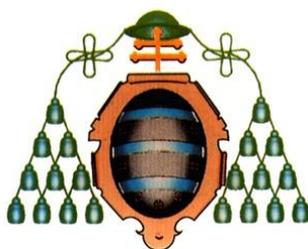


UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado: Investigación En Cirugía y
Especialidades Médico-Quirúrgicas



TESIS DOCTORAL

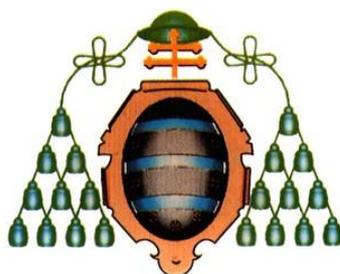
**VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y OTROS FACTORES
DETERMINANTES EN EL SEGUIMIENTO
POST-CONIZACIÓN POR DISPLASIA INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE ALTO GRADO**

Yolanda Ruano Rodríguez

Oviedo, 2012

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado: Investigación En Cirugía y
Especialidades Médico-Quirúrgicas



TESIS DOCTORAL

**VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y OTROS FACTORES
DETERMINANTES EN EL SEGUIMIENTO
POST-CONIZACIÓN POR DISPLASIA INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE ALTO GRADO**

Yolanda Ruano Rodríguez

Oviedo, 2012



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Virus del Papiloma Humano y otros factores determinantes en el seguimiento post-conización por displasia intraepitelial cervical de alto grado	Inglés: Human papillomavirus and other determinant factors in the follow-up post-conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia.
2.- Autor	
Nombre: Yolanda Ruano Rodríguez	-
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo. Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas.	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCIÓN

Actualmente está claramente establecida la relación causal entre la infección por el VPH de alto riesgo (VPH-AR) y el cáncer de cuello uterino, así como de sus lesiones precursoras (CIN 2-3).

El tratamiento conservador estándar del CIN 2-3 es la conización, pero del 1,5 al 48% de los casos presentarán enfermedad recurrente.

Diversos factores se han asociado a un mayor riesgo de recurrencia: la afectación de los márgenes quirúrgicos y la persistencia de la infección por el VPH-AR son los más relevantes.

La citología tiene una sensibilidad limitada en el control de curación post-conización (20-85%). El test de VPH, ya sea de forma aislada ó en combinación con la citología, puede incrementar la sensibilidad y el VPN para detectar enfermedad recurrente.

OBJETIVOS

Analizar los resultados del seguimiento post-conización por CIN 2-3 en la Unidad de Patología Cervical del HUCA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Análisis retrospectivo

Revisión de las historias clínicas de 372 mujeres conizadas en nuestra Unidad entre 1995 y 2009 por CIN 2-3 confirmado en la biopsia preoperatoria o en el cono.



2. Análisis prospectivo

Todas las mujeres (n=97) conizadas por CIN 2-3 en nuestra Unidad a lo largo del año 2010 realizaron consultas de seguimiento (citología, test VPH, colposcopia y biopsia si era procedente) a los 6, 12 y 18 meses.

RESULTADOS

1. Análisis retrospectivo

La media de edad fue de 35,6 años en el momento de la conización.

A lo largo de un tiempo medio de seguimiento de 66 meses, se objetivaron 32 recidivas (8,6%), considerando como tales a las CIN 2-3 demostradas mediante biopsia.

Las mujeres mayores de 40 años desarrollaron más recidivas de forma estadísticamente significativa.

No se encontró relación entre el resto de variables epidemiológicas (tabaquismo, paridad, ETS, edad de inicio de relaciones sexuales, método anticonceptivo, inmunosupresión) y el riesgo de recurrencia.

-Aclaramiento VPH: De las 238 pacientes incluidas en este análisis, 216 (90,75%) aclararon el virus durante el seguimiento.

Entre los 22 casos VPH-persistentes, destaca claramente el tipo 16 objetivado en 18 de ellos (82%).

-Márgenes: Los márgenes del cono estaban afectados en 36 de las 372 mujeres (9,67%). De las 334 mujeres con márgenes libres, 23 presentaron una recidiva (6,8%), mientras que de las 36 pacientes con márgenes afectados recidivaron 9 (25%). $p=0,00024$

-Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del test VPH, citología y doble test (citología+test VPH) como predictores de recidivas

	Sensibilidad %	Especificidad%	VPP %	VPN %
Test VPH	68,75	96,83	68,75	96,83
Citología	84,37	84,7	34,17	98,3
Doble test	90,62	72,53	24,57	98,74



2. Análisis prospectivo

La media de edad fue de 40 años.

