud ginecológicos periódicos. Se incluyeron de forma consecutiva todas las mujeres durante el periodo de estudio: 4 de enero de 2010 al 30 de diciembre de 2011. A estas pacientes se les realizó un cribado oportunista de cáncer cervical consistente en toma de muestra de cepillado endocervical para detección de VPH y de frotis cervico-vaginal para estudio de lesión citológica (cotest). Se recogieron un total de 1363 muestras.

La población final la compusieron todas las muestras con hallazgo de infección cervical por algún genotipo de VPH de entre todos los exámenes de salud ginecológicos periódicos (n=1363) durante el periodo de estudio. Durante el período de estudio se seleccionó únicamente una muestra por paciente, que se correspondió con la muestra positiva para VPH que tuvo la primera fecha de entrada en el estudio. Se incluyeron así pues de forma consecutiva todas las mujeres (n=595) en base a los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Mujeres positivas para infección cervical por VPH, identificadas previamente mediante genotipado del VPH LINEAR ARRAY (Roche).
- Mujeres con información relacionada con datos sociodemográficos, factores de riesgo y tipificación de VPH completa.
- Mujeres con resultado de citología verificable.
- Mujeres con muestra inicial suficiente para realizar los estudios moleculares de caracterización viral del genotipo 16 (carga y subtipo viral).

2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres negativas para infección por VPH, identificadas previamente mediante genotipado del VPH LINEAR ARRAY (Roche).

En la [Figura 16](#) se presenta un diagrama de flujo de la población y muestras a estudio, en función de los objetivos analíticos del estudio.

El total de la población final a estudio fueron 595 mujeres atendidas en el Servicio de Ginecología del Hospital General Universitario de Elche. De ellas, en 180 se determinó infección única o múltiple por el genotipo 16 de VPH. En 176 de estas 180 mujeres se pudo profundizar en el estudio de la variante o de la carga viral de la infección por el genotipo 16 de VPH.

De cara a los objetivos analíticos del estudio, en algunas de estas mujeres no se pudo obtener información de la Anatomía Patológica. Así pues, en 587 de

las 595 mujeres que conforman la población a estudio se cuenta con información del genotipado de VPH, y datos de Anatomía Patológica; en 175 de las 180 mujeres con infección por el genotipo 16 se cuenta además con datos de Anatomía Patológica; y en 135 y 144 mujeres se cuenta con información del subtipo 16 de VPH y carga viral junto con datos de Anatomía Patológica respectivamente.

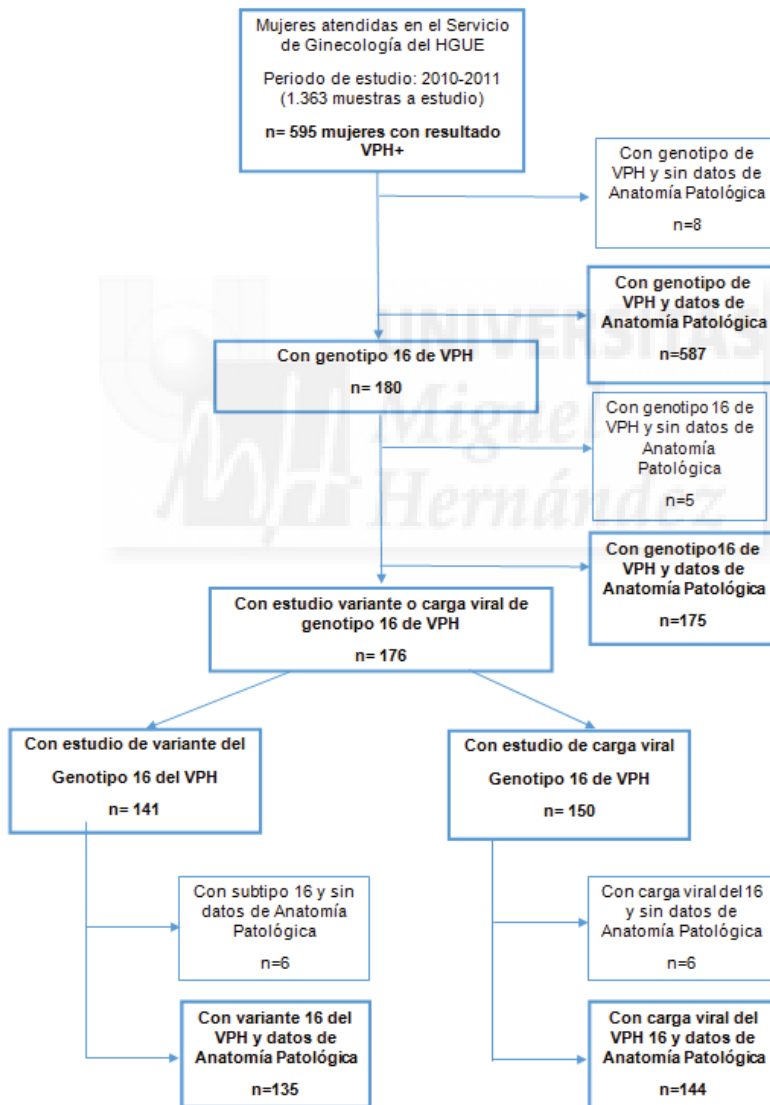


Figura 16: Diagrama de flujo de la población y muestras a estudio, en función de los objetivos analíticos del estudio.

6.4. Lesión histopatológica

Las células tomadas de la zona de transformación se fijaron en un portaobjetos para el estudio citológico. Se utilizó la técnica de tinción de Papanicolaou para observar la presencia de anomalías citológicas y los resultados se clasificaron de acuerdo con el sistema Bethesda 2001.

El resultado se clasificó como: células escamosas o glandulares atípicas de significado indeterminado (ASCUS/AGC), células escamosas atípicas en las que no se puede excluir lesión escamosa intraepitelial de alto grado (ASCH), lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL), carcinoma escamoso, adenocarcinoma in situ o adenocarcinoma.

6.5. Detección de lo genotipos virales VPH

El genotipado del virus del papiloma humano se realizó mediante la técnica Linear Array VPH Genotyping (Roche) que es una prueba cualitativa, que permite detectar en muestras clínicas los siguientes genotipos VPH: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108.

6.5.1. Toma de muestras

Las muestras de exudado cervical se obtuvieron en las diferentes consultas del S. de Ginecología siguiendo un procedimiento normalizado.

Se tomó primero la muestra para la citología vaginal y se recogió la muestra para el estudio de papilomavirus antes de aplicar ácido acético o yodo si se iba a realizar una colposcopia.

Procedimiento:

1. Retirar el exceso de moco del orificio cervical y el exocérvis circundante con una torunda de algodón o de Dacron (desechar la torunda).
2. Introducir el cepillo cervical 1-1,5 cm dentro del orificio del cérvix hasta que las cerdas exteriores más largas toquen el exocérvis.
3. Girarlo 3 vueltas completas en sentido contrario a las agujas del reloj.
NO INTRODUCIRLO COMPLETAMENTE DENTRO DEL CANAL ENDOCERVICAL.
4. Retirar el cepillo del canal cervical.
5. Introducirlo en el contenedor que contiene el medio de transporte, presionar con el mismo por las paredes. Retirarlo y cerrar el contenedor (Figura 17).
6. Conservar refrigerado hasta su procesamiento

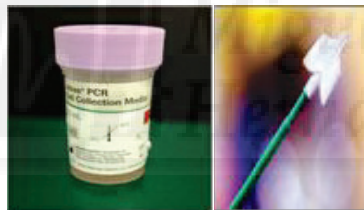


Figura 17: Presercyt®.Cepillo cervical

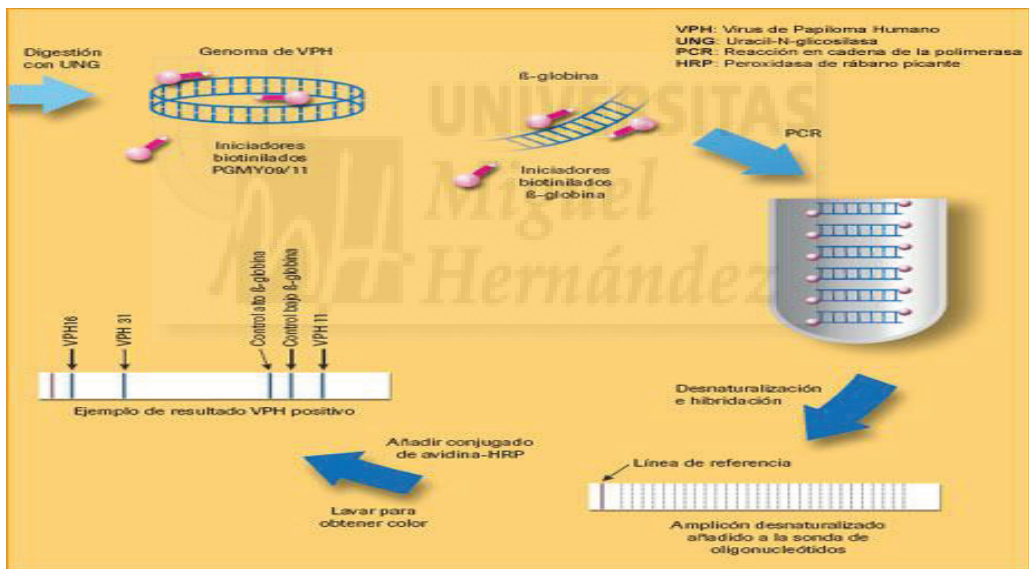
6.5.2. Extracción ADN VPH

El ADN genómico de muestras cervicales, obtenidas tras cepillado endocervical y conservadas en el medio líquido PreservCyt® (almacenadas a 4°C) fue extraído usando el kit TNAI de extracción (Roche Diagnostics) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante en la plataforma COBAS Amplipred.

6.5.3. Amplificación e hibridación reversa

El proceso de amplificación se realizó usando primers consenso tipo PGMY09/11, por PCR convencional en la plataforma Termociclador GeneAmp PCR System 9700. La región amplificada (450 pb de la región L1) se hibridó en un segundo paso mediante hibridación reversa tipo dot-blot con varias sondas específicas de genotipo viral adheridas a un papel de nitrocelulosa (en la plataforma AutoLIPA Siemens).

En el procedimiento descrito se incluye un control interno de celularidad mediante la detección de β -globina y un control de amplificación de un control positivo de VPH (Figura 18).





Termociclador GeneAmp PCR System 9700



AutoLIPA Siemens

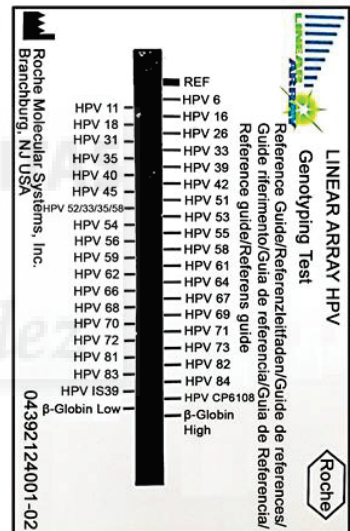
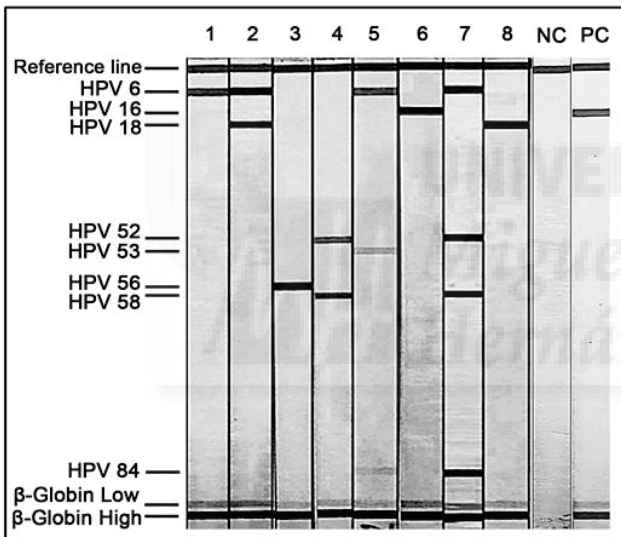


Figura 18: Soportes y bases metodológicas para la amplificación e hibridación del genoma de VPH.

6.6. Metodología para determinar la carga viral de las muestras VPH genotipo 16.

A. Extracción ADN viral

A.1. Preparación de la muestra

Concentrar la muestra tomando 1ml de la misma y centrifugar (a 4°C) a 10.000 rpm durante 5 minutos. Repetir este paso dos veces más.

Lavar con 300 µL de buffer TE (10mM de tris-HCl y 1mM de EDTA, pH 8,0) y centrifugar durante 5 minutos a 10.000 rpm desechando el sobrenadante. Resuspender la muestra con 400 µL de TE.

A.2. Lisis externa

Añadir 50 µL de proitenasa K y 25 de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% e incubar toda la noche a 56°C.

A.3. Extracción automatizada

La extracción final del ADN viral se realizó en la plataforma NucliSENS® easyMAG® (Biomérieux) con el protocolo genérico de extracción según las instrucciones del fabricante (Figura 19). Partiamos de un volumen inicial de muestra de 350 µL para obtener un volumen de eluído de 50 µL.

Extraction Principle

- A. During incubation of the lysed samples, all the target nucleic acid is captured by magnetic silica particles.
- B. The NucleoSENS easyMAG magnetic device attracts all the magnetic silica, enabling the system to purify the nucleic acids through several washing steps.
- C. The heating step releases the nucleic acids from the silica.
- D. At the final step, the magnetic silica particles are separated from the eluate by the magnetic device.

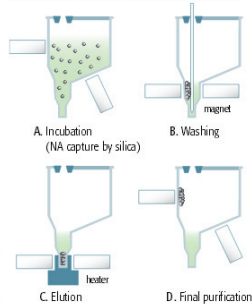


Figura 19: EasyMAG (Biomérieux)

A.4. Cuantificación de la calidad y cantidad de ADN extraído

Para medir la concentración y pureza del ADN viral extraído se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). (Figura 20)

La pureza del ADN extraído está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm). La relación de las absorbancias A_{260}/A_{280} es muy estable y permite conocer si el ADN obtenido está contaminado por la presencia de compuestos aromáticos ya que éstos absorben a una longitud de onda de 280 nm.

Se consideró que la muestra era válida para su posterior análisis si como mínimo se obtenía una concentración de 50 ng/ μ l y un ratio de absorbancia 260/280 superior a 1,8. En las muestras en las que esta relación no se daba o la concentración era baja, se repitió el proceso de extracción.



Figura 20: Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

B. Cuantificación de la carga viral por q PCR

B.1. Selección de dianas

Para el diseño de cebadores y sondas taqman se utilizaron como dianas el gen E6 del virus VPH 16 y el gen humano de la albúmina (Gen Bank. K02718.1 para E6 VPH 16 y AY728024.1 para la albúmina)

Para el diseño de los cebadores y las sondas TaqMan empleadas en cada una de las reacciones, se empleó el software *Beacon Designer 8.0*⁵⁹ (Premier Biosoft, <http://www.premierbiosoft.com>). Se utilizó como secuencia diana la secuencia consenso para cada gen, que fue generada mediante el alineamiento de los alelos descritos para cada uno de ellos. Las condiciones de PCR fueron diseñadas para ser idénticas en todos los genes.

Para el diseño de los cebadores y sondas taqman se cumplieron las normas recomendadas por los creadores del software *Beacon Designer 8.0* (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html):

- a) Temperatura de alineamiento: La temperatura de alineamiento (T_m) de los cebadores debe ser de entre 58°C-60°C y ambos cebadores han de tener la misma. La T_m de la sonda Taqman debe ser 10°C inferior a la T_m de los cebadores.
- b) Longitud de cebadores: La longitud de los cebadores debe ser entre 15 y 30 pares de bases (pb).
- c) Contenido en guanina (G) y citosina (C): El contenido ideal de GC debe oscilar entre 50%-60%.
- d) Presencia de nucleótidos G y C en los extremos 3': El número de nucleótidos G y C en el extremo 3' de los cebadores no debe ser mayor de dos. Esto es debido a que de esta forma en estas regiones se genera inestabilidad evitando así uniones inespecíficas.
- e) Longitud del amplicón: La longitud máxima del amplicón no debe sobrepasar las 400pb, siendo lo ideal entre 50-150pb.
- f) Repeticiones: Con el fin de preservar el adecuado porcentaje de GC, no es recomendable que las sondas tengan repeticiones de nucleótidos G o C. Además, se recomienda una mayor prevalencia de C respecto de G y omitir en la medida de lo posible el nucleótido G en el extremo 5'.

En la [Tabla 6](#) se recogen los cebadores y sondas diseñados por el software *Beacon Designer 8.0* para la identificación de genes diana E6 VPH 16 y gen de la albúmina.

Tabla 6: Cebadores y sondas diseñados por el software Beacon Designer 8.0 para la identificación de genes diana E6 VPH 16 y gen de la albúmina.

Diana	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Sonda Tagman (FAM-5'-3'BHQ1)
E6 VPH 16 Posición Tamaño	CACAGGAGCGACCCAGAAA 117-135 19	CACGTCGCAGTAACTGTTGCTT 203-224 22	ACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAA 139-167 29
Albúmina Posición Tamaño	CTGCATTGCCCGAAGTGGAA 864-882 19	CAAACATCCTTACTTTC AACAAAATCA 921-947 27	TGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTG 893-919 27

FAM (fluoróforo): 6-Carboxy Fluorescein. BHQ1: Quencher Black Hole Quencher 1.

B.2. Condiciones de trabajo de la PCR en tiempo real

La PCR a tiempo real se optimizó en el equipo de detección 7.500 Real-Time PCR System con la versión de software v2.0.6 de la casa comercial Applied Biosystems. Empleamos el canal de detección 1 que es el canal que detecta el fluoróforo FAM.

Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l, que contenía 10 μ l de Universal PCR Master Mix (Taqman), 7,6 μ l de agua estéril destilada, 0,6 μ l de cada cebador (12,5 pmol), 0,2 μ l de sonda (4 pmol) Taqman y 1 μ l de ADN amplificado.

El programa de PCR consistió en tres pasos: 1° de 50°C durante 2 minutos, 2° de 95°C durante 10 minutos y seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C por 1 minuto (Figura 21).

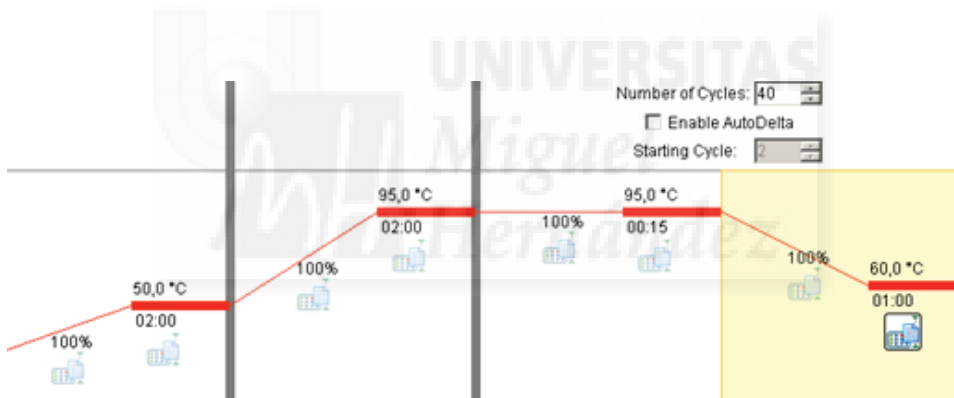


Figura 21: Programa de PCR a Tiempo Real empleado

B.3. Interpretación de los resultados

Se consideró como resultado positivo las muestras que en su curva de amplificación su señal de fluorescencia supere el valor predefinido Threshold de 0,2 antes del ciclo 40 de PCR. Por el contrario se considerará como resultado negativo las muestras que en ninguna de las dianas analizadas la intensidad de fluorescencia de su curva de amplificación superen el valor predefinido Threshold de 0,2.