A lo largo de un tiempo medio de seguimiento de 24 meses, se objetivaron 15 recidivas (15,4%).

Las mujeres mayores de 40 años y aquellas con antecedentes de otra/s ETS desarrollaron más recidivas de forma estadísticamente significativa.

-Aclaramiento VPH: De las 68 pacientes incluidas en este análisis, 56 (82%) aclararon el virus durante el seguimiento.

Entre los 12 casos VPH-persistentes, destaca nuevamente el tipo 16.

-Márgenes: Los márgenes del cono estaban afectados en 30 de las 97 mujeres (31%).

De las 64 mujeres con márgenes libres, 3 presentaron una recidiva (4,7%), sin embargo, de las 30 pacientes con márgenes afectos recidivaron 12(40%), $p=0,000013$

-Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del test VPH, citología y doble test:

	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Test VPH	80	92,7	66,6	96,2
Citología	100	81,7	50	100
Doble test	100	66	35	100

CONCLUSIONES

-Los márgenes afectos son un factor de riesgo de recidiva, sin embargo, la mayoría de las mujeres con márgenes positivos nunca presentará recurrencia y, un porcentaje pequeño, pero significativo de pacientes con márgenes libres sí la desarrollarán.

-Las mujeres mayores de 40 años desarrollaron más recidivas de forma estadísticamente significativa.

-La tasa de aclaramiento viral post-tratamiento fue alta en ambos análisis. Aunque el tipo 16 era el más frecuente entre los casos VPH-persistentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aclaramiento según fuese el tipo viral original.



-La citología aislada presenta mejor sensibilidad y VPN que el test VPH aislado a la hora de detectar recurrencias.

- En el análisis retrospectivo el doble test mejora la sensibilidad de ambas pruebas por separado, pero el VPN es prácticamente igual.
- En el prospectivo el doble test no añade nada a la citología porque ésta ya presenta una sensibilidad y VPN del 100%.
- En el seguimiento de una población de riesgo como ésta, priman la sensibilidad y el VPN sobre la especificidad y el VPP.

RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION

The role of high-risk HPV (HR-HPV) infections is well established in the pathogenesis of cervical dysplasia (CIN 2-3) and cervical cancer.

Conization (LEEP) is the conservative treatment for CIN 2-3, however, recurrent disease occurs in 1,5-48% of patients.

Several factors have been considered to be predictors of residual disease: the most important are positive resection margins and persistence of HR-HPV infection.

Cervical cytology presents limited sensitivity in the follow-up post-conization (20-85%). HPV testing, alone or combined with cytology, can increase sensitivity and NPV for identifying recurrent disease.

OBJECTIVES

To evaluate the results in post-conization follow-up for CIN 2-3 in our Cervical Pathology Unit of HUCA



MATERIALS AND METHODS

1. Retrospective analysis

The medical records of 372 women were reviewed. These subjects underwent LEEP in our Unit between 1995 and 2009 because of histologically confirmed CIN 2-3.

2. Prospective analysis

Every woman who underwent LEEP for CIN 2-3 in our Unit during the year 2010 (n=97) were tested by cytology, HPV testing, colposcopy and biopsy if necessary at 6, 12 and 18 months post treatment.

RESULTS

1. Retrospective analysis

At the time of treatment the median age was 35,6 years.

The median follow-up time was 66 months. Along this time, recurrent disease (histologically confirmed CIN 2-3) was observed in 32 cases (8,6%).

Women over 40 years had a significantly higher recurrence rate.

No correlation could be made when comparing several epidemiological factors (smoking, parity, sexually transmitted disease *STD*, age at first intercourse, method of contraception, immunosuppression) and risk of recurrence.

-HPV Clearance: 216 of 238 subjects included in this analysis (90,75%) cleared HPV during follow-up.

Type 16 was observed in 18 of 22 HPV-persistent cases (82%).

-Margins: Resection margins were positive in 36 of 372 women (9,67%).

Of the 334 margin-free women, 23 had recurrent disease (6,8%) versus 9 of the 36 margin-positive patients (25%). $p=0,00024$

-Sensitivity, specificity, NPV y PPV of HPV testing, cytology and combination testing:

	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %
HPV testing	68,75	96,83	68,75	96,83
Cytology	84,37	84,7	34,17	98,3
Combination testing	90,62	72,53	24,57	98,74



2. Prospective analysis

The median age was 40 years.

The median follow-up time was 24 months. Along this time, recurrent disease was observed in 15 cases (15,4%).

Women over 40 years and those with history of previous STD had a significantly higher recurrence rate.

-HPV Clearance: 56 of 68 subjects included in this analysis (82%) cleared HPV during follow-up.