B.4. Recta patrón

Se realizaron dos rectas patrón para cada ensayo (para evitar la variabilidad interensayo) para poder cuantificar las muestras a estudiar y dar los resultados de carga viral normalizados en función del número de células epiteliales de la muestra.

La curva estándar para la cuantificación de VPH 16 se realizó usando un patrón comercial de ADN del papilomavirus genotipo 16 comercializado por VIRCELL AMPLIRUN® PAPILOMAVIRUS TYPE 16 DNA CONTROL. El control se resuspendió en el volumen indicado por la casa comercial para tener una concentración de ADN de 50 ng/microlitro que equivalía a 1.000.000 copias de genoma/microlitro y se realizaron diluciones seriadas del mismo.

La curva estándar para células humanas se hizo a partir de leucocitos extraídos de sangre periférica usando la solución de Histopaque (Sigma-Aldrich) y cuantificando por citometría de flujo en el citómetro Cell-Dyn 3600 (Abbott).

Una vez llevado a cabo la amplificación de los patrones anteriormente descritos, para realizar las rectas patrón se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos a partir de la amplificación representando los valores de Ct (ciclo en el cual la señal de fluorescencia supera el umbral, descrito anteriormente) frente al logaritmo de la cantidad de dianas presente en cada punto de la recta patrón. De esta forma se generó una función semilogarítmica que fue la recta patrón o estándar.

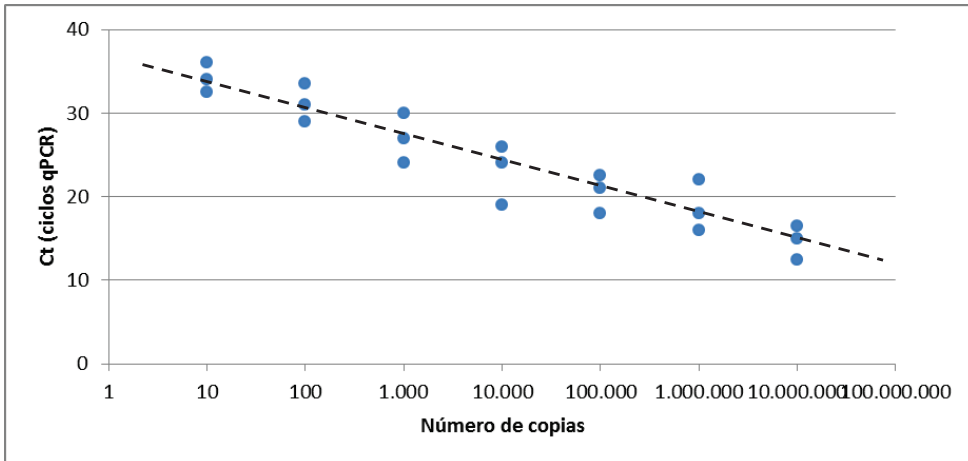
B.5. Validación de la recta patrón

Para llevar a cabo la validación analítica de la recta patrón es necesaria la determinación de los límites de detección y eficiencia de reacción y la linealidad de la recta.

La sensibilidad de analítica de la técnica viene dada por el ciclo al cual la fluorescencia emitida se incrementa por encima del ruido de fondo. Coincide con el límite de detección de la técnica que trata de la mínima concentración de ADN necesaria para que el instrumento proporcione una señal significativamente diferente de una muestra que no contiene la diana a detectar considerada blanco. El límite de detección fue de 10 copias/ μ L.

La eficiencia de reacción es el ratio con el cual los amplicones son generados a lo largo de la reacción de amplificación y que de forma general se expresan como un valor de porcentaje. Si un amplicón determinado dobla su cantidad en cada uno de los ciclos, la eficiencia de la PCR es del 100%. Para la calcular la eficiencia de la reacción de PCR es necesaria conocer la pendiente de la recta patrón. Una pendiente de -3,32 indica que la reacción se ha llevado a cabo con un 100% de eficiencia. Pendiente más negativas que -3,32 indican que la reacción ha ocurrido por debajo del 100% de eficiencia y pendientes mayores que -3,32 indican problemas en la calidad de las muestras o errores de pipeteo. El cálculo de la eficiencia puede variar de forma significativa si no se sigue el protocolo de medida de forma rigurosa. Además, las medidas para calcular la pendiente de la recta de calibrado deben por lo menos contener un rango de entre seis o siete diluciones seriadas. Por último, la eficiencia puede verse afectada por sustancias que inhiban la reacción. La fórmula empleada para el cálculo de la eficiencia es la siguiente:

$$\text{Eficiencia (E)} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$



Detector: E6-HPV, Slope: -3.366564, Intercept: 50.898079, R2: 0.989281
 Document: 12_08_2010_E6_1.sds (Standard Curve)

Figura 22: Recta patrón VPH 16

Así para la realización de las rectas patrón se utilizaron un rango de hasta 7 diluciones seriadas (3 replicas por dilución) de estándares de concentración conocida de 10 copias/ μ L a 10.000.000 de copias/ μ L. Se validaron las rectas con valores de eficiencia de entre el 90-100% y con valores de correlación lineal (R^2) mayores a 0,97. La desviación estándar entre replicas debía ser \leq 0,38.

Una vez construidas las curvas de calibración para VPH 16 y el gen control (albúmina), se analizó cada muestra para la detección y cuantificación. Una vez cuantificado el valor de CV se corrigió por el factor de dilución aplicado para obtener el valor de carga viral real.

C. Análisis de las variantes papilomavirus genotipo 16.

La extracción del ADN viral se describe en el punto A de material y métodos.

C.1. Amplificación por PCR anidada

Para la clasificación de las variantes virales del VPH 16 se realizó una amplificación por nested PCR (PCR anidada) seguida de una secuenciación tipo sanger, secuenciando los amplicones forward y reverse y ensamblando las secuencias obtenidas para formar un fragmento de la región genética E6.

El diseño de los primers externos e internos se realizó con programa PRIMER BLAST (NCBI). En el diseño de los primers se ajustaron los parámetros a un tamaño de pb de entre 21-28, T^a fusión de entre 57-63 ° C (que no debía diferir en más de dos grados para los cebadores) y un tamaño de amplicón entre 100 y 1000 pb.

Tabla 7: Cebadores diseñados para la PCR anidada de genes diana E6 VPH 16.

Diana	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
E6 VPH 16 externo	YGTAACCGAAATCGGTTGAAC	TACGCACAACCGAAGCGTA
Posición	32-51	750-768
Tamaño	20	19
E6 VPH 16 interno	AACTGCAATGTTTCAGGACCCACA	AACTGCAATGTTTCAGGACCCACA
Posición	97-121	656-683
Tamaño	25	28

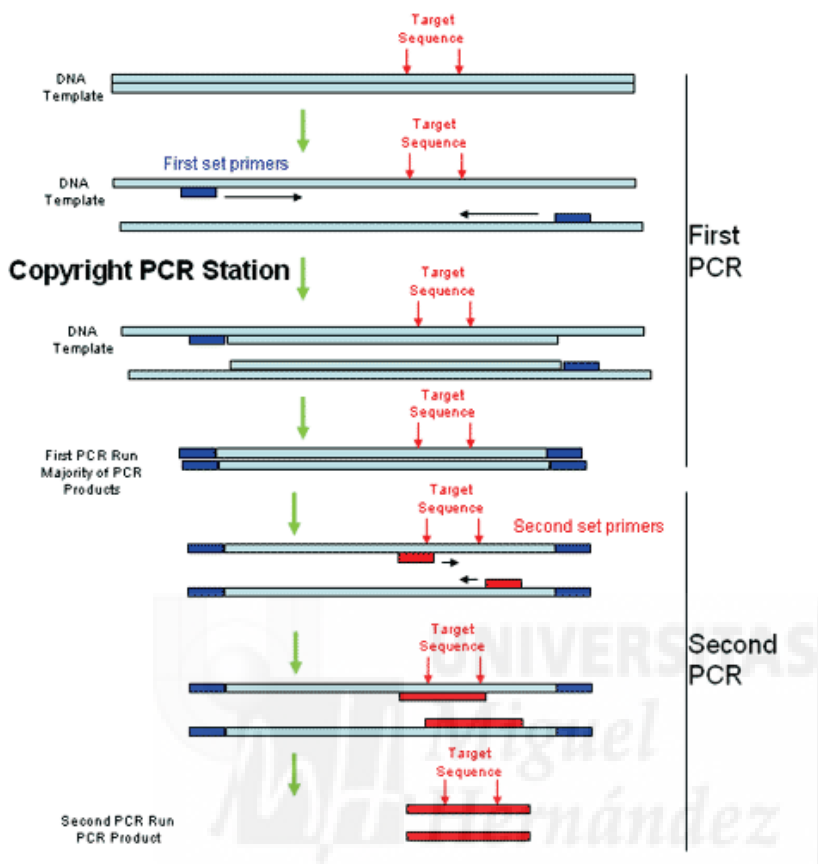


Figura 23: Esquema PCR anidada

En la [Tabla 8](#) se detallan los volúmenes de reactivos y concentraciones necesarias para la realización de la PCR anidada y el programa de amplificación (40 ciclos) se especifica en la [Tabla 9](#).

Tabla 8: Volúmenes de reactivos y concentraciones para la PCR anidada

	PRIMERA AMPLIFICACIÓN Volumen final 50 µL	SEGUNDA AMPLIFICACIÓN Volumen final 50 µL
DNA viral extraído	1 µL	5 µL DNA de la primera amplificación purificado
Buffer 10X	5 µL	5 µL
Agua libre de nucleasas Ambion®	40 µL	36 µL
Cloruro magnésico (50 mM)	1,5 µL	1,5 µL
Cebador sentido E6- externos Cebador sentido E6- internos	1 µL	1 µL
Cebador antisentido E6- externos Cebador antisentido E6- internos	1 µL	1 µL
dNTP (50 mM)	0,1 µL de cada dNTP	0,1 µL de cada dNTPs
TAQ polimerasa Bioline®	0,1 µL	0,1 µL

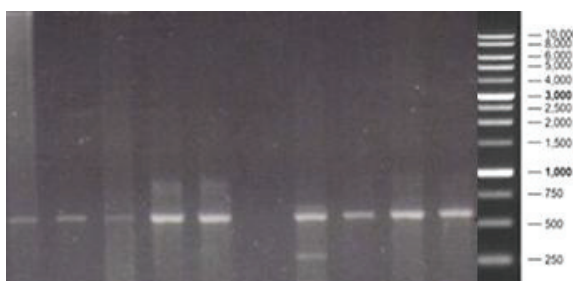
Tabla 9: Programa de amplificación PCR anidada

VPH 16 externos	VPH 16 internos
94°C 7:00'	94°C 7:00'
94°C 0:30'	94°C 0:30'
54°C 0:30'	58°C 0:30'
72°C 0:40'	72°C 0:40'
72°C 7:00	72°C 7:00'
4°C ∞	4°C ∞

El amplicón obtenido tras la primera amplificación tiene 737 pb.

Tras la primera amplificación el amplicón obtenido se filtra a través de columnas MiniElute™ PCR purification Kit 50 (Quiagen REF 28004) para evitar la aparición de amplificaciones inespecíficas tras la segunda amplificación. El volumen de elución de la columna debe ser de 15-20 µL. El amplicón final obtenido tiene 587 pb, que se visualizará en un gel de agarosa al 2%. (Figura 24)

M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 M8 M9 M10 Mpb



M1: amplicón 587 pb. M6: no se consigue amplificación. M7: muestra banda amplificación inespecífica

Figura 24: Gel de agarosa del amplicon final resultado de la PCR anidada

C.2. Secuenciación y análisis de resultados

Los amplicones generados en la nested PCR se secuenciaron en Macrogen. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia de referencia NC_001526.2 (que se corresponde con una secuencia E6 350T sin mutaciones) con el programa CLC Sequence Viewer 6 (Figura 25, 26 y 27).

En cada una de las secuencias problema se identificaron las posiciones clave para la clasificación genética de la variante viral siguiendo los criterios descritos en la bibliografía (Antonio Huertas-Salgado et al. E6 molecular variants of human papillomavirus type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology* 410 (2011) 201-215) (53).

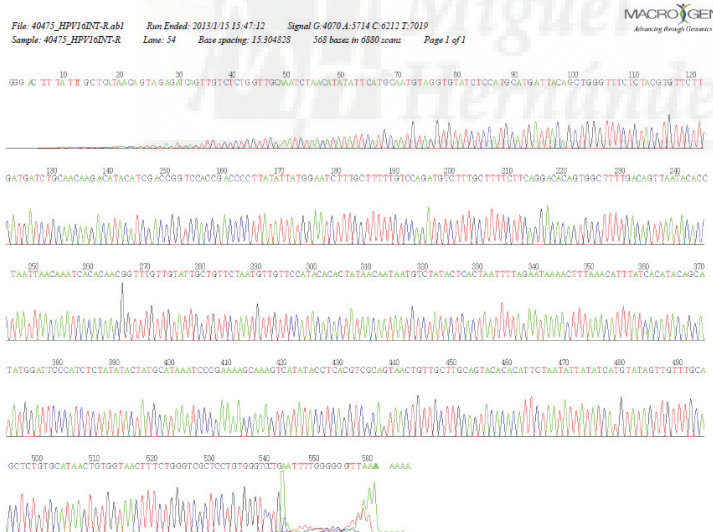


Figura 25: Cromatograma obtenido en la secuenciación de una de las muestras problema.

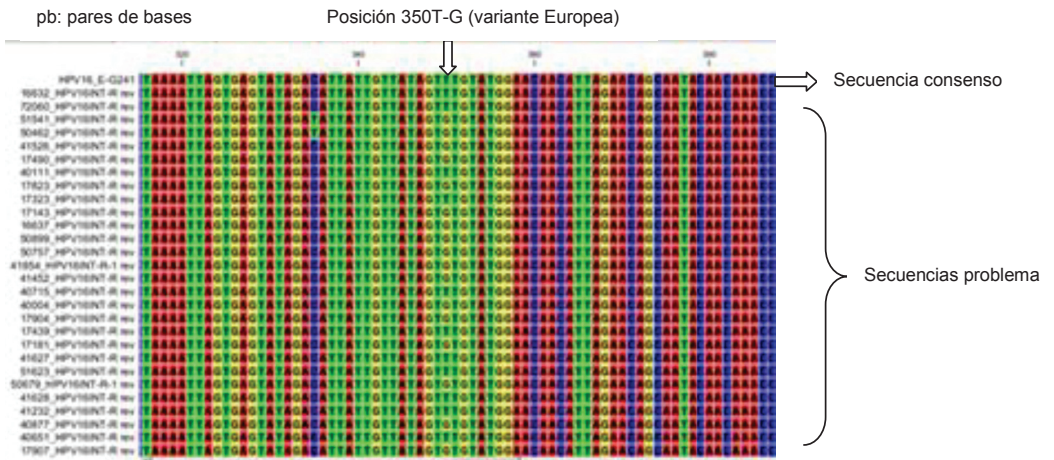


Figura 26: Aliación de las secuencias problema con la secuencia consenso con el programa CLC Sequence Viewer 6.



6.7. Fuentes de información y técnicas de recolección

Base de datos

Se contó con una base de datos excel denominada “Estudio del VPH”, la cual contiene información acerca de las características sociodemográficas, factores de riesgo, hallazgos citológicos y resultados de detección de infección por VPH, de las mujeres que se incluyeron en el estudio.

A las pacientes con infección por VPH genotipo 16 se les realizó una encuesta telefónica con el objeto de obtener información sobre el comportamiento sexual y determinados hábitos considerados factores de riesgo en el desarrollo de lesiones histopatológicas de alto grado por papilomavirus. Dicho cuestionario fue aplicado por personal de la salud capacitado para tal fin; en este caso por Facultativos Especialistas del Servicio de Ginecología del Hospital General Universitario de Elche. También se obtuvieron datos de paridad y antecedentes de infección por VHS 2 o *Chlamydia trachomatis*.

6.8. Variables

En el desarrollo del proyecto fueron consideradas las siguientes variables:

Sociodemográficas

- Edad
- Etnia

Factores de riesgo relacionados con el huésped

- Consumo de tabaco: Sí o No
- Número de compañeros sexuales: >4: Sí o No
- Edad primera relación sexual: <16 años: Sí o No
- Número de Gestaciones: >4: Sí o No
- Antecedente de aborto: Sí o No

- Antecedentes de Infecciones de transmisión sexual (ITS): VHS 2, *Chlamydia trachomatis*: Sí o No

Anormalidad cervical

Resultado citología: Las lesiones se clasificaron en “No lesión de alto grado” (citología negativa para lesión intraepitelial, ASCUS/AGC, ASCH o LSIL) versus “Lesión de alto grado” (HSIL, carcinoma escamoso, adenocarcinoma in situ o adenocarcinoma)

Virus del Papiloma Humano

- Infección por VPH : 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108: Sí o No
- Infección múltiple (infección por dos o más genotipos de AR o BR): Sí o No
- Coinfección (infección por dos o más genotipos de AR): Sí o No

Se clasificaron los genotipos VPH de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud y the World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs Working Group assessment of the carcinogenicity of different VPH types (4, 138, 139): 13 de Alto Riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 de Probable Alto Riesgo (53, 66, 70, 73 MM9 y 82 MM4)

- Número de tipos virales: También categorizada en ≤ 3 tipos y >3 tipos.
- Carga viral relativa de VPH 16 : Valor
- Variante E350T: Sí o No
- Variante E350G: Sí o No
- Variante As: Sí o No

- Variante AA: Sí o No
- Variante NA: Sí o No
- Variante Af: Sí o No

6.9. Calidad del dato. Control de sesgos y errores

La recolección de la información fue realizada por profesionales pertenecientes a los diferentes servicios que participaban en el estudio (Microbiología, Anatomía Patológica, Ginecología), quienes previamente realizaron una revisión bibliográfica extensa para concretar que variables recoger.

Para evitar el sesgo de selección en el caso de tener dos muestras de la misma paciente se seleccionaba la que había entrado en primer lugar en el estudio.

La muestra utilizada para caracterizar la patología cervical fue la citología convencional exclusivamente, no se tuvieron en cuenta los resultados de las pacientes de las que solo teníamos estudio histológico de biopsia cervical.

Las citologías de las pacientes que presentaban genotipo 16 fueron reevaluadas por dos facultativos de Anatomía Patológica con el objeto de minimizar la variabilidad interobservador del examen, sobre todo en el caso de lesiones ASCUS.

Las muestras de epitelio cervical (cepillado endocervical y frotis citológico) fueron tomadas por personal de la salud con conocimiento y entrenamiento para tal fin siguiendo metodologías reconocidas y aplicadas. Las muestras de cepillado endocervical fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento para asegurar su conservación.

Las técnicas de biología molecular para la extracción de ADN, carga viral genotipo 16 y variante viral, fueron realizadas por profesionales de biología, bioquímica y/o microbiología con conocimiento y entrenamiento en éstas técnicas, siguiendo protocolos previamente diseñados y/o las instrucciones proporcionadas por las casas comerciales. Los protocolos y condiciones de la

PCR a tiempo real, PCR anidada diseñados en el laboratorio fueron estandarizados previa realización.

Los procedimientos relacionados con el diseño de cebadores y sondas se realizaron teniendo en cuenta reportes previos de la literatura, y haciendo uso de softwares existentes para tal fin. La estandarización de los protocolos y condiciones de la PCR en tiempo real, para el genotipo 16 y para el gen de la albúmina, fue llevada a cabo posterior a la revisión de artículos científicos y de revisión sobre PCR en tiempo real. Para asegurar una técnica óptima, se realizaron múltiples ensayos, empleando un rango dinámico de concentraciones (6 puntos de diluciones seriadas 1:10). Se construyeron curvas estándar, poniendo por triplicado cada una de las diluciones. Para lo anterior, se procuró alcanzar valores adecuados de eficiencia (0,90 – 1,10), correlación (0,926 – 0,995) y precisión.

Para el análisis de la carga viral del genotipo 16 se excluyeron las muestras en las que el control de celularidad (gen de la albúmina) no amplificó.

Para el control de variables de confusión, desde el diseño del estudio, se realizó ajuste por edad y raza.