Type 16 was again the most common type observed among the 12 HPV-persistent cases.

-Margins: Resection margins were involved in 30 of 97 women (31%).

Of the 64 margin-free women, 3 had recurrent disease (4,7%) versus 12 of the 30 margin-positive patients (40%). $p=0,000013$

-Sensitivity, specificity, NPV y PPV of HPV testing, cytology and combination testing:

	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %
HPV testing	80	92,7	66,6	96,2
Cytology	100	81,7	50	100
Combination testing	100	66	35	100

CONCLUSIONS

-Positive resection margins are associated with an increased risk of recurrent disease. Nevertheless, most women with incomplete excision will never have recurrence and a small but significant number of margin-free subjects will have recurrent disease.

-Women over 40 years had a significantly higher recurrence rate.

-HPV clearance rate post-treatment was high in both analysis. Although type 16 was the most common type among HPV- persistent cases, no significant difference was found in the clearance rate depending on the viral type pre-conization.

-Cytology alone has higher sensitivity and NPV than HPV testing alone in predicting



recurrences.

- In retrospective analysis, combination testing showed an improvement in sensitivity compared to cytology or HPV testing alone. Nevertheless, the NPV was practically the same.
- In prospective analysis, combination testing adds nothing to cytology because papanicolau smear sensitivity and NPV are 100%.
- In the follow-up of a population at risk (women post-conization), sensitivity and NPV are more important than specificity and PPV.

A mis padres
A Marcos

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación por mi parte, no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas las personas que a continuación citaré.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Al Dr. Francisco Javier Ferrer Barriendos, director de esta tesis, por haber confiado en mí y por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección.

A la Dra. Magda Torrents, por la idea original, por todo lo aprendido a su lado y su inestimable ayuda.

A Delfi, enfermera de la Consulta de Patología Cervical del Hospital Universitario Central de Asturias, por su maravillosa forma de ser y toda la colaboración prestada.

A Laura, Marta Elena, Santiago Melón y María de Oña, del Servicio de Microbiología, por compartir conmigo sus conocimientos y su incondicional ayuda siempre que fue precisa.

A Fernando Graña, por todo el tiempo que me dedicó ayudándome con la estadística.

A todos mis compañeros del Servicio de Ginecología que me han animado y dado aliento durante el desarrollo de este trabajo.

A toda mi familia, por ser mi mayor apoyo en la vida, especialmente a mis padres por su cariño y motivación y a mi hermana Patricia.

A Marcos, sin cuya paciencia y colaboración infinitas no habría podido llegar hasta aquí.

En general quisiera agradecer a todas las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y sus bajos; el haberme brindado su apoyo, colaboración y, sobre todo, cariño y amistad.

ABREVIATURAS

ACOS	Anticonceptivos combinados orales
AIS	Adenocarcinoma in situ
AR	Alto riesgo
ASCUS	<i>Atypical squamous cells unknown significance</i>
AGUS	<i>Atypical glandular cells unknown significance</i>
BR	Bajo riesgo
CIN	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
EDTA	Tetracetato de disodio etilín-diamina
FDA	Food and Drug Administration
HC2	<i>Hybrid Capture 2</i> ®
HSIL	<i>High grade squamous intraepithelial lesion</i>
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
Ki-67	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67
LEEP	<i>Loop Electrosurgical Excision Procedure</i>
LSIL	<i>Low grade squamous intraepithelial lesion</i>
PAS	Ácido periódico-reactivo de Shiff
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P16	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Epidemiología del cáncer cervical y terminología de sus lesiones precursoras	3
1.2	Historia natural de la infección por el VPH.....	5
1.3	Tratamiento de las lesiones de alto grado y riesgo de cáncer a largo plazo	8
1.4	Factores relacionados con la probabilidad de recidiva post-tratamiento.....	10
1.5	Infección persistente post-conización por VPH-AR como factor de riesgo de recidiva.....	15
1.6	Citología y test de VPH en el seguimiento post-conización.....	20
1.7	Situación actual en el seguimiento post-conización por CIN 2-3.....	27
2.	OBJETIVOS	31
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.1	ANÁLISIS RETROSPECTIVO	39
3.1.1	Población del estudio	39
3.1.2	Variables analizadas	42
3.1.3	Conizaciones.....	43
3.1.4	Citologías.....	45
3.1.5	Biopsias.....	48
3.1.6	Detección genómica del VPH.....	53
3.1.7	Análisis de los datos y metodología estadística.....	59
3.2	ANÁLISIS PROSPECTIVO	61
3.2.1	Población del estudio y protocolo de seguimiento	61
3.2.2	Variables analizadas	63
3.2.3	Conizaciones, citologías, biopsias y test ADN-VPH.....	64
4.	RESULTADOS	65
4.1	ANÁLISIS RETROSPECTIVO	67
4.1.1	Estudio anatómico-patológico previo a la conización	67
4.1.2	Estudio viral previo a la conización.....	70
4.1.3	Tiempo de seguimiento y pruebas realizadas durante el mismo	72
4.1.4	Tasa y tiempo de aparición de las recidivas	76
4.1.5	Influencia de distintos factores epidemiológicos sobre la tasa de recidivas.....	78
4.1.6	Aclaramiento VPH.....	81
4.1.7	Tiempo de aclaramiento	85
4.1.8	Nuevas infecciones	89
4.1.9	Otras infecciones adquiridas.....	93
4.1.10	Márgenes y afectación endocervical.....	97
4.1.11	Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del test VPH, citología y doble test	99
4.1.12	Concordancia citología-test VPH post-conización	104
4.1.13	Concordancia citología-biopsia post-conización.....	105
4.1.14	Piezas de conización sin displasia	105
4.1.15	Conizaciones sucesivas e hysterectomías.....	109
4.2	ANÁLISIS PROSPECTIVO	114

4.2.1	Estudio anatómico-patológico previo a la conización	114
4.2.2	Estudio viral previo a la conización.....	118
4.2.3	Tiempo de seguimiento y pruebas realizadas durante el mismo	120
4.2.4	Tasa y tiempo de aparición de las recidivas	124
4.2.5	Influencia de distintos factores epidemiológicos sobre la tasa de recidivas.....	126
4.2.6	Aclaramiento VPH.....	129
4.2.7	Tiempo de aclaramiento	133
4.2.8	Nuevas infecciones	136
4.2.9	Otras infecciones adquiridas.....	138
4.2.10	Márgenes y afectación endocervical.....	140
4.2.11	Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del test VPH, citología y doble test	142
4.2.12	Protocolo propuesto del doble test según el estado de los márgenes.....	147
4.2.13	Concordancia citología-test VPH post-conización	148
4.2.14	Concordancia citología-biopsia post-conización	148
4.2.15	Piezas de conización sin displasia	149
4.2.16	Conizaciones sucesivas e histerectomías	151
5.	DISCUSIÓN	155
5.1	Estudio anatómico-patológico previo a la conización	157
5.2	Estudio viral previo a la conización.....	158
5.3	Tasa y tiempo de aparición de las recidivas	160
5.4	Influencia de distintos factores epidemiológicos sobre la tasa de recidivas.....	161
5.5	Aclaramiento VPH.....	165
5.6	Tiempo de aclaramiento	167
5.7	Estado de los márgenes.....	169
5.8	Afectación endocervical	172
5.9	Valor predictivo del test VPH, citología y doble test	173
5.10	Concordancia citología-test VPH y citología-biopsia	176
5.11	Protocolos propuestos	178
5.12	Piezas de conización sin displasia	184
6.	CONCLUSIONES	187
7.	ANEXOS	193
8.	BIBLIOGRAFÍA	207

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tamaño muestral del análisis retrospectivo.....	41
Figura 2.	Esquema de conización con asa circular.	44
Figura 3.	Citología de las células epidermoides en la prueba Papanicolaou: normal, LSIL y HSIL.....	47
Figura 4.	Tinción celular con sobreexpresión de p16 y Ki-67.....	50
Figura 5.	Biopsias cervicales: normal, CIN I, CIN II y CIN III	52
Figura 6.	Electroforesis en gel de agarosa	56
Figura 7.	Representación de distintas técnicas de hibridación, protocolo clásico y actual.....	58
Figura 8.	Tamaño muestral del análisis prospectivo.....	62
Figura 9.	Meses de seguimiento post-conización. Análisis retrospectivo	73
Figura 10.	Citologías de seguimiento realizadas. Análisis retrospectivo.....	74
Figura 11.	Test VPH de seguimiento realizados. Análisis retrospectivo	75
Figura 12.	Meses transcurridos hasta la recidiva. Análisis retrospectivo.....	77
Figura 13.	Tipos virales persistentes post-conización. Análisis retrospectivo.....	82
Figura 14.	Tiempo de aclaramiento VPH post-conización. Análisis retrospectivo	86
Figura 15.	Tipos virales de las <i>nuevas infecciones</i> . Análisis retrospectivo.....	90
Figura 16.	Tasa de aclaramiento de las <i>nuevas infecciones</i> . Análisis retrospectivo	92
Figura 17.	Tipos virales de <i>otras infecciones adquiridas</i> . Análisis retrospectivo.....	94
Figura 18.	Tasa de aclaramiento de <i>otras infecciones adquiridas</i> . Análisis retrospectivo	96
Figura 19.	Tasa de recidivas en función de la afectación de los márgenes quirúrgicos. Análisis retrospectivo	98
Figura 20.	Resultado anatomo-patológico de las piezas de conización. Análisis retrospectivo	107
Figura 21.	Mujeres con 2 ^a -3 ^a conización o histerectomía, motivos y seguimiento. Análisis retrospectivo	111
Figura 22.	Meses de seguimiento post-conización. Análisis prospectivo	121
Figura 23.	Test VPH de seguimiento realizados. Análisis prospectivo	122
Figura 24.	Citologías de seguimiento realizadas. Análisis prospectivo	123
Figura 25.	Meses transcurridos hasta la recidiva. Análisis prospectivo.....	125
Figura 26.	Tipos virales persistentes post-conización. Análisis prospectivo	130
Figura 27.	Tiempo de aclaramiento VPH post-conización. Análisis prospectivo.....	134
Figura 28.	Tipos virales de las <i>nuevas infecciones</i> . Análisis prospectivo.....	137
Figura 29.	Tipos virales de <i>otras infecciones adquiridas</i> . Análisis prospectivo.....	139
Figura 30.	Tasa de recidivas en función de la afectación de los márgenes quirúrgicos. Análisis prospectivo.....	141
Figura 31.	Resultado anatomo-patológico de las piezas de conización. Análisis prospectivo.....	150