6.10. Análisis estadístico

Para las variables categóricas y discretas se estimaron proporciones utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson para realizar comparaciones, el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Las variables cuantitativas se expresaron en forma de media y desviación estándar [DE] usando la t de Student para las comparaciones, previa comprobación de la normalidad de las mediante la prueba de Saphiro-Wilk.

Las lesiones histológicas se clasificaron en “No lesión de alto grado (citología negativa para lesión intraepitelial, ASCUS/AGC, ASCH o LSIL)” versus “lesión de alto grado” (HSIL, carcinoma escamoso, adenocarcinoma in situ o adenocarcinoma), siendo tratada como variable dependiente en los modelos de regresión logística.

Como medida de asociación se estimaron Odds Ratios crudas (ORc) mediante regresión logística no condicional, junto con sus Intervalos de Confianza al 95% (IC95%), así como Odds Ratios ajustadas (ORa) por edad (variable continua) y estatus inmigrante.

Como medida de impacto en relación a las coberturas vacunales de los genotipos, se calculó la 'Fracción Atribuible ajustada en los expuestos (AFE-ajustada)' mediante la fórmula ('ORa - 1' / ORa), junto con su IC95% mediante la fórmula [('Límite inferior IC95% de la ORa - 1' / Límite inferior IC95% de la ORa) a ('Límite superior IC95% de la ORa - 1' / Límite superior IC95% de la ORa)] cuando la ORa fue estadísticamente significativa.

De cara al estudio de la infección única o múltiple del genotipo 16, de la infección por las diferentes variantes virales del genotipo 16 y de la carga viral de la infección, la muestra se restringió las mujeres con infección por al menos el genotipo 16, y tanto la variante como la carga viral se incluyeron como covariables en los modelos de regresión logística.

El error alfa se fijó en 0.05 y todas las p fueron bilaterales. Todos los análisis estadísticos se hicieron con el paquete SPSS v22.00



RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de la infección cervical

7.1.1 Riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma para el genotipo 16, 18 y resto de genotipos de alto riesgo.

Durante el período de estudio, se procesaron para diagnóstico de infección cervical por VPH 1.363 muestras de cepillado endocervical, de las cuales 595 resultaron positivas, lo que se corresponde con un 43% de las mujeres.

De las 595 mujeres que conforman la población a estudio (pacientes con infección cervical por VPH), se cuenta con la información de la lesión citológica que presentaban 587.

La media de edad de las mujeres de la muestra fue de 34,34 años [DE 10,70]. El 89,75% eran españolas.

En el 73% de las mujeres se detectó al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico (Tabla 10). El genotipo 16 fue el más frecuente (30,08%). Los genotipos 16 y/o 18 se detectaron en el 35,46% de las mujeres.

Tras el genotipo 16, los genotipos aislados en mayor proporción fueron el 52 (14,29%), el 51 (11,6%) y 31(9,41%).

Tabla 10. Prevalencia global de genotipos de alto riesgo y probable alto riesgo del VPH en las mujeres que conforman la población a estudio (pacientes con infección cervical por VPH).

Genotipos VPH de AR	TOTAL			
	n= 595	%	IC	95%
16	180	30,08	26,32	33,85
52	85	14,29	11,39	17,18
51	69	11,6	8,94	14,25
31	56	9,41	6,98	11,84
56	55	9,24	6,83	11,66
39	46	7,73	5,5	9,96
58	37	6,22	4,19	8,24
18	32	5,38	3,48	7,28
33	27	4,71	2,92	6,49
59	28	4,71	2,92	6,49
45	18	3,03	1,57	4,49
35	17	2,86	1,43	4,28
68	13	2,19	0,93	3,44

Clasificación de los tipos de VPH de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monografías Grupo de Trabajo de evaluación de la carcinogenicidad de los diferentes tipos de VPH (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009)

En los diagramas de barras que se muestran a continuación podemos ver los genotipos de AR y probable AR más prevalentes, en global y aislados según el grado de lesión histopatológica en nuestra serie de pacientes. (Figuras de la 28 a la 33).

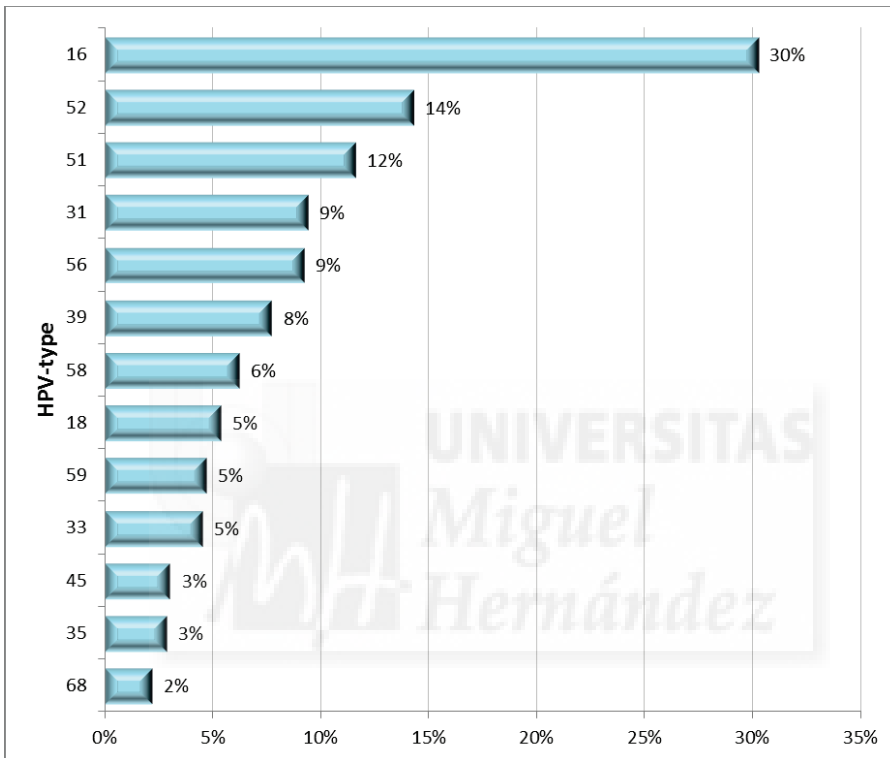


Figura 28: Porcentaje de genotipos detectados en las mujeres que conforman la población a estudio (pacientes con infección cervical por VPH).

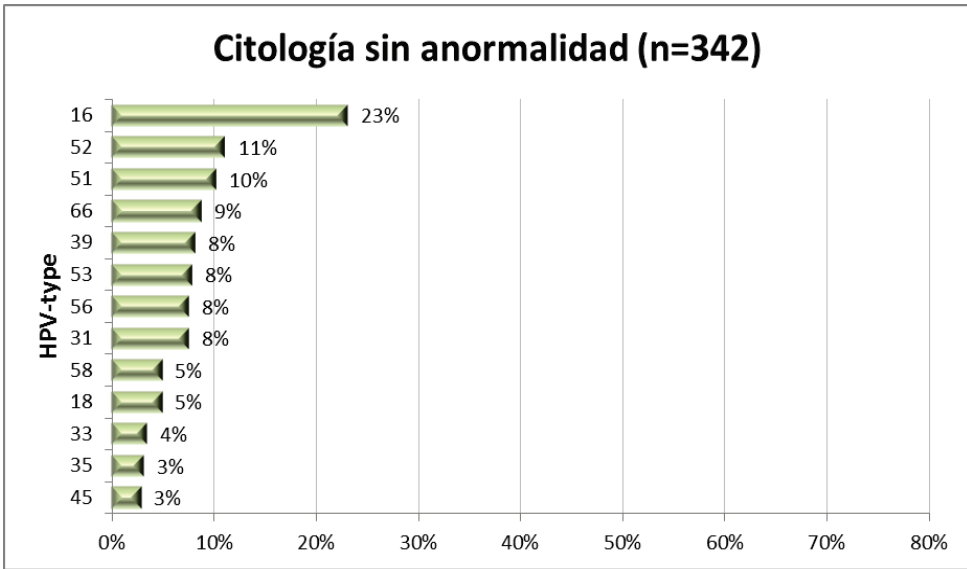


Figura 29: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con citología normal

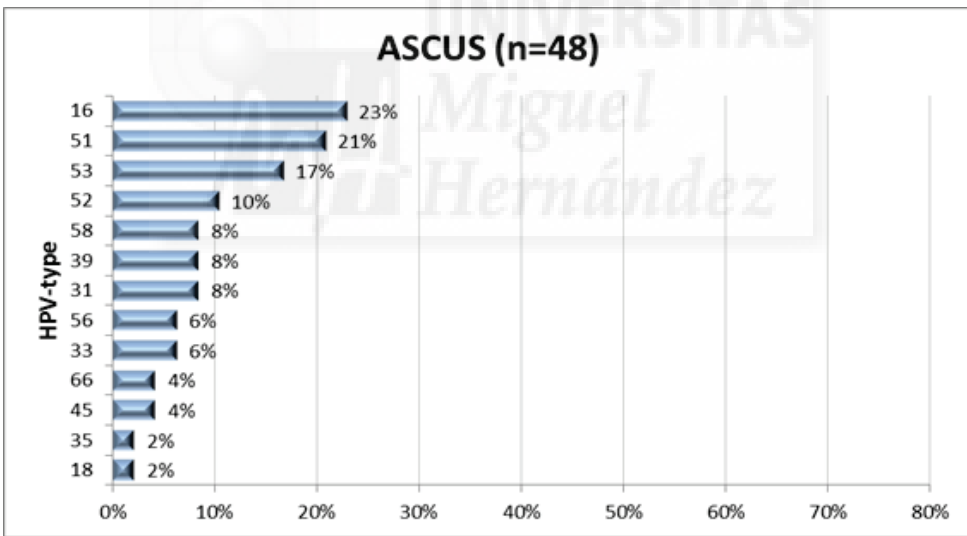


Figura 30: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con ASCUS

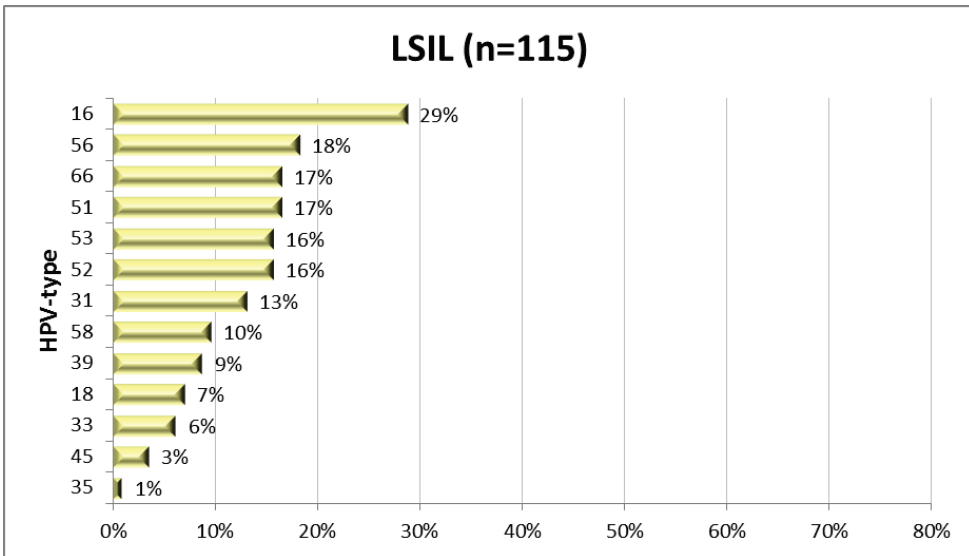


Figura 31: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con LSIL

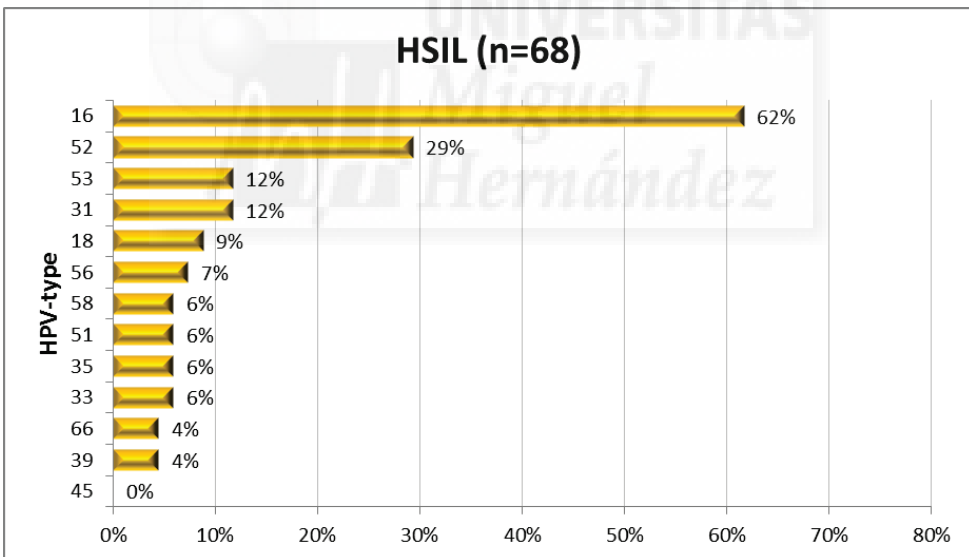


Figura 32: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con HSIL

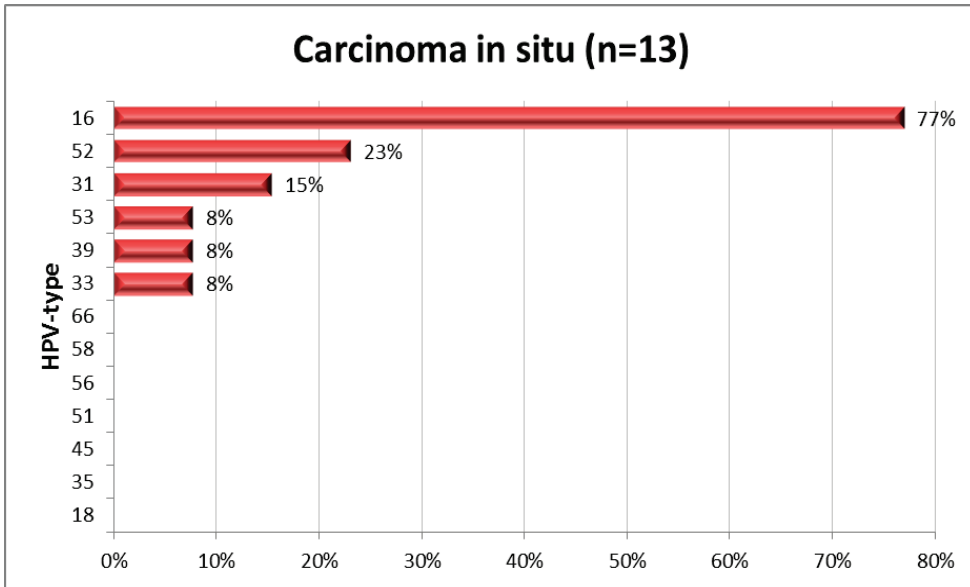


Figura 33: Porcentaje de genotipos detectados en pacientes con carcinoma in situ

El porcentaje de mujeres que presentaron al menos una citología con alteración morfológica (ASCUS/ASCH, LSIL, HSIL, carcinoma escamoso, adenocarcinoma in situ o adenocarcinoma) en el total de la muestra fue del 41,36%. La prevalencia de atipias de ASCUS/ASCH fue del 8,14%; [IC95% 5,85-10,43], LSIL 19,49%; [IC95% 16,21-22,77], HSIL 11,53%; [IC95% 8,86-14,19] y la prevalencia de lesiones cancerosas 2,20%; [IC95% 0,93-3,47] (Tabla 11).

Tabla 11: Características de la población estudiada: edad, país de origen, distribución de los genotipos del VPH y clasificación histológica de los frotis vaginales

	Total			
	n=595	%	IC	95%
Edad (años): Media [DE]	34.34	[10.70]	33.48	35.20
País de origen				
España	534	89.75	87.23	92.27
Otros	61	10.25	7.73	12.77
Número de VPH de bajo riesgo*				
1 genotipo	200	33.61	29.73	37.49
2 genotipos	63	10.59	8.03	13.15
3 genotipos	15	2.52	1.18	3.87
4 genotipos	6	1.01	0.12	1.90
Número de VPH de probable alto riesgo*				
1 genotipo	154	25.88	22.28	29.49
2 genotipos	12	2.02	0.80	3.23
3 genotipos	1	0.17	0.00	0.93
Número de VPH de alto riesgo*				
1 genotipo	268	45.04	40.96	49.12
2 genotipos	122	20.50	17.18	23.83
3 genotipos	30	5.04	3.20	6.88
4 genotipos	14	2.35	1.05	3.66
5 genotipos	1	0.17	0.00	0.93
Resultados citología vaginal**				
NILM***	272	46.10	42.00	50.21
Inflamación	70	11.86	9.17	14.56
condilomas	1	0.17	0.00	0.94
ASCUS/ASCH	48	8.14	5.85	10.43
LSIL	115	19.49	16.21	22.77
HSIL	68	11.53	8.86	14.19
Carcinoma/Adenocarcinoma	13	2.20	0.93	3.47
No valorable	3	0.51	0.11	1.48
Perdidos	5			

*Clasificación de los tipos de VPH de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monografías Grupo de Trabajo de evaluación de la carcinogenicidad de los diferentes tipos de VPH (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009)

** Clasificación lesión citológica Sistema Bethesda 2001

*** Negativos para lesión intraepitelial o malignidad.

7.1.2. Infección múltiple

En la [Figura 34](#) se muestran los episodios de infección múltiple VPH (infección por dos o más genotipos virales de AR o BR) en función del rango de edad de las pacientes. Del total de las mujeres infectadas, cerca del 55% presentaron infección por más de un tipo viral.

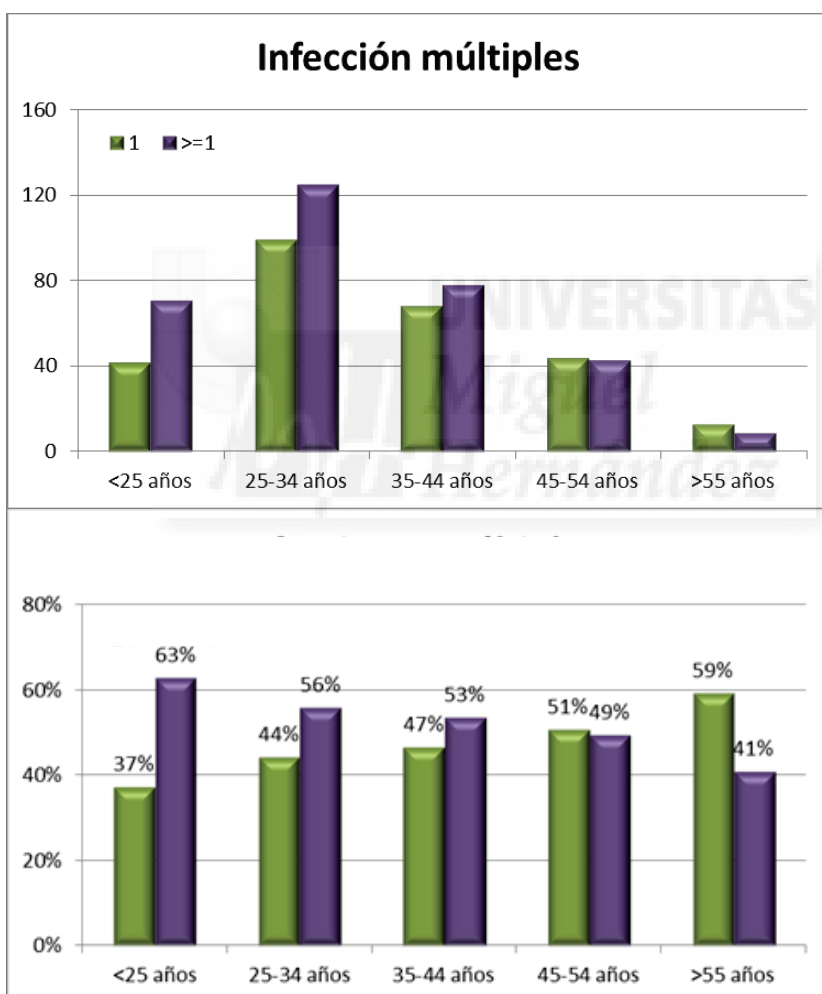


Figura 34: Episodios de infección múltiple VPH en función del rango de edad expresado en número total y porcentaje.