Figura 32. Mujeres con 2°-3° conización o histerectomía, motivos y seguimiento.	
Análisis prospectivo.....	152

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor del índice kappa.....	60
Tabla 2. Comparativa entre citología, biopsia preoperatoria y pieza conización. Análisis retrospectivo	69
Tabla 3. Distribución de los tipos virales observados pre-conización. Análisis retrospectivo	71
Tabla 4. Variables epidemiológicas en relación a tasa de recidivas. Análisis retrospectivo	80
Tabla 5. Tasas de aclaramiento post-conización según tipo viral pre-conización. Análisis retrospectivo	84
Tabla 6. Tiempo de aclaramiento según tipo viral pre-conización. Análisis retrospectivo	88
Tabla 7. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del test VPH, la citología y el doble test como predictores de recidivas. Análisis retrospectivo.....	103
Tabla 8. Comparativa entre citología, biopsia preoperatoria y pieza conización. Análisis prospectivo	117
Tabla 9. Distribución de los tipos virales observados pre-conización. Análisis prospectivo.....	119
Tabla 10. Variables epidemiológicas en relación a tasa de recidivas. Análisis prospectivo.....	128
Tabla 11. Tasas de aclaramiento post-conización según tipo viral pre-conización. Análisis prospectivo	132
Tabla 12. Tiempo de aclaramiento según tipo viral pre-conización. Análisis prospectivo.....	135
Tabla 13. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del test VPH, la citología y el doble test como predictores de recidivas. Análisis prospectivo	146

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer cervical y terminología de sus lesiones precursoras

La neoplasia de cuello de útero es el tercer cáncer más frecuente entre las mujeres de todo el mundo. Se estima que cada año se diagnostican aproximadamente 500.000 nuevos casos, de los cuales el 85% se observan en países en vías de desarrollo (1;2). La distribución del cáncer cervical invasivo es claramente bimodal: la tasa ajustada a la población mundial asciende desde un 17,6 por 100.000 mujeres/año entre los 30-34 años a un 28 entre los 45-49 años de edad, con un descenso posterior y un repunte al 33,1 entre los 60-64 años. España presenta una de las tasas de incidencia más bajas de Europa oscilando entre 4 y 10 casos por 100.000 mujeres y por año, dependiendo del registro poblacional (2;3). Se estima que la tasa de mortalidad en nuestro país es de 3,2 por 100.000/año, lo que representa 739 casos por año (4).

La baja incidencia en países desarrollados se debe, al menos en parte, a la eficacia de los programas de cribado basados en la citología cervical. El cribado tiene como objetivo detectar las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino que, según el Sistema Bethesda revisado en 2001(anexo 1), se clasifican citológicamente en:

- Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL, *low grade squamous intraepithelial lesion*). Esta lesión equivale a la displasia leve o neoplasia cervical intraepitelial de bajo grado (CIN 1) en la antigua clasificación de Richart de 1967.
- Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL, *high grade squamous intraepithelial lesion*). Esta lesión incluye las displasias moderadas y graves, también llamadas neoplasias cervicales

intraepiteliales de grados medio y alto (CIN 2 y 3) en la clasificación de Richart. El CIN 3 engloba a lo que clásicamente se denominó displasia grave y carcinoma *in situ* ya que son 2 lesiones indistinguibles histológicamente.

- Adenocarcinoma in situ endocervical (AIS).

A pesar de que la citología es la técnica empleada en el cribado, el examen histológico es el método diagnóstico clave de las lesiones premalignas del cérvix uterino. Estas lesiones se clasifican actualmente desde un punto de vista histológico según los criterios de Richart en neoplasias cervicales intraepiteliales de grado 1 (CIN 1), grado 2 (CIN 2) y grado 3 (CIN 3). En la actualidad, muchos patólogos utilizan la terminología de Bethesda en el diagnóstico histológico, agrupando el CIN 2-3 bajo el término HSIL, aunque ello debería acompañarse siempre del grado de Richart, que se considera el criterio de referencia (5).

En la guía de consenso más reciente de la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP,2006) se especifica que la clasificación histológica empleada en dicha guía divide a las lesiones cervicales en 2 categorías aplicando el término CIN 1 para las lesiones de bajo grado y CIN 2-3 para las lesiones de alto grado (6).

A partir de ahora, nos referiremos con LSIL/HSIL para hablar en términos citológicos y con CIN 1 / CIN 2-3 para hablar en términos histológicos.

Debido a la menor eficacia de la citología en la detección de lesiones precursoras del adenocarcinoma de cuello uterino, se ha descrito un incremento en la incidencia de este tipo de cáncer en los últimos 20 años (7;8). Las pacientes con adenocarcinoma cervical tienen un número de

citologías normales previas al diagnóstico significativamente mayor que las que presentan un carcinoma escamoso (9). El desconocimiento preciso de la historia natural del adenocarcinoma y la falta de criterios citológicos y colposcópicos bien establecidos y reproducibles para su detección o la de sus lesiones precursoras podrían ser la causa de esta situación.

1.2 Historia natural de la infección por el VPH

En la actualidad está claramente establecida la relación causal entre la infección de transmisión sexual por el virus del papiloma humano (VPH) y el carcinoma de cuello uterino, así como de sus lesiones precursoras y otras neoplasias de la vulva, vagina y ano (10).

Se conocen más de 100 tipos de virus dentro de la familia VPH, de los cuales aproximadamente 40 infectan el área genital y anal. Según su potencial oncogénico, se clasifican en tipos VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y VPH de alto riesgo (VPH-AR).

La infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente; se estima que hasta el 80% de las mujeres sexualmente activas entrarán en contacto con el virus en algún momento de sus vidas (11). En la segunda década de la vida la prevalencia es del 20-25%, pero en algunos grupos de adolescentes o de mujeres jóvenes la infección llega a afectar hasta a un 70% de los individuos (12). En la tercera década la prevalencia disminuye considerablemente, y a partir de los 35 años se mantiene estable, próxima al 5% (13). Sin embargo, a pesar de esas cifras de prevalencia tan elevadas en mujeres jóvenes y de mayor actividad sexual, la inmensa mayoría de las infecciones, tanto de alto como de bajo riesgo, se aclaran y evolucionan de forma natural hacia la curación espontánea (12-17).

Un 25% de las mujeres con infecciones transitorias por el VPH muestra en la citología cambios propios de las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) (18). Estas lesiones contienen en su mayor parte virus de bajo riesgo, razón por la cual raramente van a progresar. Una extensa revisión de la literatura médica mostró que las LSIL remiten espontáneamente hasta en un 60% de los casos, sobre todo en mujeres jóvenes, persisten en el 30%, progresan a lesión intraepitelial de alto grado (HSIL) en el 10% y a cáncer invasivo en el 1% (19). Estos datos permiten que, tras descartar la presencia de una lesión más avanzada, la abstención terapéutica y el control durante 24 meses sean una opción válida para las LSIL, evitando a menudo los sobretamientos injustificados (20).

La interrelación entre el VPH y el huésped es compleja y variada. La infección por el virus es una condición necesaria, pero no suficiente, para la transformación neoplásica, de tal forma que sólo una pequeña fracción de las mujeres infectadas con VPH-AR presentará un HSIL/CIN 2-3 y eventualmente cáncer (21;22). Por este motivo se ha sugerido que existen otros co-factores de progresión que favorecen la persistencia de la infección por VPH.

Estos factores se clasifican en:

- Cofactores virales:
 - ✓ Genotipo: el tipo 16 presenta un riesgo acumulado de producir HSIL/CIN 2-3, a 10 años, de algo más del 20%; frente al 17% del tipo 18. El resto de los tipos de alto riesgo, entre el 1 y el 2% (23).