Con respecto a los porcentajes de coinfección (infección por 2 o más genotipos de AR) observamos porcentajes mucho menores, cercanos al 28. En la [Figura 35](#) se muestran los episodios de coinfección viral en función de diferentes rangos de edad.

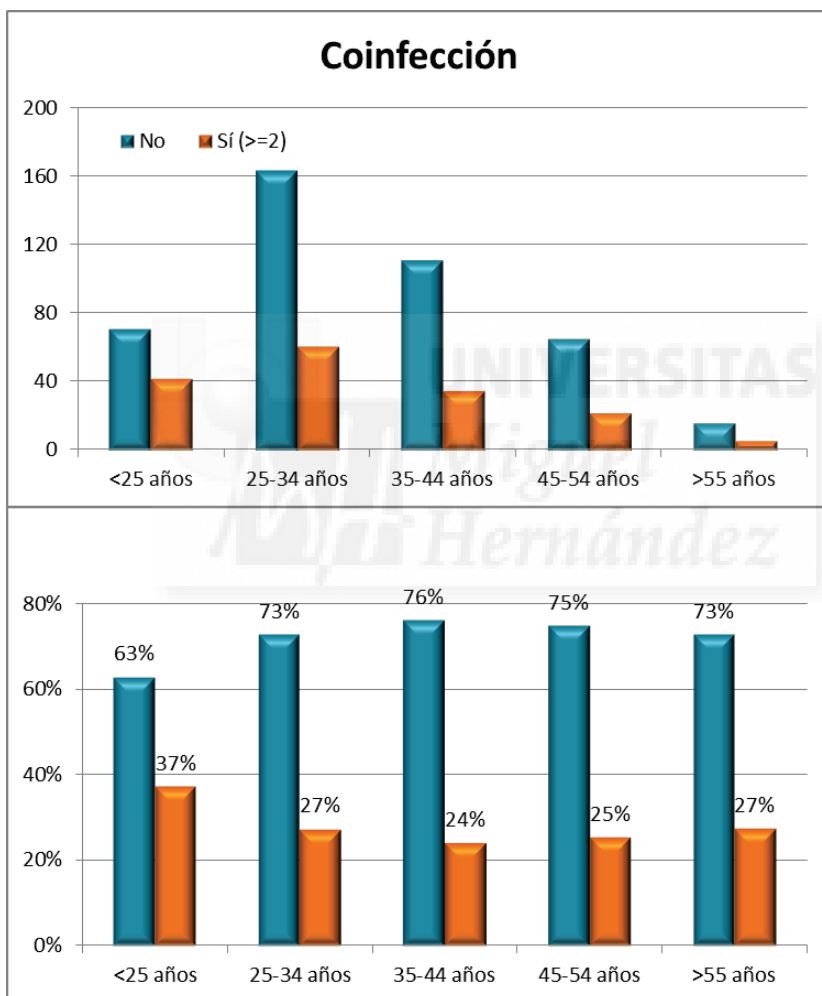


Figura 35: episodios de coinfección (infección por al menos dos genotipos de AR) VPH en función de los rangos de edad expresados en número total y porcentaje

Aunque no hay asociación entre los diferentes rangos de edad e infección múltiple; si que encontramos una relación lineal, en la que se observa que la infección múltiple va siendo menos prevalente cuanto mayor es la edad de la paciente ($p = 0,019$)

El porcentaje de infección múltiple y coinfección se observó con mayor frecuencia en mujeres menores de 25 años; en las que se detecta infección múltiple en el 63% y coinfección en el 37%.

No se encontró asociación entre infección múltiple coinfección y lesión histopatológica de alto grado.



6.1.3. Lesión intraepitelial de alto grado y genotipos virales.

En la [Tabla 12](#) se presentan las asociaciones crudas y ajustadas entre el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma y la infección por genotipos del papilomavirus de alto riesgo oncológico, en las 595 mujeres estudiadas. Se observa la clara relación entre la detección de genotipos de AR y la presencia de lesiones de alto grado.

El genotipo 16 fue el genotipo asociado de forma más fuerte con el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma: OR ajustada por edad e inmigración 12,02; IC95% (4,92-29,39). La asociación para este genotipo fue muy superior a la del genotipo 18: OR ajustada 3,94; IC95% (0,9-17,24) o a la asociación del resto de genotipos de alto riesgo en su conjunto: OR ajustada 2,68; IC95% (1,04-6,93).



Tabla 12: Asociaciones crudas y ajustadas entre el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma y la infección por genotipos del VPH de alto riesgo oncológico.

Genotipos de VPH	No lesión de alto grado o carcinoma*		HSIL n=81		ORc	IC	95%	ORa	IC	95%
	n=509	154	6	1						
Ninguno de alto riesgo**										
Genotipo 16	123		52		10,85	4,51	26,1	12,02	4,92	29,39
Genotipo 18	24		3		3,21	0,75	13,69	3,94	0,9	17,24
Otro genotipo de alto riesgo	208		20		2,47	0,97	6,29	2,68	1,04	6,93

*Resultados de clasificación histológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

** Clasificación de los genotipos de papilomavirus de alto riesgo oncológico de acuerdo con las últimas guías internacionales (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009).

ORc: Odds Ratio cruda.

ORa: Odds Ratio ajustada edad (continua) e inmigración

7.2. Características de la muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16.

7.2.1. Caracterización viral e histopatológica de infección por VPH 16

El estudio, tanto de la variante como de la carga viral en el grupo de mujeres infectadas por el genotipo 16 (176 pacientes) se pudo realizar en 141 y 150 pacientes respectivamente.

La media de edad fue de 34,34 años [DE 11,35]. El 88,51% eran españolas.

Un 47,73% (n=84) presentaron infección por más de un genotipo de alto riesgo tipo viral. Los tipos virales de AR más frecuentes en infecciones múltiples se muestran en la [Tabla 13](#), siendo la coinfección con el genotipo 52 la más frecuente.

Tabla 13: Clasificación de los genotipos de VPH AR oncológico detectados en las mujeres infectadas por el genotipo 16.

Genotipos de VPH	Genotipo 16			
	n=176	%	IC	95%
Alto riesgo*				
16	176	100,00	97,93	100,00
18	6	3,41	0,44	6,37
31	13	7,39	3,24	11,54
33	9	5,11	1,58	8,65
35	1	0,57	0,01	3,13
39	5	2,84	0,93	6,51
45	7	3,98	0,81	7,15
51	14	7,96	3,67	12,24
52	39	22,16	15,74	28,58
56	16	9,09	4,56	13,62
58	9	5,11	1,58	8,65
59	4	2,27	0,62	5,72
68	3	1,71	0,35	4,90
Probable Alto riesgo				
53	11	6,25	2,39	10,11
66	14	7,96	3,67	12,24

70	2	1,14	0,14	4,04
73	13	7,39	3,24	11,54
82	2	1,14	0,14	4,04

* Clasificación de los genotipos de papilomavirus de alto riesgo oncológico de acuerdo con las últimas guías internacionales (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009)

El porcentaje de mujeres que presentaron al menos una citología con alteración morfológica (ASCUS/ASCH, LSIL, HSIL, carcinoma) fue del 51,14%. La prevalencia de atipias de ASCUS/ASCH fue del 7,39%; [IC95% 3,24-11,54], LSIL 17,61%; [IC95% 11,70-23,53], HSIL 21,59%; [IC95% 15,23-27,95] y la prevalencia de lesiones cancerosas 4,55%; [IC95% 1,18-7,91]. (Tabla 14)

Tabla 14: Características de muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16: edad, país de origen, distribución de los genotipos VPH en infección múltiple y clasificación histológica de los frotis vaginales.

		Genotipo 16			
Resultados por mujer		n=176	%*	IC	95%
Edad: Media [DE]		34,34	[11,35]	rango: 17-76 años	
Nacionalidad					
	España	154	88,51	83,48	93,53
	Otros	20	11,49	6,47	16,52
	Perdidos	2			
Nº de genotipos de alto riesgo aislados**					
16)	1 solo genotipo (únicamente VPH)	92	52,27	44,61	59,94
	2 genotipos	54	30,68	23,58	37,78
	3 genotipos	18	10,23	5,47	14,99
	4 genotipos	12	6,82	2,81	10,83
Nº de genotipos de probable alto riesgo aislados además del genotipo 16**					
	Ningún genotipo	140	79,55	73,30	85,79
	1 genotipo	30	17,05	11,21	22,89
	2 genotipos	6	3,41	0,44	6,37
Nº de genotipos de bajo riesgo además del genotipo 16**					
	Ningún genotipo	119	67,61	60,42	74,81
	1 genotipo	37	21,02	14,72	27,33
	2 genotipos	15	8,52	4,11	12,93
	3 genotipos	4	2,27	0,62	5,72
	4 genotipos	1	0,57	0,01	3,13

Resultados AP***

Negativo****	49	27,84	20,94	34,75
Inflamación	28	15,91	10,22	21,60
ASCUS	13	7,39	3,24	11,54
LSIL	31	17,61	11,70	23,53
HSIL	38	21,59	15,23	27,95
Carcinoma in situ	8	4,55	1,18	7,91
Muestra no valorable	9	5,11	1,58	8,65

*Porcentaje válido sin valores desconocidos.

** Clasificación de los genotipos de papilomavirus de alto riesgo oncológico de acuerdo con las últimas guías internacionales (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009)

***Resultados de clasificación lesión citológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

****Negativo para lesión intraepitelial o malignidad.

En la [Tabla 15](#) se muestra la distribución de los diferentes genotipos VPH aislados en las pacientes con infección por VPH 16 en función de la lesión que presentaban nuestras pacientes.



Tabla 15: Características de la distribución de los genotipos del papilomavirus restringiendo la muestra a las mujeres infectadas por el genotipo 16 según la clasificación histopatológica de Bethesda

Pacientes	Negativo*			Inflamación**			ASCUS**			LSIL**			HSIL**			Carcinoma in situ**								
	n=49	%	IC	95%	n=28	%	IC	95%	n=13	%	IC	95%	n=31	%	IC	95%	n=38	%	IC	95%	n=8	%	IC	95%
Genotipos VPH además del VPH 16																								
Bajo riesgo	13	26,53	13,15	39,91	13	46,43	26,17	66,69	1	7,69	0,20	36,03	16	51,61	32,41	70,82	9	23,68	8,85	38,52	2	25,00	3,19	65,09
Probable AR	8	16,33	4,96	27,70	6	21,43	8,30	40,95	3	23,08	5,04	53,81	9	29,03	11,44	46,62	7	18,42	4,78	32,06	2	25,00	3,19	65,09
Alto Riesgo																								
1 sólo AR (16)	29	59,18	44,40	73,97	13	46,43	26,17	66,69	5	38,46	13,86	68,42	16	51,61	32,41	70,82	17	44,74	27,61	61,86	8	100,00	63,06	100,00
2 AR	13	26,53	13,15	39,91	8	28,57	10,05	47,09	5	38,46	13,86	68,42	8	25,81	8,79	42,82	16	42,11	25,09	59,12	0			
3 AR	6	12,25	2,05	22,44	2	7,14	0,88	23,50	2	15,39	1,92	45,45	4	12,90	3,63	29,83	3	7,90	1,66	21,38	0			
4 AR	1	2,04	0,05	10,85	5	17,86	6,06	36,89	1	7,69	0,20	36,03	3	9,68	2,04	25,75	2	5,26	0,64	17,75	0			

Clasificación de los genotipos de papilomavirus de alto riesgo oncológico de acuerdo con las últimas guías internacionales (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009)

El 34,7% de las pacientes infectadas por el genotipo 16 presentaron una infección simple por este genotipo viral.

En cuanto a las variantes virales más prevalentes, tanto en infección única como múltiple, fueron la Europea E350G y la Europea E350T, presente en el 42,1% y 33,5% de las pacientes respectivamente.

En cuanto a carga viral la mediana estuvo en 1367,78 copias/célula, con un rango intercuartil (127,41-35645,39). En la [Tabla 16](#) se presentan los datos de prevalencia de infección única o múltiple, de las variables virales detectadas y carga viral del genotipo 16.

Tabla 16: Características de la muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16: infección única o múltiple, variante y carga viral VPH 16.

Resultados por mujer				
Genotipo 16	n=176	%	IC	95%
Infección				
Solo genotipo 16	61	34,66	27,34	41,97
Genotipo 16 + otros genotipos*	115	65,34	58,03	72,66
Subtipo genotipo 16 (variante)				
Europea E350T	59	33,52	26,26	40,78
Europea E350G	74	42,05	34,47	49,62
Asiática americana AA	4	2,27	0,62	5,72
Africana Af1	1	0,57	0,01	3,13
Africana Af2	3	1,71	0,35	4,9
Missing	35	19,89	13,71	26,07
Carga viral genotipo 16				
Primer cuartil	127,41			
Segundo cuartil (Mediana)	1367,78			
Tercer cuartil	35645,39			

*Infección de genotipo 16 con otro genotipo de alto riesgo, probable alto riesgo o bajo riesgo oncológico. Clasificación de los genotipos de papilomavirus de alto riesgo oncológico de acuerdo con las últimas guías internacionales (Muñoz N et al., 2003; IARC Group, 2007; Schiffman M et al., 2009).

7.2.2. Asociaciones crudas y ajustadas para el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, en la muestra de mujeres infectadas por el genotipo 16.

En la [Tabla 17](#) se presentan las asociaciones crudas y ajustadas por edad, estatus inmigrante y riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Tanto la edad como el estatus inmigrante se asociaron de forma independiente a un mayor riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Por cada aumento de 10 años, el riesgo de lesión fue 2,35 veces mayor, con independencia de la carga viral o variante viral detectada, IC95% (1,40-3,94).

Asimismo el estatus inmigrante se asoció de forma independiente con un aumento de 4,31 veces del riesgo de lesión de alto grado, IC95% (1,06-17,51).

[Tabla 17: Asociaciones crudas y ajustadas entre la edad, el estatus inmigrante y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.](#)

	No lesión de alto grado		HSIL o carcinoma*			
	ORc	IC	95%	ORa	IC	95%
Edad (x cada 10 años)	1,84	1,34	2,52	2,35	1,40	3,94
Inmigración	2,70	1,02	7,15	4,31	1,06	17,51

*Resultados de clasificación histológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

ORc: Odds Ratio cruda.

ORa: variables incluidas en el modelo edad, inmigración, subtipo y carga viral.

La infección múltiple, se asoció a un aumento ligero del riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma tras ajustar por edad y estatus inmigrante, pero la asociación no llegó a alcanzar significación estadística: OR ajustada 1,42; IC95% (0,64-3,13), p = 0,384. ([Tabla 18](#)).

Tabla 18: Asociaciones crudas y ajustadas entre infección única por el genotipo 16 o múltiple, y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Genotipos de VPH	No lesión de alto riesgo		HSIL o carcinoma*		IC	95%	ORa	IC	95%
	n=121	n=46	ORc	IC					
Genotipo 16 infección única	43	15	1	1			1		
Genotipo 16 en infección múltiple	78	31	1,14	0,55	2,34	1,42	0,64	3,13	
<i>p de significación</i>			0,723				0,384		

*Resultados de clasificación histológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

ORc: Odds Ratio cruda.

ORa: Odds Ratio ajustada edad (continua) e inmigración.

En el estudio entre la infección por las distintas variantes del genotipo 16, y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, tras tratar cada variante viral como una variable independiente, se observó de forma cruda, que la infección por la variante Asiática americana se asoció a un aumento de 2,64 veces el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, en comparación con la infección por el resto de subtipos (tratados como categoría de referencia). Al ajustar por edad y estatus inmigrante esta asociación no se daba (OR ajustada = 0,99). (Tabla 19)



Tabla 19: Asociaciones crudas y ajustadas entre la infección por las distintas variantes del genotipo 16, y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Genotipo 16: Subtipo viral**	No lesión de alto grado		HSIL o carcinoma*		ORc	IC	95%	p	ORa	IC	95%	p
	n=97	n=38	n=38	n=38								
Europea E350T	41	14	0,80	0,37	1,73	0,564	1,16	0,49	2,77	0,733		
Europea E350G	51	21	1,11	0,52	2,37	0,779	1,04	0,45	2,42	0,932		
Africana Af1/ Af2	3	1	0,85	0,09	8,40	0,887	0,19	0,01	3,11	0,246		
Asiática americana AA	2	2	2,64	0,36	19,44	0,341	0,99	0,10	10,02	0,993		

*Resultados de clasificación histológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

**Cada subtipo viral es tratado como una variable independiente. El resto de subtipos se trata como categoría de referencia para cada variable.

ORc: Odds Ratio cruda.

ORa: Odds Ratio ajustada por edad (continua) e inmigración.

Tratando la variante Europea E350T como categoría de referencia, la infección por la variante Asiática americana se asoció a un aumento de 2,93 veces el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma. Al ajustar por edad y estatus inmigrantes esta asociación no se encontró (OR ajustada = 0,99). (Tabla 20)



Tabla 20: Asociaciones crudas y ajustadas entre la infección por los distintos subtipos de genotipo 16 y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, tratando la variante Europea E350T como categoría de referencia.

Genotipo 16: subtipo viral	No lesión de alto grado n=97		HSIL o carcinoma* n=38		ORc	IC	95%	ORa1	IC	95%	ORa2	IC	95%
	n=97	n=38	n=38	n=97									
Europea E350T	41	14	1					1			1		
Europea E350G	51	21	1,21	0,55			2,66	0,93	0,38	2,26	1,04	0,38	2,85
Africana Af1/ Af2	3	1	0,98	0,09			10,17	0,18	0,01	3,13	0,14	0,01	2,77
Asiática americana AA	2	2	2,93	0,38			22,79	0,85	0,08	9,67	0,85	0,03	23,88

*Resultados de clasificación histológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

ORa1: Odds Ratio ajustada por edad (continua) e inmigración.

ORa2: Odds Ratio ajustada por edad (continua) e inmigración y carga viral en terciles.

En la [Figura 36](#) se presenta un diagrama de cajas de la carga viral del genotipo 16, en función de la existencia o no, de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, en el que la carga viral se presenta en escala logarítmica. Tanto la mediana como el primer y último tercil fueron superiores en las pacientes con lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Las asociaciones crudas y ajustadas entre la carga viral de la infección por el genotipo 16 y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma se muestran en la [Tabla 21](#).

Se observó que el hecho de tener una carga viral por encima de la mediana ($>1367,79$ copias/célula), se asoció de forma cruda con un aumento del riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma de forma significativa OR cruda 8,17; IC95% (3,13-21,31).

La carga viral además mostró un patrón dosis respuesta estadísticamente significativo al categorizar la carga viral ordinalmente en base a tertiles, p de tendencia lineal $<0,001$, OR cruda ultimo tercil 16,67; IC95% (4,55-61,03). Estas asociaciones se mantuvieron tras ajustar por edad y estatus inmigrante: OR ajustadas=7,35 y 16,34 respectivamente.

La asociación entre la carga viral y el riesgo de lesión intraepitelial, fue asimismo independiente de la variante viral del genotipo 16. ORs ajustadas por subtipo = 8,43 y 17,25 respectivamente.

Por último, para la carga viral se mantuvieron las asociaciones, al incluir todas las covariables en los modelos de regresión multivariante con una OR ajustada (por edad, estatus inmigrante y variable viral del genotipo 16) para una carga superior a la mediana ORa=7,60; IC95% (2,70-21,36), y una OR ajustada para una carga superior al tercer tercil de 16,57; IC95% (4,09-67,06), p de tendencia lineal ajustada $<0,001$.