- ✓ Carga viral elevada e infección simultánea por múltiples tipos de VPH: la importancia pronóstica de estos 2 factores no está aún bien establecida (17;24).
- ✓ Nivel de integración con el ADN celular (25;26).
- Cofactores genéticos: marcadores de susceptibilidad genética que regulan la respuesta inmunitaria a la infección por el VPH (27).
- Cofactores ambientales:
 - ✓ Tabaquismo: el riesgo de cáncer cervical en mujeres VPH positivas que a la vez son grandes fumadoras es de 2 a 3 veces mayor que en mujeres no fumadoras (28-34).
 - ✓ Uso prolongado de anticonceptivos hormonales: un metaanálisis constató un aumento del riesgo de cáncer de cuello de útero de hasta 4 veces en mujeres infectadas por el VPH que habían usado estos métodos anticonceptivos durante largo tiempo (35), pero otros autores (36) no encontraron esta asociación positiva.
 - ✓ Multiparidad: el mecanismo por el cual las mujeres con múltiples partos tienen mayor tendencia a la persistencia / progresión de la infección por VPH está poco claro, pero ampliamente demostrado (29;37;38).
 - ✓ Inmunosupresión: ya sea iatrogénica en pacientes con trasplante renal (39) ó la debida a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (40-43).
 - ✓ Coinfección con otros agentes de transmisión sexual: especialmente el virus del herpes simple tipo 2 ó Chlamydia trachomatis pueden aumentar el riesgo en 2 ó 3 veces (44-47).

Por tanto, en determinadas circunstancias fisiológicas de permisividad inmunológica y tras un periodo de persistencia de la infección por VPH-AR generalmente largo, las partículas del ADN viral que se encuentran en estado de latencia sufren un proceso de integración dentro del genoma de las células cervicales, originándose la proliferación celular alterada que será la base de la transformación tumoral. La duración media del proceso oncogénico puede estimarse en la mayoría de los casos entre 10 y 20 años (48).

1.3 Tratamiento de las lesiones de alto grado y riesgo de cáncer a largo plazo

Toda lesión de alto grado diagnosticada por biopsia debe ser tratada para evitar su progresión, ya que, a diferencia de las lesiones de bajo grado, únicamente el 20% de los CIN 2-3 van a regresar espontáneamente mientras que el resto persistirán o progresarán a cáncer invasivo (49;50).

La edad media de las mujeres con CIN 2-3 es, aproximadamente, 30 años. En los países desarrollados, las mujeres a esta edad generalmente no han completado, o ni siquiera iniciado, su deseo genésico. Por tanto, se requiere un tratamiento conservador con una eficacia terapéutica demostrada y que además preserve la anatomía y funcionalidad del cérvix, respetando así la fertilidad de estas mujeres (51).

Los tratamientos disponibles se dividen en 2 modalidades: los tratamientos destructivos (vaporización con láser, crioterapia o electrocoagulación) y los escisionales (conización con bisturí frío, láser CO₂ o asa diatérmica).

Los tratamientos escisionales son los de elección en pacientes diagnosticadas de CIN 2-3. Su principal ventaja es que, al contrario que los tratamientos destructivos, permiten obtener material para el estudio histológico en el que se diagnostica un carcinoma oculto inicialmente invasivo en el 1% de los casos. La histerectomía, tradicionalmente incluida entre los tratamientos escisionales, no está justificada como tratamiento primario de las lesiones intraepiteliales, sino como secundario, tras una primera exéresis, por fallo del tratamiento o imposibilidad de control posterior (52).

Aunque en una revisión de la Cochrane Library no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes técnicas escisionales, presentando todas ellas unos porcentajes de curación en torno al 90%, la conización con asa diatérmica o en inglés LEEP (*Loop Electrosurgical Excision Procedure*) aparece como la opción más favorable ya que consigue piezas mejores con menor morbilidad, con anestesia local y de forma ambulatoria (53).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que las mujeres tratadas por una lesión intraepitelial presentan un riesgo mayor a largo plazo de desarrollar un cáncer cervical invasivo comparadas con aquellas mujeres que nunca hayan tenido CIN. Así, en un estudio multicéntrico de Reino Unido en el que se realizó seguimiento post-conización a 2116 mujeres durante 8 años, Soutter et al concluyeron que el riesgo de cáncer invasivo en estas pacientes era 5 veces mayor que el de la población general (54). En este mismo sentido, una publicación finlandesa más reciente en la que se estudiaron 7564 mujeres con una media de seguimiento de 12 años, refleja que el riesgo elevado de cáncer invasivo tras un tratamiento conservador por CIN persiste incluso durante los 20 años posteriores a la conización (55). Asimismo, Strander et al (56)