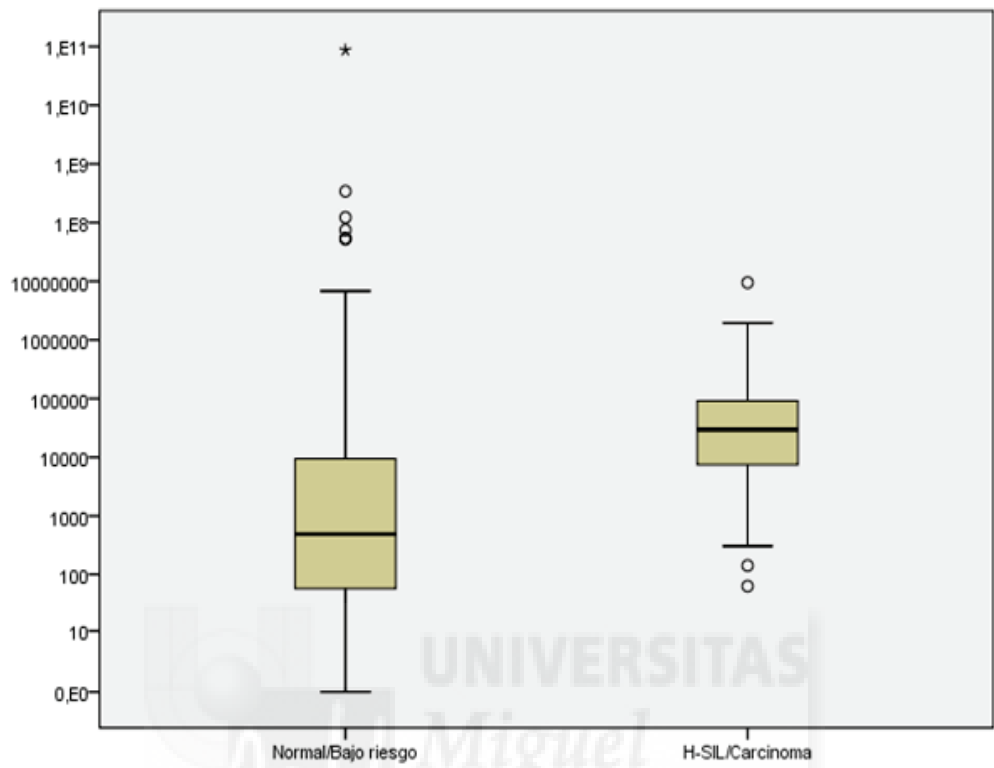


Figura 36: Diagrama de cajas de la carga viral del genotipo 16, en función de la existencia o no, de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Tabla 21: Asociaciones crudas y ajustadas entre la carga viral de la infección por el genotipo 16 y el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.

Genotipo 16: carga viral	No lesión de alto grado		HSIL o carcinoma*		ORc	IC	95%	ORa1	IC	95%	ORa2	IC	95%	ORa3	IC	95%
	n=108	n=36	n=36	n=36												
Mediana																
<= 1367,78	67	6	1	1				1			1			1		
1367,79+	41	30	8,17	3,13	21,31	7,35	2,69	20,07	8,43	3,16	22,45	7,60	2,70	21,36		
p de significación			<0,001			<0,001			<0,001			<0,001				
Tertiles																
<= 305,30	46	3	1			1			1					1		
305,31-11792,11	39	8	3,15	0,78	12,68	2,74	0,65	11,6	3,22	0,785	13,20	2,61	0,60	11,39		
11792,12+	23	25	16,67	4,55	61,03	16,34	4,21	63,49	17,25	4,60	64,74	16,57	4,09	67,06		
p de tendencia lineal			<0,001			<0,001			<0,001			<0,001				

*Resultados de clasificación histológica según clasificación de Bethesda 2001 (86).

ORc: Odds Ratio cruda. ORa1: Odds Ratio ajustada edad (continua) e inmigración ORa2: Odds Ratio ajustada por subtipo viral ORa3: Odds Ratio ajustada por variante viral, edad (continua) e inmigración.

7.2.3 Factores de riesgo

Dentro de la población de mujeres con infección por VPH 16, se dispuso información relativa al comportamiento sexual y otros cofactores de riesgo asociados a CC en 92 de ellas observándose que las mujeres con lesiones de alto grado habían tenido un mayor número de parejas sexuales y sufrido más abortos; resultados estadísticamente significativos ($p= 0,006$ y $p=0,026$ respectivamente). (Tabla 22 y Figuras 37 y 38)



Tabla 22: Distribución de los factores de riesgo relacionados con HSIL-CC de nuestras pacientes

Característica	Categoría	n	%	Mujeres sin lesión de alto grado n (n total)	Mujeres HSIL-CC n (n total)	p
Consumo de tabaco	Sí	36	39,1%	28 (75)	8 (17)	0,458
Nº parejas	>4	32	36,0%	21 (72)	11(17)	0,006
Edad primera relación sexual	<16 años	44	50%	34 (71)	10 (17)	0,418
Gestaciones	>4	4	4,3%	2 (75)	2(17)	0,097
Abortos	Sí	28	30,4%	19 (75)	9 (17)	0,026
VHS 2	Sí	2	2,17%	1 (75)	1 (17)	0,337
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Sí	4	4,34%	2 (75)	2 (17)	0,154

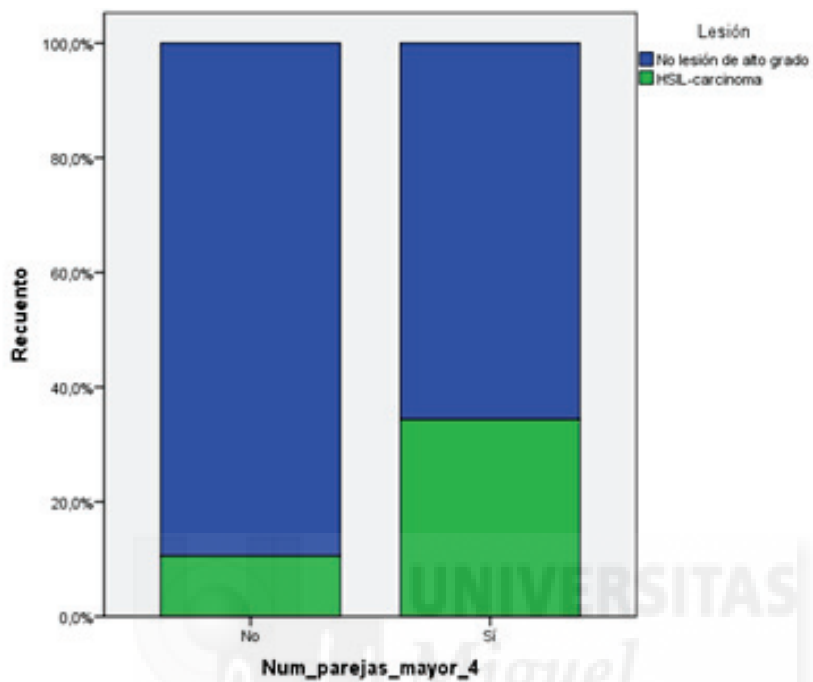


Figura 37: Relación entre las lesiones de alto grado y número de parejas sexuales en las mujeres con VPH 16

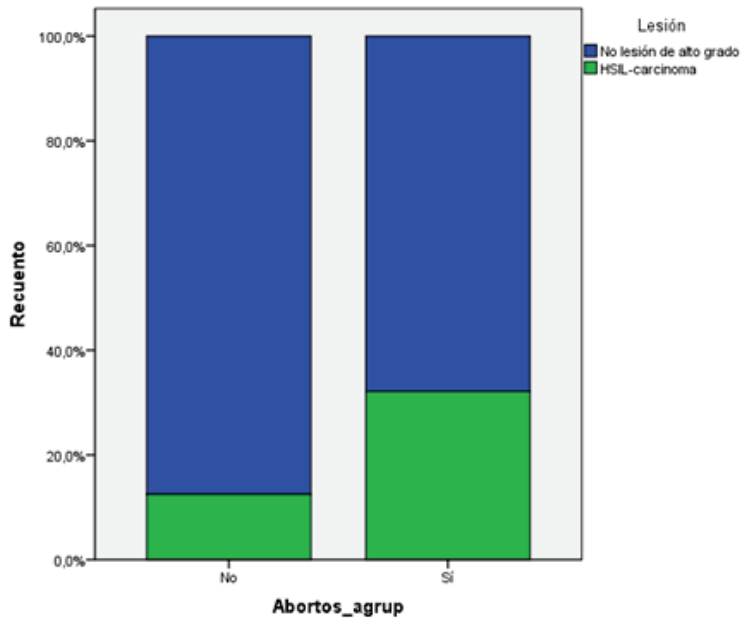


Figura 38: Relación entre las lesiones de alto grado y antecedentes de aborto en las mujeres con VPH 16

En la población inmigrante se observó un porcentaje de exposición a factores de riesgo mayor al de la población autóctona. Estas diferencias fueron significativas para número de gestaciones mayor a 4 ($p < 0,001$) (Tabla 23 y Figura 39) y edad de inicio de las relaciones sexuales menor a 16 años ($p = 0,02$). (Tabla 24 y Figura 40)

Tabla 23: Relación entre origen de la población y número de gestaciones

		Inmigrante		Total
		No	Sí	
Gestaciones >4	No	86 (90,5%)	9 (9,5%)	95
	Sí	1 (20%)	4 (80%)	5
Total		87	13	100

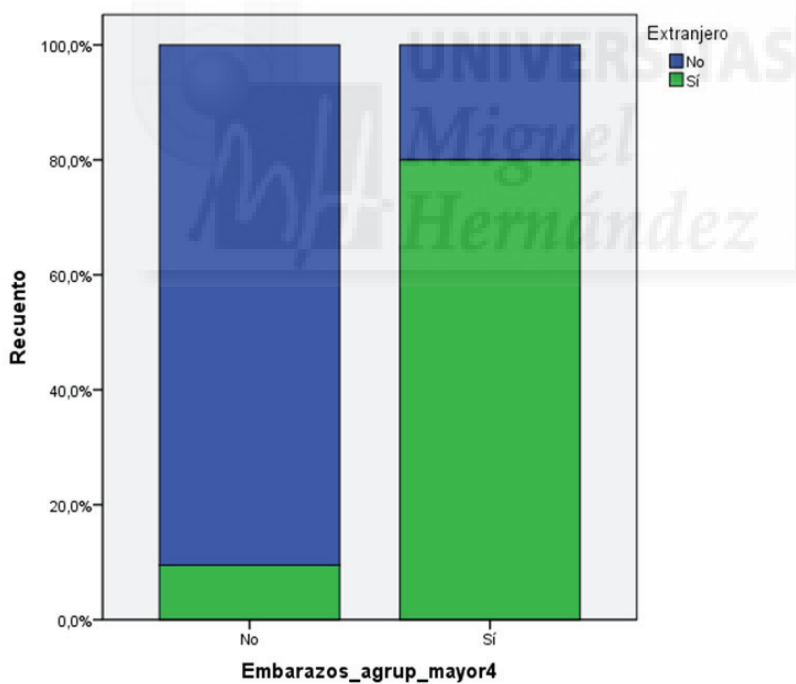


Figura 39: Relación entre origen de la población y número de gestaciones

Tabla 24: Relación entre origen de la población y edad de comienzo de las relaciones sexuales

		Inmigrante		Total
		No	Sí	
Primera relación <16 años	No	48 (94,1%)	3 (5,9%)	51
	Sí	35 (77,8%)	10 (22,2%)	45
Total		83	13	96

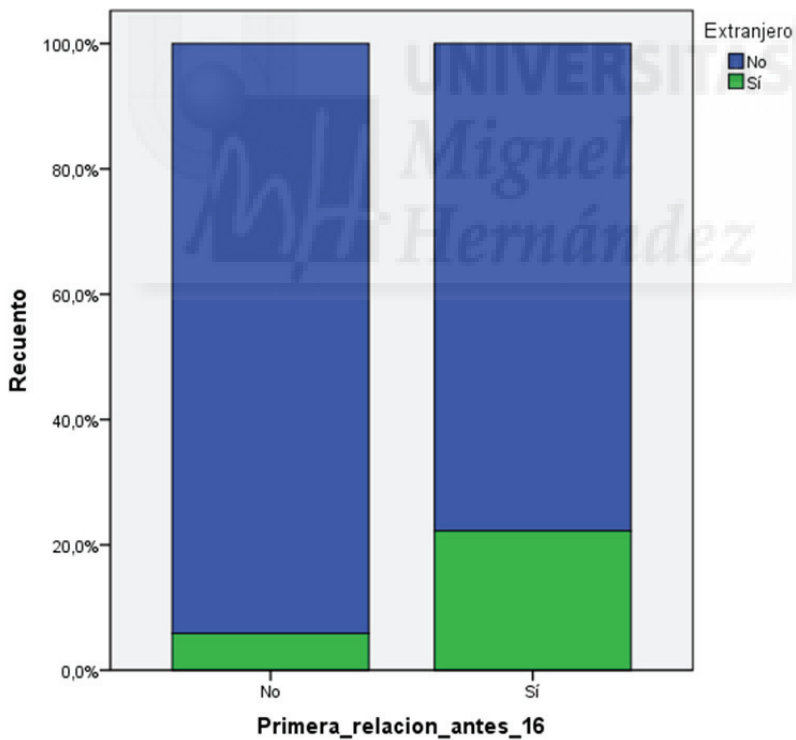


Figura 40: Relación entre origen de la población y edad de comienzo de las relaciones sexuales

7.3. Prevalencia de genotipos aislados en función de los genotipos incluidos en la vacuna y potencial protección frente al desarrollo de lesiones de alto grado.

La distribución tipo-específica de nuestra cohorte de pacientes mostró que VPH 16 fue el genotipo viral más frecuentemente detectado (30,08%). Los genotipos 16 y/o 18 se detectaron en el 35,46% de las mujeres. El 37,66% de las mujeres fueron positivas para al menos uno de los 5 genotipos de alto riesgo adicionales presentes en la vacuna nonavalente; VPH 31 se detectó en el 9,41%, VPH 33 en el 4,71%, VPH 45 en el 3,03%, VPH 52 en el 14,29% y VPH 58 en el 6,22% (Tabla 25). El porcentaje de mujeres en las que se encontraron genotipos de alto riesgo no incluidos en la vacuna tetravalente-nonavalente fue del 17,98%; IC95% (14,81-21,15%). (Tabla 26).

En la Tabla 27 se presentan las medidas de asociación (OR) e impacto (AFe) crudas y ajustadas del riesgo de 'lesiones de alto grado', en relación al genotipo de VPH y su protección por la vacuna tetravalente y nonavalente VPH.

Tras ajustar por edad y estatus inmigrante, la presencia del genotipo 16 o 18 de forma individual, aumentó 10,40 veces la posibilidad de tener una lesión de alto grado. La presencia concomitante de los dos genotipos aumentó el riesgo de lesión: OR ajustada 63,58, p tendencia lineal <0,001. AFe 0,98; IC95% (0,88-1,00).

La presencia de genotipos de alto riesgo no cubiertos por la vacuna tetravalente VPH, aumentó el riesgo de lesión de alto grado de forma significativa aunque en menor medida: OR ajustada 2,71; IC95% (1,05-7,01).

Al subdividir estos genotipos en función de la protección por la nueva vacuna nonavalente VPH: mientras que la presencia de genotipos de alto riesgo no cubiertos por la nueva vacuna nonavalente VPH, se asoció a un aumento no significativo del riesgo de lesión: OR ajustada 1,76; IC95% (0,54-1,70); los genotipos de alto riesgo no cubiertos por la vacuna tetravalente VPH pero sí

por la nueva vacuna nonavalente VPH, mostraron un aumento significativo del riesgo: OR ajustada 3,51; IC95% (1,29-9,56). AFe ajustada 0,72; (IC95% 0,22-0,90).



Tabla 25: Prevalencia genotipos de AR incluidos o no en las vacunas en nuestras pacientes en infección simple v múltiple

Genotipos VPH	TOTAL				INFECCIÓN SIMPLE				INFECCIÓN MÚLTIPLE ^a			
	n=595	%	IC	95%	n=595	%	IC	95%	n=595	%	IC	95%
Genotipos de AR incluidos en las vacunas	16	30,08	26,32	33,85	65	10,92	8,33	13,5	115	19,33	16,07	22,59
	18	5,38	3,48	7,28	6	1,01	0,12	1,90	26	4,37	2,64	6,10
5 genotipos de AR adicionales incluidos en la vacuna nonavalente	31	9,41	6,98	11,84	19	3,19	1,70	4,69	37	6,22	4,19	8,24
	33	4,71	2,92	6,49	6	1,01	0,12	1,90	21	3,53	1,96	5,10
	45	3,03	1,57	4,49	4	0,67	0,18	1,71	14	2,35	1,05	3,66
	52	85	14,29	11,39	8	1,35	0,34	2,35	77	12,94	10,16	15,72
	58	37	6,22	4,19	4	0,67	0,18	1,71	33	5,55	3,62	7,47
Genotipos de AR no incluidos en las vacunas	35	17	2,86	1,43	4,28	3	0,50	0,10	14	2,35	1,05	3,66
	39	46	7,73	5,50	9,96	9	1,51	0,45	37	6,22	4,19	8,24
	51	69	11,60	8,94	14,25	14	2,35	1,05	55	9,24	6,83	11,66
	56	55	9,24	6,83	11,66	2	0,34	0,04	53	8,91	6,54	11,28
	59	28	4,71	2,92	6,49	6	1,01	0,12	22	3,70	2,10	5,30
	68	13	2,19	0,93	3,44	0	0,00	0,00	13	2,19	0,93	3,44

^a Mujeres infectadas con múltiples tipos (tanto de alto riesgo como de bajo riesgo) de virus del papiloma humano (VPH)

Tabla 26: Prevalencia de los genotipos VPH de alto riesgo en relación a los genotipos de alto riesgo incluidos en las vacunas

	Total		
	n=595	%	IC 95%
En relación con el genotipo de alto riesgo VPH			
Ningún VPH alto riesgo ^a	160	26,89	23,24 - 30,54
Al menos un VPH alto riesgo	435	73,11	69,46 - 76,76
En relación con los genotipos de alto riesgo incluidos en las vacunas			
Ningún VPH alto riesgo ^a	160	26,89	23,24 - 30,54
Al menos un genotipo de alto riesgo no incluidos en la vacuna TETRAVALENTE ^b	229	38,49	34,49 - 42,48
VPH alto riesgo no incluidos en las vacunas tetravalente ni nonavalente ^c	107	17,98	14,81 - 21,15
Alguno de los 5 genotipos de alto riesgo incluidos en la vacuna nonavalente ^d	122	20,50	17,18 - 23,83
VPH AR incluidos en la vacuna TETRAVALENTE y nonavalente (16 o 18)	201	33,78	29,90 - 37,67
VPH AR incluidos en la vacuna TETRAVALENTE y nonavalente (16 y 18)	5	0,84	0,27 - 1,95

^a Ningún alto riesgo. Clasificación genotipos VPH de acuerdo con World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs Working Group assessment of the carcinogenicity of different VPH types

^b (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 o 68).

^c Al menos un genotipo de alto riesgo no incluidos ni en la vacuna tetravalente ni en la nonavalente (35, 39, 51, 56, 59 o 68).

^d Al menos uno de los 5 genotipos de alto riesgo incluidos en la vacuna nonavalente (31, 33, 45,52 o 58).

Tabla 27: Asociación (OR) e impacto (AFe) crudas y ajustadas del riesgo de 'lesiones de alto grado', en relación al genotipo de VPH y su protección por la vacuna tetravalente y nonavalente VPH

	No lesión		Lesión intraepitelial o malignidad *		ORa	IC	95%	AFe-A	IC	95%
	n=509	n=81	ORc	IC						
En relación con el genotipo de alto riesgo VPH										
Ningún VPH alto riesgo ^a	154	6	1	--	1	--				
Al menos un VPH alto riesgo	355	75	5,42	2,31	6,01	2,53	14,29	0,83	0,60	0,93
En relación con los genotipos de alto riesgo incluidos en las vacunas										
Ningún VPH alto riesgo ^a	154	6	1	--	1					
Al menos un genotipo de alto riesgo no incluidos en la vacuna tetravalente ^b	208	20	2,47	0,97	2,71	1,05	7,01	0,63	0,04	0,86
VPH alto riesgo no incluidos en las vacunas tetravalente ni nonavalentes ^c	101	6	1,53	0,48	1,76	0,54	5,70	0,43	--	--
Alguno de los 5 genotipos de alto riesgo incluidos en la vacuna nonavalente ^d	107	14	3,36	1,25	3,51	1,29	9,56	0,72	0,22	0,90
VPH AR incluidos en la vacuna tetravalente y nonavalente (16 o 18)	145	52	9,21	3,84	10,40	4,25	25,40	0,90	0,76	0,96
VPH AR incluidos en la vacuna tetravalente y nonavalente (16 y 18)	2	3	38,50	5,39	63,58	8,62	468,70	0,98	0,88	1,00
<i>p trend</i>			< 0,001		< 0,001					

* Lesión intraepitelial o malignidad: lesión intraepitelial escamosa de alto grado o peor.

Cociente de probabilidades e intervalos de confianza del 95%. ORc denota "ajustado" al modelo básico: edad y estatus inmigrante. AFe-a = Fracción atribuible entre los expuestos, ajustada por edad e inmigrante.

^a Ningún alto riesgo. Clasificación genotipos VPH de acuerdo con World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs Working Group assessment of the carcinogenicity of different VPH types.

^b (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 o 68).

^c Al menos un genotipo de alto riesgo no incluidos ni en la vacuna tetravalente ni en la nonavalente (35, 39, 51, 56, 59 o 68).

^d Al menos uno de los 5 genotipos de alto riesgo incluidos en la vacuna nonavalente (31, 33, 45, 52 o 58).



DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

8.1. Caracterización de la infección cervical

Actualmente, las dos metodologías más utilizadas para la detección de VPH en estudios epidemiológicos son la PCR (usando cebadores consenso) y la técnica de captura de híbridos.

En nuestro estudio se ha realizado el genotipado de las muestras mediante el kit Linear Array VPH Genotyping (Roche Diagnostics); metodología que nos ha permitido detectar 37 genotipos virales; para poder así conocer la epidemiología local de la infección por VPH y realizar estudios del impacto potencial de la vacuna (tetra y nonavalente) en la prevención del desarrollo de lesiones intraepiteliales en nuestra cohorte de pacientes.

8.1.1. Prevalencia genotipos VPH de alto riesgo y lesión histopatológica

Durante el período de estudio se detectaron 595 mujeres con infección cervical por VPH, que se corresponde con el 43% de la población estudiada; prevalencias de infección similares a las reportadas por Chatuverdi et al o Pista et al, Garcia Espinosa et al (43, 52% y 47% respectivamente) (140-142)

Castellsague et al (65) encontraron prevalencias de infección estandarizadas por edad de cerca del 14%. Una explicación a estas diferencias encontradas con respecto a nuestros resultados podría ser que en este estudio (65) se excluyeron a las mujeres con citología o histología anormal diagnosticadas en los 12 meses previos, circunstancia que infraestimaría la prevalencia de infección cervical por VPH, ya que estas mujeres serían más propensas a ser VPH-positivo. Por otro lado en diversos estudios de base poblacional las muestras se sometieron a pruebas para detectar la positividad del VPH utilizando la prueba de ADN del VPH, Hybrid Capture II (HC2, Digene Corporation, Gaithersburg, MD) que permite detectar la presencia de 13 tipos

de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44).

Los genotipos más prevalentes en nuestra cohorte de pacientes fueron el VPH 16 (30,08%), el VPH 52 (14,29%), el VPH 51 (11,6%) y el VPH 31 (9,41%); distribución muy similar a la reportada por Guan et al (67).

En nuestro estudio se encontró una prevalencia para el genotipo 52 mayor a la encontrada por otros autores en estudios de ámbito nacional (71, 143, 144). Nuestros resultados tampoco coinciden con el informe ICO-WHO, del 2016 (75) en el que se obtuvieron prevalencias para HSIL del 5,4% y CC del 2,4% para el genotipo 52. Esta diferencia podría ser debida a que la población inmigrante del África oriental tiene un peso importante en nuestra área de salud; área en la que se ha comunicado una prevalencia de infección por VPH 52 muy alta (145).

Los datos publicados por Castellsagué et al y Delgado et al (65, 146) con respecto a la prevalencia del VPH 52 son similares a los obtenidos en nuestro estudio. Castellsagué et al encuentran que después de VPH 16, el genotipo 52 es el más prevalente. Delgado et al comunican una prevalencia para el genotipo 52 del 12%.

Respecto a la prevalencia del genotipo 16 y 18, en nuestra muestra encontramos prevalencias superiores (30,08% y 5,38% respectivamente) a las halladas en otros estudios de base poblacional (65, 147).

Nuestros datos se acercan más a los publicados por Garcia Espinosa et al (142); que detectan prevalencias para el VPH 16 del 26%, para VPH 31 del 10,7%, para VPH 58 del 8,0% y para el VPH 18 del 5%. No obstante, toda la muestra de mujeres incluidas por Garcia Espinosa et al presentaban lesión histopatológica (de NIC 1 en adelante).

El VPH 16 fue el genotipo viral más frecuentemente detectado, incluso en las pacientes sin hallazgos de anormalidad citológica, como reportan muchos autores (70, 145, 148).

No se observaron grandes diferencias de distribución del tipo de VPH entre citología normal y LSIL. Sin embargo, la positividad de VPH 16 aumento abruptamente en las lesiones de alto grado con respecto a las lesiones de bajo grado (LSIL 29%, HSIL 62%, CC 77%).

Depuydt et al, (149) que realizaron estudios de prevalencia basados en cribado cervical organizado, encontraron prevalencias para el genotipo 16 menores. Estas diferencias posiblemente se deban a que nuestro estudio está basado en un cribado cervical oportunista.

Un metaanálisis (67) que incluía 369.186 pacientes encontraba una relación 20-28% prevalencia de VPH 16 en las lesiones de bajo grado vs 58-63% en las de alto grado; datos muy similares a los que nosotros reportamos.

El genotipo 16, no fue solamente el más prevalente, sino que también fue con diferencia el genotipo asociado de forma más fuerte con el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, con una fuerza de asociación muy superior al genotipo 18 (ORa 12,02 vs ORa 3,94) o al resto de genotipos de alto riesgo en su conjunto (ORa 2,47). Este resultado coincide con lo reportado por numerosos autores en estudios previos (4, 150, 151).

Dentro de los tipos virales de alto riesgo, el 16 y el 18 son los genotipos que causan el 70% de los casos de cáncer de cérvix, y aún una mayor proporción de los canceres asociados a VPH como el de vulva, vagina, pene, ano y orofaringe (27-29).

La asociación existente entre el VPH 16 y el CC ha sido claramente establecida; en el 50–70% de las pacientes con CC se detecta VPH 16 (27, 30). En nuestra serie, VPH 16 se detecta en el 77% de las pacientes con cáncer de cérvix.

Aunque en nuestro estudio encontramos que VPH 52 es más prevalente en lesiones histopatológicas de alto grado (29% HSIL, 23% CC) respecto a las lesiones de bajo grado (LSIL 16%); no podemos atribuir de forma individual a este genotipo viral un riesgo significativo de desarrollo de lesiones de alto grado; ya que más del 50% de nuestras pacientes (45/85) estaban coinfectadas con el genotipo 16.

Nuestros resultados muestran una prevalencia infección por al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico inferior a lo esperado (73%). Castellsagué et al y Moore et al (65, 147) encuentran porcentajes cercanos al 85% de prevalencia de genotipos AR.

Mientras se han encontrado prevalencias de infección por VPH en pacientes sin anormalidad cervical en torno al 12% (145, 147, 148), en nuestra serie se describe hasta un 49% de pacientes con infección por VPH y exámenes citológicos no patológicos. Esta diferencia de prevalencias podría ser debida a que nuestro estudio está basado en un cribado cervical oportunista en el que un criterio de inclusión es la infección cervical por VPH, criterio que no se incluye en muchos estudios de base poblacional. Nuestros datos muestran concordancia con los presentados por Del Rio et al (15), en el que los criterios de inclusión de las pacientes son semejantes. Ellos reportan prevalencias de infección por VPH en un 65% de pacientes sin lesión histopatológica.

Así mismo, por el reclutamiento de nuestras pacientes en base a una infección por VPH provada, encontramos un porcentaje de mujeres que presentaron en la citología una alteración morfológica (cribado positivo) superior a lo esperado (41,36%). Moore et al (147) reportan un 16% de pacientes con citologías con anormalidad, Guan et al del 28%(67).

El porcentaje de atipias cervicales encontradas en nuestras pacientes; ASCUS/ASCH en el 8.14%; [IC95% 5.85-10.43], LSIL en el 19.49%; [IC95% 16.21-22.77], HSIL en el 11.53%; [IC95% 8.86-14.19], fue similar al descrito por Guan et al (67) para la atipias de bajo grado (5,8% ASCUS, NIC1+LSIL: 18%, NIC2+NIC3+HSIL:19%).

8.1.2. Infección múltiple

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la frecuencia de infección múltiple y su relación con la progresión de las lesiones de las pacientes.

En nuestra serie la infección múltiple representó el 50% de la infección cervical por VPH.

Encontramos porcentajes de infección múltiple más elevados a los descritos en otros estudios; si bien, la metodología usada por muchos de ellos, para la detección y genotipado de las muestras no permitía detectar tantos genotipos virales como los que nos permite nuestra metodología.

Castellsagué et al (65), estudiaron el papel de la infección múltiple por VPH con una metodología de captura de híbridos que permite detectar 18 genotipos virales (13 de AR y 5 de bajo riesgo) encontrando prevalencias de infección múltiple del 25%. Garcia Espinosa et al (142), con una técnica que permite detectar 20 genotipos virales, encontraron prevalencias de infección múltiple del 18% en HSIL, mientras que en nuestros datos encontramos un porcentaje de infección del 54% para lesiones de alto grado.

Chatuverdi et al (141) en una serie de 2.478 mujeres sexualmente activas, encontraron un porcentaje de infección múltiple por VPH del 43%. Bello et al (17) encuentran un porcentaje de infección múltiple del 44,2% en el estudio de muestras cervicales de 1.323 mujeres.

Los resultados de prevalencia de infecciones múltiples de los dos estudios anteriores mostraron resultados muy similares a nuestra serie. En nuestro estudio, aunque no existe asociación entre infección múltiple y rango de edad; encontramos que la infección múltiple es más prevalente en mujeres menores de 30 años (17, 140).

Se desconoce si los tipos de VPH en múltiples infecciones ocurren al azar, o si existe una relación competitiva o cooperativa. Algunos autores sugieren que las infecciones de tipo múltiple que involucraban la especie α -9 eran las más frecuentes y la α -9 era la única especie involucrada en combinaciones fuertemente asociadas negativamente (152, 153).

Chatuverdi et al (141) encontraron que la infección con múltiples especies α -9 se asoció con un riesgo significativamente aumentado de NIC2 + (OR = 2,2; IC95%= 1,1-4,6). Sin embargo, el riesgo de enfermedad fue similar a la suma del riesgo estimado de los tipos individuales, con poca evidencia de interacciones sinérgicas.

Aunque múltiples estudios defienden que la infección múltiple aumenta sustancialmente el riesgo de severidad de las lesiones histopatológicas (17, 154), incluso en los análisis en los que se excluyen las mujeres infectadas por VPH 16 (17, 152); nosotros no encontramos dicha asociación.

En Costa Rica, un estudio que incluía una población inicial de 8.545 mujeres documentó que después de controlar las fuentes de correlación común entre los tipos de VPH, no hubo evidencia de una tendencia a agrupar a las pacientes positiva o negativamente en relación a múltiples infecciones (155).

En la mayoría de los estudios epidemiológicos, hasta el momento, la importancia clínica de la infección múltiple no se ha conseguido dilucidar. En nuestra serie no hemos podido demostrar que dichas infecciones múltiples den lugar a lesiones precursoras de mayor riesgo. Nuestros resultados están respaldados por lo reportado por diversos autores previamente (4, 155, 156).

8.2. Infección cervical por VPH 16

La alta prevalencia de infección por VPH 16 de nuestra cohorte y su frecuente asociación con el desarrollo de lesiones de alto grado, claramente establecida hasta el momento (4, 29, 30); motivó el estudio en profundidad y caracterización de la infección cervical del subgrupo de pacientes infectadas por el genotipo 16 (176 pacientes) en cuanto a infección múltiple vs simple, variante y carga viral.

8.2.1 Edad y estatus inmigrante

En nuestro estudio tanto la edad como el estatus inmigrante se han asociado de modo independiente al riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma; estos resultados motivaron que ambas variables fueran incluidas como variables predefinidas en los modelos multivariados.

Aunque sabemos que la prevalencia de infección por VPH es muy alta en mujeres menores de 25 años; en esta población la mayoría de las infecciones

son transitorias. Las altas tasas de aclaramiento viral que suceden en este rango de edad, no ocurren en mujeres de mayor edad (73).

Castle et al (157), realizaron el seguimiento durante 5-7 años de una cohorte poblacional de 7.237 mujeres en Costa Rica y observaron que la adquisición de VPH predominó a edades más tempranas, mientras que las infecciones persistentes gradualmente se hicieron más prominentes con la edad; más del 50% de las infecciones fueron persistentes en las mujeres mayores de 65 años. Esta tendencia fue especialmente fuerte para el tipo oncogénico más prevalente, el VPH 16 (los porcentajes de persistencia fueron del 15,2% para las mujeres <25 años y del 70% para las mujeres mayores de 65 años).

Teniendo en cuenta que la persistencia de la infección es necesaria para el desarrollo de lesiones histopatológicas de alto grado (158) y que el tiempo estimado desde la infección inicial hasta la carcinogénesis es de 10 a 20 años; la incidencia de cáncer cervical es mayor en las pacientes mayores de 55 años (30, 159).

Powell et al (150) mediante un estudio de casos y controles de 262 pacientes con CC invasivo diagnosticado en Gales entre 2000 y 2006 evaluaron el efecto de la edad en la OR asociada a tipos particulares de VPH. Sus resultados indicaron que la infección con un VPH de alto riesgo en mujeres mayores de 40 años se asoció con un riesgo aproximadamente 30 veces mayor de CC invasivo en comparación con las mujeres menores de 40 años.

Aunque en nuestra cohorte de pacientes con infección por VPH 16 no obtenemos tasas de riesgo tan altas a las descritas por Powell et al, si observamos, que con independencia de la carga o variante viral detectada, por cada aumento de 10 años en la edad de nuestras pacientes, el riesgo de lesión de alto grado se duplicaba ($OR_a = 2,35$).

En varios estudios se ha demostrado que las mujeres de ascendencia hispana o africana tienen más riesgo de adquirir VPH y padecer lesiones premalignas y malignas de cuello uterino. Riesgo que también se ha encontrado en mujeres de estrato socioeconómico bajo, bajo nivel educativo y cultural, así como estatus inmigrante (84, 160, 161).

Hasta ahora no se ha conseguido establecer con claridad si en este grupo de mujeres existen marcadores genéticos involucrados, una mayor exposición al virus o dificultades para acceder a los servicios de cribado existentes (162). Sin embargo, estos factores sociodemográficos parecen ser más un marcador de riesgo que un evento causal por sí mismo; en la medida en la que estas mujeres tienen conductas de mayor riesgo para adquirir una infección por VPH (tales como aquellas relacionadas con el comportamiento sexual o la alta paridad) (84, 162).

En nuestro estudio, se encontró un riesgo de tener una lesión histológica de alto grado en el subgrupo de población inmigrante de casi cinco veces más (ORa=4,3) al de la población autóctona. Una posible explicación sería la mayor exposición a cofactores de riesgo que encontramos al analizar los hábitos sexuales (número de parejas sexuales $p=0,06$, edad primera relación sexual $p=0,02$, nº gestaciones $p=0,001$) de la población inmigrante.

8.2.2 Carga viral

Al restringir el análisis de los resultados a las pacientes infectadas por el genotipo 16 observamos que la carga viral del genotipo 16 fue el predictor independiente más importante del riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma. Se obtuvo además un fuerte patrón dosis respuesta en nuestros resultados.

Estudios previos se han realizado para determinar la asociación entre la carga viral y la persistencia de la infección.

En Colombia, un estudio de cohorte (5) con 1.728 mujeres, que fueron seguidas durante 9 años encontró que la carga viral fue el mayor determinante para persistencia de VPH 16, por lo que altas cargas virales aportan mayor riesgo para el desarrollo de lesiones de alto grado, planteándose que la carga viral es un determinante para la persistencia de la infección y la eliminación, ocurriendo ésta a los 5 años sin cambio en el tipo viral.

Gravitt et al (163) realizaron un estudio de seguimiento en pacientes jóvenes (18-35 años) con infección por VPH 16 y observaron que la disminución de 2 logaritmos en la carga viral estaba fuertemente asociada al aclaramiento viral.

Ramanakumar et al (26) constataron, en el seguimiento de una cohorte de 636 mujeres, que el aclaramiento de la infección fue más rápido en las pacientes con cargas virales iniciales bajas (que se encontraban en los valores de los 2/3 inferiores).

Aunque algunos autores (163) defienden que la carga viral de VPH 16 medida en un solo punto de tiempo no se asocia con la eliminación viral; los resultados de cargas virales altas persistentes demuestran que la medición repetida de la carga viral del VPH 16 podría ser útil para predecir la progresión de las infecciones por VPH 16.

Con respecto a la posible relación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad. Un estudio transversal realizado en China, encontró una fuerte asociación de alta carga viral en mujeres con CC, con un OR de 68 (IC95% 17,8-259,7), estableciendo que una carga viral alta podría predecir un riesgo futuro de desarrollar CC y plantean la posibilidad de emplear marcadores adicionales para identificar de manera temprana a mujeres en riesgo (164).

En México, se realizó un estudio de casos y controles, con hallazgos que sugieren una relación fuerte entre la cantidad de ADN viral y el estadio de las lesiones cervicales. Encontrando un incremento de la carga viral proporcional a estadios más avanzados de las lesiones, con un OR de 365,8 (IC95% 94,7-1.412) con NIC 2-3, lo cual permite inferir una asociación dosis-respuesta, concluyendo que existe un mayor riesgo de CC, al presentar infecciones persistentes con una alta carga viral (165).

Sin embargo, los estudios realizados en China y México, han empleado como técnica de cuantificación la Captura Híbrida Viral II (HCII), la cual hace una evaluación cualitativa de 13 tipos virales de alto riesgo, y no permite establecer el tipo o tipos virales específicos infectantes.

En nuestro estudio encontramos que cargas virales por encima de 1.367 copias/célula (mediana) se asocian con 8 veces más riesgo de tener una lesión

histopatológica de alto grado. Nuestros resultados muestran valores relativos menores al de los estudios mencionados previamente (164, 165), si bien debemos señalar que nuestro estudio se centra en el genotipo VPH 16 y no tiene en cuenta el peso de otros genotipos de AR detectados.

Dentro de los estudios que han empleado la técnica de PCR a tiempo real: Ylitalo et al (11), utilizando un diseño de casos y controles, encontraron que los casos tenían cargas virales consistentemente mayores para el VPH 16 que los controles y que se podían detectar cargas virales altas hasta 13 años antes del diagnóstico de cáncer cervical. Como tal, las mujeres con altas cargas virales para VPH 16 tuvieron un riesgo 30 veces mayor en comparación con las mujeres que eran VPH negativas, y este aumento del riesgo fue consistente en el tiempo para medir la carga viral del genotipo 16.

Un segundo estudio realizado en la misma población demostró que el 20% de las mujeres con las cargas virales más altas para VPH 16 tenían un riesgo 60 veces mayor de desarrollar carcinoma in situ que las mujeres que eran VPH negativas (12).

La relación entre las cargas virales de ADN del VPH 16 y el grado de lesión siguieron un patrón claro de dosis respuesta; tras ajustar por edad y estatus inmigrante se encontraron ORa para el último tercil (CV mayor a 11.792 copias/célula) de 16,34. La asociación encontrada entre la carga viral y el riesgo de lesión intraepitelial, se mantuvo al ajustar por variante viral detectada.

Moberg et al (13) también encontraron un patrón dosis respuesta, observando OR máximas (OR=51) en el percentil de mayor carga viral.

En la literatura se encuentran puntos de corte diferentes al categorizar la carga viral. Las diferentes metodologías (PCR a tiempo real, Captura Híbrida 2) usadas para la cuantificación nos impiden hacer comparaciones interestudio.

Marks et al categorizaban el punto de corte en 2000 copias/10⁴ células; aunque concluían que la medición de la carga viral de forma individualizada no era útil (163).

Saunier et al, que realizan la cuantificación viral usando la misma metodología que en nuestro estudio, proponen que una carga viral de más de 22.000 copias /10³ células permite identificar a las mujeres con lesiones de alto grado (6).

En un estudio donde se evaluó la correlación clínica de las cargas virales de VPH 16 y VPH-18, se encontró que el valor predictivo más alto para la lesión intraepitelial cervical de grado 2 o superior se observó con un límite de carga viral de VPH 16 de $3,0 \times 10^6$ copias por millón de células, permitiendo realizar el diagnóstico en este punto de NIC 2 (166).

Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro estudio, con el fin de asegurar la calidad de los análisis y una mayor potencia estadística, la carga viral fue categorizada de acuerdo a la mediana y a la distribución en tertiles.

Por tratarse nuestro estudio de un estudio de corte transversal, los resultados que se obtuvieron, corresponden a una valoración única de la carga viral del VPH, por lo tanto no es posible saber si ésta puede predecir el riesgo de progresión de las lesiones y posterior desarrollo de CC. Sin embargo, estos resultados son consistentes con hallazgos reportados en estudios longitudinales (5, 7, 11, 12, 26, 163).

Los hallazgos de este estudio, apoyan las nociones que se tienen a nivel mundial sobre la implementación de la cuantificación viral para VPH 16 como marcador de riesgo para CC, además de la citología, para mejorar y fortalecer los programas de cribado de CC, permitiendo identificar mujeres VPH positivas, que presentan un mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras, y además identificar mujeres aún sin anomalías cervicales, para predecir el inicio de un proceso neoplásico. Es importante destacar que esto también tendría su aplicación en mujeres menores de 25 años (11), un grupo de edad que tiene una prevalencia particularmente alta de infección por VPH y en el que encontrar un método para distinguir infecciones clínicamente relevantes sería particularmente valioso.

Serán necesarios estudios para establecer metodologías validadas y reproducibles que nos permitan estandarizar la cuantificación viral para poder

obtener valores que nos permitan hacer comparaciones interensayo y así poder apoyar su uso como biomarcador de la enfermedad.

8.2.3. Variantes virales

Se ha sugerido que las variantes de secuencia del ADN de VPH 16 contribuyen a diferencias en el comportamiento de las lesiones cervicales individuales. Para abordar esta cuestión, hemos analizado la asociación de variantes detectadas en nuestra cohorte de mujeres con infección por VPH 16.

En nuestro estudio únicamente la variante asiática de subtipo viral del genotipo 16, se asoció de forma cruda con un aumento del riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, pero esta asociación no se mantuvo al ajustar por edad, estatus inmigrante o carga viral.

En un estudio de seguimiento de 10.049 mujeres durante 7 años se observó que las variantes no europeas, en particular el linaje AA, tienen una mayor tendencia a persistir, por lo que se relacionan con un riesgo mayor de lesión histopatológica (OR=2,4) (34).

Xi et al encontraron que el riesgo de desarrollar HSIL, de las mujeres infectadas por variantes VPH 16 AA era 3,1 veces mayor que el de las mujeres infectadas por variantes Europeas (36).

Estas asociaciones crudas reportadas en estos dos estudios son muy similares a las que encontramos tras el análisis de nuestros datos para la variante Asiática americana AA (ORc=2,93). Sin embargo, nuestra asociación cruda no se mantuvo al ajustar por edad, estatus inmigrante o carga viral.

Lo cierto es que en poblaciones con bajo nivel de mezcla étnica, como ocurre en nuestro caso, la asociación entre las variantes no Europeas y la lesión histopatológica de alto grado no se suele encontrar.

Numerosos autores señalan que las diferencias en las asociaciones en relación a determinadas variantes virales es probable que sean geográficamente dependientes (23, 42).

Cornet et al, para evaluar la asociación entre las variantes genéticas del VPH 16 y el riesgo de cáncer cervical, diseñaron un estudio multicéntrico basado en muestras cervicales positivas para VPH 16 (1.121 casos de cáncer cervical y 400 controles) del biobanco de la International Agency for Research on Cancer (IARC). Encontraron que la incidencia de los diferentes linajes varió entre los casos y los controles y se observó que la distribución de variantes de VPH 16 en todo el mundo, y sus asociaciones para el cáncer cervical parecen ser población-dependiente (23).

Con respecto al análisis de las variantes Europeas, algunos estudios han mostrado una asociación entre la variante E350G (que es un linaje que presenta un residuo de aminoácido alterado en el gen E6) y la enfermedad cervical (33). Otros encontraron mayor asociación con la persistencia para la variante E350T (38).

En nuestro caso no encontramos asociación entre la enfermedad cervical y el linaje de la variante europea E350T o E350G. Resultados que coinciden con los reportados por Zuna et al, Tornesello et al y Nindl et al (40-42).

Nuestros resultados sugieren que todas las variantes se asocian con el desarrollo de cáncer invasivo. Será necesario el desarrollo de estudios genómicos virales más amplios, especialmente para identificar la base genética de la carcinogenicidad única del VPH 16, para establecer las asociaciones descritas por algunos autores.

8.2.4. Infección múltiple

Entre las muestras positivas para VPH 16 identificadas en este estudio (n=176), las infecciones múltiples por dos o más genotipos fueron reportadas en un 66%, porcentaje mayor al encontrado en el análisis de toda nuestra serie de pacientes (595). También fue mayor nivel de ocurrencia de infección múltiple por genotipos de AR (46%).

Nuestros resultados podrían sugerir la presencia de acción sinérgica entre diferentes tipos virales. Algunos autores sugieren que las infecciones de tipo múltiple que involucraban la especie α -9 eran las más frecuentes (152).

Al analizar la infección múltiple por otros genotipos además del 16, no se encontró asociación con un aumento del riesgo estadísticamente significativo de desarrollo de lesiones histopatológicas de alto grado.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por muchos otros autores que sostienen que las implicaciones clínicas que la infección con múltiples genotipos de VPH son inciertas. Esta afirmación está basada en estudios de seguimiento realizados en mujeres con infecciones múltiples, en las cuales se ha observado, que aunque los genotipos identificados tiendan a formar grupos, en el seguimiento de la infección en estas mujeres no muestra que estos grupos tengan una influencia determinante en el curso de la infección viral y el desarrollo de lesiones malignas en las pacientes afectadas (4, 142, 155, 156).

Concluimos, por lo tanto, que en nuestra serie de pacientes, el genotipo 16, se asocia claramente con el riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma (ORa 12,02), (4, 150, 151) con independencia de encontrarse en infecciones simples o múltiples.

Sigue habiendo una necesidad de más estudios evaluando la incidencia de múltiples tipos de infecciones por VPH, y cualquier interacción entre los tipos de VPH dentro de estas infecciones.

8.3. Prevalencia de genotipos aislados en función de los genotipos incluidos en la vacuna y potencial protección frente al desarrollo de lesiones de alto grado

En nuestra cohorte de pacientes la infección por los genotipos 16 o 18 fue lo que más aumentó el riesgo de lesión de alto grado. Nuestros resultados coinciden con lo publicado hasta el momento; las infecciones por VPH 16 y 18 tienden a progresar más rápido a lesiones cancerosas que el resto de tipos virales (4) y causan el 70% de los casos de cáncer de cérvix, y aún una mayor proporción de cánceres de vulva, vagina, pene ano y orofaringe (117, 118, 167). Por lo tanto, las vacunas actuales abordan aproximadamente el 70% de los CC a través de la protección contra el genotipo 16 y 18.

La infección por los genotipos 16, 18, 31, 33, y especialmente la persistencia, se asociaron con alto riesgo para la progresión a lesiones cervicales de alto grado (4,153). Estos resultados indican el valor potencial de genotipado en la detección del cáncer de cuello uterino.

La infección concomitante por el genotipo 16 y 18 sugiere además una interacción, aumentando en nuestra serie la coinfección viral de modo multiplicativo del riesgo de lesión de alto grado (OR ajustada 63,58) con una AFe ajustada del 90 y 98% para infección aislada o conjunta respectivamente. Así pues, las vacunas con protección frente a uno de estos genotipos (16 o 18) evitaría aproximadamente el 90% de las lesiones de alto grado, mientras que la protección frente a ambos genotipos evitaría el 98% de las lesiones de alto grado presentes en las mujeres coinfectadas por el genotipo 16 y 18. Estos datos apoyan el impacto preventivo tanto de la vacuna tetravalente como de la nonavalente, ya que ambas vacunas cubren los genotipos 16 y 18 (116-118, 167).

La nueva vacuna nonavalente contra el VPH presenta protección frente a cinco tipos oncogénicos adicionales (31, 33, 45, 52 y 58) con respecto a la vacuna tetravalente. Se ha determinado que tiene el potencial de aumentar la prevención general de CC aproximadamente del 70% a aproximadamente el 90% (58).

Nuestros datos apoyan este aumento de eficacia. Esta mayor protección de la nueva vacuna nonavalente VPH frente a la vacuna tetravalente, parece tener impacto, ya que en nuestro estudio, estos genotipos por sí solos (en ausencia de infección por los genotipos 16 o 18) multiplicarían por 3,5 veces el riesgo de lesión de alto grado, con una AFe-ajustada del 72%. Es decir, nuestros resultados sugieren que si las 121 pacientes que presentan al menos uno de estos genotipos pero no el genotipo 16 ni 18, se hubieran vacunado con la nueva vacuna nonavalente, se habrían evitado aproximadamente el 72% de las lesiones de alto grado presentes en dichas mujeres. Dicho de otro modo, si se hubieran vacunado todas estas 121 pacientes, y la eficacia de la vacunación para estos genotipos 31, 33, 45, 52 y 58 fuera del 100%, se habrían evitado aproximadamente 87 lesiones de alto grado.

Joura et al, mostraron una eficacia frente a lesiones de alto grado relacionadas con la infección por VPH 31, 33, 45, 52 y 58 del 96.7% en el análisis de una cohorte de 14,215 mujeres de 16 a 26 años (121). Monsonogo et al, observaron que una alta proporción de lesiones cervicales de alto grado (60,6% de los NIC2) se asociaron con los tipos 31, 33, 45, 52 o 58 del VPH (168).

En nuestro estudio existe un % de mujeres con infección por genotipos de alto riesgo no cubiertos ni por la vacuna tetravalente ni por la nueva vacuna nonavalente, del 17.98%. En ausencia de infección por genotipos 16 o 18, la infección por el remanente de genotipos de alto riesgo que quedan sin cubrir con la vacuna nonavalente (genotipos 35, 39, 51, 56, 59, 68) se asoció a un aumento moderado y no significativo del riesgo de lesión de alto grado, con una AFe cercana al 40%.

Al hablar de eficacia de vacunas hay que considerar a la hora de extrapolar nuestros resultados varios aspectos que pudieran conducir a menores fracciones atribuibles en la población estudiada. Por un lado puede que la efectividad de las vacunas no sea del 100% y por tanto la protección no sea del 100% en el 100% de las mujeres vacunadas. Por otro lado, no es descartable una falsa sensación de seguridad reportada por diversos autores que conduciría a una mayor prevalencia de estilos de vida o hábitos sexuales de

riesgo que hagan aumentar la prevalencia de infección por otros genotipos virales.

En el presente estudio, las mujeres incluidas en el mismo acudieron al hospital para investigar más a fondo los problemas ginecológicos; Por lo tanto, los resultados pueden ser más representativos de la población hospitalaria específica que de la población general. Sin embargo, los datos son importantes para determinar el impacto futuro de las vacunas y un cambio potencial en el estado de salud de las pacientes y conocer el perfil epidemiológico del VPH en España. La descripción de la circulación de alto riesgo del VPH es una característica clave para el diseño racional de los nuevos programas de vacunas adaptadas a la población y los programas de cribado.

8.4. Limitaciones

Una limitación del presente estudio es que no se trataba de un estudio "basado en la población", sino basado en el cribado oportunista del cáncer cervical. La población de reclutamiento comprendía mujeres que asistieron a las consultas de Ginecología a sus exámenes de salud programados y, en consecuencia, podría haber un sesgo diferencial, bien por el reclutamiento preferencial de mujeres con conciencia de salud en comparación con mujeres de una edad similar dentro de la población española general, o bien por todo lo contrario, es decir, por una asistencia a la consulta motivada por percepción de factores de riesgo.

Asimismo, el diseño del estudio, con la inclusión de mujeres con infección provada por VPH, podría haber sobreestimado la prevalencia de las lesiones histopatológicas de nuestras pacientes.

Teniendo en cuenta que se trata de un estudio de corte transversal, los resultados que se obtuvieron, corresponden a una valoración única de la carga viral del VPH, por lo tanto no es posible saber si ésta puede predecir el riesgo de progresión de las lesiones y posterior desarrollo de CC.

Se desconoce la duración de la infección de las mujeres incluidas, con lo cual no es posible generalizar los resultados a todas las lesiones precursoras de CC. Es por esto que estudios prospectivos en mujeres con infección por VPH que incluyan la determinación tipo-específica (de acuerdo a la prevalencia local) de la carga viral y mujeres con lesiones precursoras en diferentes grados de severidad, son necesarios para confirmar los resultados del presente estudio.

Otra limitación del estudio es que la detección del ADN del VPH se realizó en células exfoliadas de cuello uterino en lugar de en muestras de biopsia con disección láser, lo que limita nuestra capacidad de establecer determinaciones causales entre tipos específicos de VPH y lesiones histopatológicas. Además, la asociación entre los tipos de VPH y las lesiones de alto grado no implica necesariamente causalidad

El diseño del estudio, hizo que en la recopilación de determinadas variables sociodemográficas y cofactores de riesgo relacionados con los hábitos sexuales de las pacientes se perdieran datos por la imposibilidad de contactar con las pacientes o por la negativa de las mismas de realizar el cuestionario.



CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. Los genotipos más prevalentes en nuestra cohorte de pacientes fueron el VPH 16, el 52, el 51 y el 31. El genotipo 18 se detectó únicamente en el 5% de las pacientes.
2. El genotipo 16 fue el genotipo más asociado al riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma, con una fuerza de asociación muy superior al genotipo 18 o al resto de genotipos de alto riesgo en su conjunto.
3. Al restringir a las pacientes infectadas por el genotipo 16, la carga viral del genotipo 16 fue el predictor independiente más importante del riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma. Se obtuvo además un fuerte patrón dosis respuesta.
4. En las pacientes con infección cervical por VPH 16 tanto la edad como el estatus inmigrante se han asociado de modo independiente al riesgo de lesión intraepitelial de alto grado o carcinoma.
5. No encontramos asociación entre la enfermedad cervical y la variante viral del VPH 16 detectada.
6. Dentro de las características sociodemográficas y factores de riesgo evaluados; el número de parejas y de abortos fueron las únicas variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres con y sin lesión cervical de alto grado.
7. Las infecciones múltiples fueron más frecuentes en el grupo de mujeres menores de 34 años, pero no se correlacionaron clínicamente con el grado de lesión citológica.

8. Los genotipos 16 y 18, especialmente en coinfección, son los que más impacto tienen en el desarrollo de lesiones de alto grado.

9. En ausencia de infección por genotipos 16 o 18, la mayor protección de la nueva vacuna nonavalente (frente a los genotipos 31, 33, 45, 52 y 58) parece tener impacto, porque estos genotipos por sí mismos multiplicarían por 3,5 veces el riesgo de lesión de alto grado, y serían responsables del 72% de las lesiones de alto grado desarrolladas por estas mujeres.





BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer A, Shah KV, et al. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol. 1999; 189:12-9.
2. de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. *Susceptibility to cervical cancer: an overview*. Gynecol Oncol. 2012 Aug; 126(2):304-11.
3. Bosch FX, Munoz N. *The viral etiology of cervical cancer*. Virus Res. 2002 Nov; 89(2):183-90.
4. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med. 2003 Feb 06; 348(6):518-27.
5. Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et al. *Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women*. Br J Cancer. 2009 Apr 07; 100(7):1184-90.
6. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, et al. *Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma*. J Clin Microbiol. 2008 Nov; 46(11):3678-85.
7. Xi LF, Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Wang C, Galloway DA, et al. *Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case-control study*. J Infect Dis. May 15; 203(10):1425-33.
8. Winer RL, Harris TG, Xi LF, Jansen KU, Hughes JP, Feng Q, et al. *Quantitative human papillomavirus 16 and 18 levels in incident infections and cervical lesion development*. J Med Virol. 2009 Apr; 81(4):713-21.
9. Xu Y, Dotto J, Hui Y, Lawton K, Schofield K, Hui P. *High grade cervical intraepithelial neoplasia and viral load of high-risk human papillomavirus: significant correlations in patients of 22 years old or younger*. Int J Clin Exp Pathol. 2009; 2(2):169-75.

10. Lowe B, O'Neil D, Loeffert D, Nazarenko I. *Distribution of Human papillomavirus load in clinical specimens*. J Virol Methods. Apr; 173(1):150-2.
11. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. *Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study*. Lancet. 2000 Jun 24; 355(9222):2194-8.
12. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. *Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study*. Lancet. 2000 Jun 24; 355(9222):2189-93.
13. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. *High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma*. Br J Cancer. 2005 Mar 14; 92(5):891-4.
14. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. *Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN)*. Br J Cancer. 2005 Jun 20; 92(12):2195-200.
15. Del Rio-Ospina L, Soto-De Leon SC, Camargo M, Moreno-Perez DA, Sanchez R, Perez-Prados A, et al. *The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions*. BMC Cancer. 2015 Mar; 15:100.
16. Munagala R, Dona MG, Rai SN, Jenson AB, Bala N, Ghim SJ, et al. *Significance of multiple HPV infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response*. Int J Oncol. 2009 Jan; 34(1):263-71.
17. Bello BD, Spinillo A, Alberizzi P, Cesari S, Gardella B, D'Ambrosio G, et al. *Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: Prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions*. J Med Virol. 2009 Apr; 81(4):703-12.
18. Carrillo-Garcia A, Ponce-de-Leon-Rosales S, Cantu-de-Leon D, Fragoso-Ontiveros V, Martinez-Ramirez I, Orozco-Colin A, et al. *Impact of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer*. Gynecol Oncol. 2014 Sep; 134(3):534-9.

19. Cheung JL, Cheung TH, Ng CW, Yu MY, Wong MC, Siu SS, et al. *Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive cervical cancer*. J Clin Microbiol. 2009 Feb; 47(2):287-93.
20. Jiang M, Baseman JG, Koutsky LA, Feng Q, Mao C, Kiviat NB, et al. *Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR*. J Clin Microbiol. 2009 Mar; 47(3):521-6.
21. Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. *Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants*. Virology. Oct 10; 432(1):127-32.
22. Lopez-Revilla R, Pineda MA, Ortiz-Valdez J, Sanchez-Garza M, Riego L. *Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosi City, Mexico*. Infect Agent Cancer. 2009 Feb 16; 4:3.
23. Cornet I, Gheit T, Iannacone MR, Vignat J, Sylla BS, Del Mistro A, et al. *HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide*. Br J Cancer. Jan 15;108(1):240-4.
24. Whiteside MA, Siegel EM, Unger ER. *Human papillomavirus and molecular considerations for cancer risk*. Cancer. 2008 Nov 15; 113(10 Suppl):2981-94.
25. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. *A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion*. J Infect Dis. 2007 Jun; 195(11):1582-9.
26. Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlee F, et al. *Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women*. BMC Infect Dis. 2010 Nov;10:326.
27. 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 Nov; (11):1048-56.

28. Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. *HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women*. *Cancer*. 2008 Nov 15; 113(10 Suppl):3036-46.
29. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. *Global burden of human papillomavirus and related diseases*. *Vaccine*. 2012 Nov; 30 Suppl 5:F12-23.
30. Ibeanu OA. *Molecular pathogenesis of cervical cancer*. *Cancer Biol Ther*. 2011 Feb ;(3):295-306.
31. Abba MC, Mouron SA, Gomez MA, Dulout FN, Golijow CD. *Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high-grade intraepithelial lesion*. *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Mar-Apr; 13(2):154-8.
32. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*. 2004 Dec 10; 112(5):854-9.
33. Andersson S, Alemi M, Rylander E, Strand A, Larsson B, Sallstrom J, et al. *Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions*. *Br J Cancer*. 2000 Aug; 83(3):307-10.
34. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*. 2010 Apr 15; 70(8):3159-69.
35. Choi YJ, Ki EY, Zhang C, Ho WC, Lee SJ, Jeong MJ, et al. *Analysis of Sequence Variation and Risk Association of Human Papillomavirus 52 Variants Circulating in Korea*. *PLoS One*. 2016 Dec. 11(12):e0168178.
36. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, et al. *Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jan; 16(1):4-10.
37. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. *Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia*. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Jun; 89(11):796-802.
38. Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Iftner T, Munk C, Tommasino M, et al. *Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant*

- lineages among a population-based sample of Danish women.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Jul; 20 (7):1315-21.
39. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, et al. *Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China.* J Infect Dis. 2002 Sep 01;186(5):696-700.
40. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Durst M. *Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer.* Int J Cancer. 1999 Jul 19; 82(2):203-7.
41. Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, Schiffman M, et al. *Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population.* Int J Cancer. 2009 Dec 01; 125(11):2609-13.
42. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, et al. *Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix.* Gynecol Oncol. 2011 Apr;121(1):32-42.
43. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.* Int J Cancer. 2014 Mar 01; 136(5):E359-86.
44. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/cancer/cervical/statistics/>.
45. World Health Organization. International Agency for research of Cancer. EUCAN. 2012. Disponible en: <http://eco.iarc.fr/eucan/>
46. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC Guidance. Introduction of HPV vaccines in EU countries - an update. September, 2012.
47. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. *Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries.* Vaccine. 2008 Aug 19; 26 Suppl 10:K29-41.
48. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. *Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer.* N Engl J Med. 2007 Oct 18; 357(16):1579-88.

49. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. *Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study*. *BMJ*. 2008 Oct 13; 337:a1754.
50. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. *The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations*. *J Virol*. 1993 Nov ;67(11):6413-23.
51. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, et al. *Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree*. *J Clin Microbiol*. 1991 Sep; 29(9):1765-72.
52. Bernard HU. *The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses*. *J Clin Virol*. 2005 Mar; 32 Suppl 1:S1-6.
53. Huertas-Salgado A, Martin-Gamez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, et al. *E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: an updated and unified criterion for clustering and nomenclature*. *Virology*. 2010 Feb 05; 410(1):201-15.
54. Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. *Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization*. *J Clin Microbiol*. 1997 Jan; 35(1):11-9.
55. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. *Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective*. *J Virol*. 1997 Mar; 71(3):2463-72.
56. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. *Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments*. *J Virol*. 1995 Dec; 69(12):7743-53.
57. Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, Tommasino M. *Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms*. *Lancet*. 1998 Oct 31; 352(9138):1441-2.
58. Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, et al. *Attribution of 12 High-Risk Human Papillomavirus Genotypes to Infection and*

Cervical Disease. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2014 Oct; 23(10):1997-2008.

59. Doorbar J. *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May; 110(5):525-41.

60. Zheng ZM, Baker CC. *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. *Front Biosci*. 2006 Sep 01;1 1:2286-302.

61. Moody CA, Laimins LA. *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug ;10(8):550-60.

62. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. *J Virol*. 2004 Nov; 78(21):11451-60.

63. de Villiers EM. *Cross-roads in the classification of papillomaviruses*. *Virology*. 2013 Oct; 445(1-2):2-10.

64. Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, Downs LS, Jr. *Multiple-type human papillomavirus (HPV) infections: a cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at the time of cervical cytology*. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Sep; 23(7):1295-302.

65. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al. *Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study*. *J Med Virol*. 2012 Jun; 84(6):947-56.

66. Boyle PL, B. *World cancer report 2008*. World Health Organization. International Agency For Research on Cancer. 2008.

67. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, et al. *Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer*. *Int J Cancer*. 2012 Nov 15;131(10):2349-59.

68. 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*. 2010 Feb 15; 128(4):927-35.

69. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. *Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions:*

comparison by geographic region and with cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 May; 14(5):1157-64.

70. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.* Lancet Infect Dis. 2007; 7:453-9.

71. ICO. Spain Human Papillomavirus and Related Cancers. Information Centre on HPV and Cancer, Fact Sheet 2016

72. Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP, Kelsall G, du Berger R, Ferenczy A, et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 May; 14(5):1149-56.

73. Bosch X, Harper D. *Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era.* Gynecol Oncol. 2006 Oct; 103(1):21-4.

74. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, et al. *Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections.* J Natl Cancer Inst. 2008 Apr 02; 100(7):513-7.

75. Stanley M. *Immune responses to human papillomavirus.* Vaccine. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.

76. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet. 2007 Sep 08; 370(9590):890-907.

77. Wang SS, Hildesheim A. *Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression.* J Natl Cancer Inst Monogr. 2003(31):35-40.

78. de Sanjose S, Palacio V, Tafur L, Vazquez S, Espitia V, Vazquez F, et al. *Prostitution, HIV, and cervical neoplasia: a survey in Spain and Colombia.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1993 Nov-Dec; 2(6):531-5.

79. Clifford GM, Tully S, Franceschi S. *Carcinogenicity of human papillomavirus types in HIV-positive women: A meta-analysis from HPV infection to cervical cancer.* Clin Infect Dis. 2017 Feb 12.

80. Smith JS, Green J, de Gonzalez AB, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. *Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review*. The Lancet. 2003; 361(9364):1159-67.
81. Hogewoning CJ, vdBA, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, Westenend PJ, Meijer CJ. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer*. 2003; 107 (5):811-6.
82. Hildesheim A, Wang SS. *Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review*. *Virus Res*. 2002 Nov; 89(2):229-40.
83. Castle PE, Giuliano AR. *Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors*. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003(31):29-34.
84. Khan MJ, Partridge EE, Wang SS, Schiffman M. *Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology*. *Cancer*. 2005 Jul 01; 104(1):61-70.
85. Waggoner SE. *Cervical cancer*. *Lancet*. 2003 Jun 28; 361(9376):2217-25.
86. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, D OC, Prey M, et al. *The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology*. *JAMA*. 2002; 287:2114-9.
87. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. *Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution*. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2007 Dec; 34(4):739-60.
88. Sasieni P, Adams J. *Effect of screening on cervical cancer mortality in England and Wales: analysis of trends with an age period cohort model*. *BMJ*. 1999 May 08; 318(7193):1244-5.
89. van der Aa MA, Pukkala E, Coebergh JW, Anttila A, Siesling S. *Mass screening programmes and trends in cervical cancer in Finland and the Netherlands*. *Int J Cancer*. 2008 Apr 15; 122(8):1854-8.
90. Bulkman NW, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. *Long-term protective effect of high-risk human papillomavirus testing in population-based cervical screening*. *Br J Cancer*. 2005 May 09; 92(9):1800-2.

91. Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies. IARC Working Group on evaluation of cervical cancer screening programmes. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Sep 13;293 (6548):659-64.
92. Sasieni PD, Cuzick J, Lynch-Farmery E. *Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer*. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer*. 1996 Apr;73(8):1001-5.
93. Sepulveda C, Prado R. *Effective cervical cytology screening programmes in middle-income countries: the Chilean experience*. *Cancer Detect Prev*. 2005;29(5):405-11.
94. Gibb RK, Martens MG. *The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer*. *Rev Obstet Gynecol*. 2011; 4(Suppl 1):S2-S11.
95. Arbyn M, Snijders PJF, Meijer CJLM, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, et al. *Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?* *Clin Microbiol Infect*. 2015 Set; 21: 817-26.
96. Iftner T, Villa LL. *Chapter 12: Human papillomavirus technologies*. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003(31):80-8.
97. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. *Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials*. *Lancet*. 2013 Feb 08; 383(9916):524-32.
98. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Wright TL, Behrens CM. *Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study*. *Lancet Oncol*. 2011 Sep; 12(9):880-90.
99. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer Chris JLM, Poljak M, Ogilvie G, et al. *Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer*. *Vaccine*. 2013 Dec; 31 (52):88-99.
100. Carozzi FM, Confortini M, Cecchini S, Bisanzi S, Cariaggi MP, Pontenani G, et al. *Triage with human papillomavirus testing of women with cytologic*

abnormalities prompting referral for colposcopy assessment. *Cancer Cytopathology*. 2005;105(1):2-7.

101. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *The Lancet Oncology*. 2011 Jul; 12(7):663-72.

102. Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Moller H, et al. *Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Mar; 14(3):677-86.

103. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. *Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention*. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Mar 01; 98(5):303-15.

104. Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, Lacey JV, Devesa S. *Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976–2000*. *Cancer*. 2004; 100(5):1035-44.

105. Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. *Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older*. *International Journal of Cancer*. 2009; 124(3):516-20.

106. Torné-Bladé A. *Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014*. *Prog Obstret Ginecol*. 2014; 57:1-53.

107. OMS. *Control integral del cáncer cervicouterino: guía de prácticas esenciales*. Segunda edición ed; 2014.

108. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection-CDC factsheet. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention <http://www.cdc.gov/std/hpv/hpv-factsheet-march-2014.pdf>. 2014 .

109. WHO. *Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice*. Second ed; 2014.

110. Centers for Disease Control and Prevention. HPV vaccine information for clinicians-fact sheet. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention;

2012. Disponible en <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV-vaccine-hcp.htm>.

111. Food and Drug Administration. FDA approves Gardasil 9 for prevention of certain cancers caused by five additional types of HPV. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration; 2014. Disponible en: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm426485.htm/www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm426485.htm>.

112. WHO. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 12–13 June 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013;88 (29):301-12.

113. Schwarz TF, Spaczynski M, Schneider A, Wysocki J, Galaj A, Perona P, et al. *Immunogenicity and tolerability of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15 to 55 years.* *Vaccine.* 2009; 27(4):581-7.

114. Castellsague X, Munoz N, Pitisuttithum P, Ferris D, Monsonego J, Ault K, et al. *End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24-45 years of age.* *Br J Cancer.* 2011 May; 105(1):28-37.

115. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsague X, et al. *Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial.* *The Lancet Oncology.* 2012 Jan; 13(1):89-99.

116. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. *Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases.* *N Engl J Med.* 2007; 356:1928-43.

117. The FUTURE II Study Group. *Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions.* *N Engl J Med.* 2007;356:1915-27.

118. Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. *A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women.* *New England Journal of Medicine.* 2015; 372(8):711-23.

119. Kreimer AR, Rodriguez AC, Hildesheim A, Herrero R, Porras C, Schiffman M, et al. *Proof-of-principle evaluation of the efficacy of fewer than three doses of a bivalent HPV16/18 vaccine*. J Natl Cancer Inst. 2011 Oct 05; 103(19):1444-51.
120. Dobson SR, McNeil S, Dionne M, Dawar M, Ogilvie G, Krajden M, et al. *Immunogenicity of 2 doses of HPV vaccine in younger adolescents vs 3 doses in young women: a randomized clinical trial*. JAMA. 2013 May 01; 309(17):1793-802.
121. Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D. *Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines*. Vaccine. 2008 Aug 19; 26 Suppl 10:K62-7.
122. Bruni L, Serrano B, Bosch X, Castellsague X. *Vacuna frente al virus del papiloma humano. Eficacia y seguridad*. Enferm Infecc Microbiol Clin..2015; 33(5):342-54.
123. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ, et al. *American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer*. CA Cancer J Clin. 2002 Nov-Dec; 52(6):342-62.
124. 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*. Ann Oncol. 2010 Mar; 21(3):448-58.
125. Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. *Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. Br J Cancer. 1994 Jan; 69(1):167-71.
126. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. *Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS)*. J Natl Cancer Inst. 2002 Jan 16; 94(2):102-7.
127. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. *Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions*. Int J Gynaecol Obstet. 2002 Jan; 76(1):41-7.
128. van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. *Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal*

- cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer*. 2002 Apr 01; 98(4):590-5.
129. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. *Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer*. *Lancet*. 2002 Jul 20; 360(9328):228-9.
130. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. *Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer*. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul; 41(7):3221-8.
131. Josefsson A, Livak K, Gyllensten U. *Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay*. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar; 37(3):490-6.
132. Swan DC, Tucker RA, Holloway BP, Icenogle JP. A sensitive, type-specific, fluorogenic probe assay for detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol*. 1997 Apr; 35(4):886-91.
133. Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, Andersen PK, et al. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2000 Nov 01; 60(21):6027-32.
134. Tucker RA, Unger ER, Holloway BP, Swan DC. *Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18*. *Mol Diagn*. 2001 Mar; 6(1):39-47.
135. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK, et al. *Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples*. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep; 39(9):3204-12.
136. Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, et al. *Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind*. *J Virol*. 1992 Apr; 66(4):2057-66.
137. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, et al. *Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR*. *J Virol*. 2012 Jun; 86(12):6855-61.
138. IARC. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2007; 90:1-636.

139. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM: *Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline*. Infect Agent Cancer 2009; 4:8.
140. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. *Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women*. Clin Microbiol Infect. 2010 Jun; 17(6):941-6.
141. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodriguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. *Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease*. J Infect Dis. 2011 Apr 01; 203(7):910-20.
142. Garcia-Espinosa B, Moro-Rodriguez E, Alvarez-Fernandez E. *Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain*. BMC Cancer. 2012 Nov 20; 12:533.
143. Otero-Motta AP, Ordonez JL, Gonzalez-Celador R, Rivas B, Macias Mdel C, Bullon A, et al. *Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain*. APMIS. 2011 Mar; 119(3):204-15.
144. Cobo F, Concha A, Ortiz M. *Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution in Females with Abnormal Cervical Cytology. A Correlation with Histological Study*. Open Virol J. 2009 Sep 04;3:60-6.
145. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis*. Lancet Infect Dis. 2007 Jul;7(7):453-9.
146. Delgado D, Marin JM, de Diego J, Guerra S, Gonzalez B, Barrios JL, et al. *Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain*. Enferm Infecc Microbiol Clin.2012; 30(5):230-5.
147. Moore RA, Ogilvie G, Fornika D, Moravan V, Brisson M, Amirabbasi-Beik M, et al. *Prevalence and type distribution of human papillomavirus in 5,000 British Columbia women implications for vaccination*. Cancer Causes Control. 2009 Oct; 20(8):1387-96.

148. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. *Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings*. J Infect Dis. 2015 Dec; 202(12):1789-99.
149. Depuydt CE, Vereecken AJ, Salembier GM, Vanbrabant AS, Boels LA, van Herck E, et al. *Thin-layer liquid-based cervical cytology and PCR for detecting and typing human papillomavirus DNA in Flemish women*. Br J Cancer. 2003 Feb; 88(4):560-6.
150. Powell NG, Hibbitts SJ, Boyde AM, Newcombe RG, Tristram AJ, Fiander AN. *The risk of cervical cancer associated with specific types of human papillomavirus: a case-control study in a UK population*. Int J Cancer. 2010 Apr 01; 128(7):1676-82.
151. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. *Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities*. J Natl Cancer Inst. 2005 Jul 20; 97(14):1066-71.
152. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. *Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Jul; 15(7):1274-80.
153. Vaccarella S, Franceschi S, Snijders PJ, Herrero R, Meijer CJ, Plummer M. *Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Feb; 19(2):503-10.
154. Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, Downs LS, Jr. *Cervical cytology and multiple type HPV infection: a study of 8182 women ages 31-65*. Gynecol Oncol. 2013 Jun; 133(3):405-8.
155. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, et al. *High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease*. Int J Cancer. 2007 Dec 15; 121(12):2787-93.

156. Selva L, Gonzalez-Bosquet E, Rodriguez-Plata MT, Esteva C, Sunol M, Muñoz-Almagro C. *Detection of human papillomavirus infection in women attending a colposcopy clinic*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Aug; 64(4):416-21.
157. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. *A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica*. *J Infect Dis*. 2005 Jun 01; 191(11):1808-16.
158. Schiffman M, Kjaer SK. *Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia*. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:14-9.
159. SEER cancer statistics fact sheets: cervix uteri cancer. The SEER website. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html> [cited April 4, 2016.]
160. CDC. *Invasive cervical cancer among hispanic and non hispanic women United States 1992-1999*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002; 51:1067-70.
161. Lin L, Benard VB, Greek A, Hawkins NA, Roland KB, Saraiya M. *Racial and ethnic differences in human papillomavirus positivity and risk factors among low-income women in Federally Qualified Health Centers in the United States*. 2015 Dec; 81: 258-61.
162. Leyden WA, Manos MM, Geiger AM, Weinmann S, Mouchawar J, Bischoff K, et al. *Cervical cancer in women with comprehensive health care access: attributable factors in the screening process*. *J Natl Cancer Inst*. 2005 May 04;97(9):675-83.
163. Marks M, Gravitt PE, Utaipat U, Gupta SB, Liaw K, Kim E, et al. *Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance*. *J Clin Virol*. 2011 May; 51(1):44-9.
164. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, Zhang Y, He Y. *Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China*. *J Clin Virol*. 2006 Mar; 35(3):264-9.
165. Hernandez-Hernandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jimenez M, Apresa-Garcia T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, et al. *Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women*. *Gynecol Oncol*. 2003 Aug; 90(2):310-7.

166. Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, Olive D, et al. *Significance of HPV 16 and 18 viral load quantitation in women referred for colposcopy*. J Med Virol. 2012 Feb; 84(2): 306-13.
167. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. *Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases*. New England Journal of Medicine. 2007; 356(19):1928-43.
168. Monsonego J, Zerat L, Syrjänen K, Zerat JC, Smith J, Halfon P. *Prevalence of type-specific human papillomavirus infection among women in France: Implications for screening, vaccination, and a future generation of multivalent HPV vaccines*. Vaccine. 2012 Jul; 30 (35): 5215-5221.





ANEXOS

11. ANEXOS

 GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA DE SANITAT

 AGÈNCIA
VALENCIANA
DE SALUT

HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

En relación con el Proyecto de Investigación “**Desarrollo de nuevas técnicas microbiológicas en el estudio de la infección por papilomavirus**”, presentado por el **Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz** facultativo del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche, y evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Elche en la reunión de fecha 25 de mayo de 2010 tal y como queda reflejado en el acta de la reunión

Informamos que:

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

El diseño del estudio es correcto y adecuado para responder a los objetivos planteados.

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

Por todo ello, este Comité informa favorablemente dicho proyecto.

Elche, 26 de Mayo de 2010.



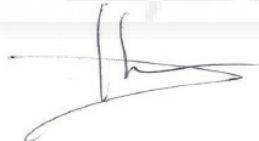
Fdo.: **Dr. Alberto Martín Hidalgo**
Secretario del CEIC del Hospital General Universitario de Elche

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

En relación al Proyecto de Investigación titulado “**Vacuna cuadrivalente y nonavalente frente al virus papiloma humano: asociación con los genotipos aislados en la infección cervical e impacto en el riesgo de lesiones de alto grado**”, cuyo investigador principal es la **Dra. Leticia Álvarez Paredes** del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Burgos e investigador colaborador la **Dra. Maria Montserrat Ruiz García** Servicio de Microbiología Hospital General Universitario de Elche.

Los miembros del CEIC, en su reunión del 28 de julio de 2016 tras la lectura y evaluación del proyecto, deciden emitir *Informe Favorable* al mismo.

Elche, 01 de Agosto de 2016



Fdo.: D. Alberto Martín Hidalgo
Secretario del CEIC
Hospital General Universitario de Elche