llegaron a la misma conclusión en un importante estudio sueco que incluyó a 132493 mujeres. En su análisis prospectivo, resaltan que el riesgo de cáncer a largo plazo en las mujeres conizadas es mayor que el de la población general durante 25 años post-tratamiento y, además, este riesgo es especialmente elevado en aquellas pacientes que tenían 50 años ó más en el momento de la conización. Por último, en un reciente estudio retrospectivo de la Universidad de California, se observó que a lo largo de 18 años de seguimiento, la cohorte de mujeres tratadas por CIN 1, 2 o 3 presentaba una incidencia de cáncer invasivo de 37 casos/100.000 mujeres-año en comparación con 6 cánceres/100.000 mujeres-año en la cohorte de mujeres sin CIN previo (57).

1.4 Factores relacionados con la probabilidad de recidiva post-tratamiento

El control de las pacientes tratadas por HSIL/CIN 2-3 tiene como objetivo el diagnóstico precoz de una posible persistencia o recidiva, con el fin de tratarla y evitar que progrese a cáncer. Tras una conización con asa por CIN 2-3 se estima que entre el 1,5 y el 48% de los casos presentan una enfermedad residual o recurrente (58-97). Este rango tan amplio es debido, en parte, a la inexistencia de una definición universal de recidiva: mientras algunos autores consideran como tal el simple hecho de presentar alguna citología de seguimiento alterada (65;73), otros establecen que la displasia, de cualquier grado, debe demostrarse en biopsia (62;69;76) y la mayoría definen la recidiva como el hallazgo histológico de CIN 2+ (78;82;85;92;94).

La histerectomía total no excluye del riesgo de recidiva en la cúpula vaginal, incluso a largo plazo (98).

Diversos factores se han asociado a un mayor riesgo de persistencia o recurrencia de una lesión intraepitelial después de haber sido tratada mediante un tratamiento escisional: afectación de los márgenes quirúrgicos, la edad, el estado inmunológico (74;99) y la persistencia de la infección por el VPH post-tratamiento (61-67;69-73;75;77;78;80;82;85;89-91;94;96;97;100-119).

1. Afectación de los márgenes quirúrgicos

Entre un 1-55% de las piezas quirúrgicas tras una conización, presentan displasia en alguno de sus márgenes de resección (61-65;67;69-71;73;75;79;81;91;93;95;100;101;117;118;120-131). En un porcentaje mucho menor, entre un 6 a un 10%, los márgenes son referidos como difíciles de evaluar por el patólogo (73;131).

Hace ya tiempo que está claro que la presencia de márgenes positivos no es equivalente a enfermedad residual, y que, por tanto, no es necesario realizar una segunda conización a estas pacientes, sino que un seguimiento estricto sería suficiente (132). En efecto, se considera un método predictivo inexacto de enfermedad residual/recurrente ya que un número pequeño pero significativo de mujeres con márgenes libres recurren, y la mayoría de las pacientes con márgenes afectados permanecen libres de enfermedad (70;81;128;133).

Sin embargo, el valor de los márgenes quirúrgicos como factor predictivo de recurrencia de la enfermedad, continua siendo controvertido: aunque numerosos estudios reflejan un mayor riesgo de persistencia-recurrencia en las pacientes con una excisión incompleta de la displasia (62;67;70;74;79;84;90;92;96;100;101;107;110-112;123;125-127;134-139), otros sugieren que la correlación entre el estado de los márgenes y el riesgo de recurrencia es baja (61; 64; 68; 69; 73; 76; 91; 117; 130; 140). Algunas

publicaciones encuentran una significación estadística cuando el margen endocervical está afectado, pero no cuando lo está el exocervical (86;122); mientras que otros autores (70) no observaron diferencias dependiendo de cuál de los dos márgenes estaba afecto. Por otro lado, el análisis de Park et al (65) mostró que un margen de resección positivo era un factor de riesgo para presentar citologías anormales de forma recurrente, mientras que no influía en la probabilidad de presentar biopsias alteradas en el seguimiento de estas pacientes.

La mayoría de estos estudios no diferencian entre enfermedad residual o persistente y enfermedad recurrente; sin embargo, Houfflin Debarge et al (75) definen en su trabajo enfermedad residual como aquella lesión confirmada mediante biopsia dentro del primer año post-conización (citologías de control alteradas) y, por otro lado, definen enfermedad recurrente a aquella lesión confirmada histológicamente que aparece después de al menos dos citologías post-tratamiento negativas. Este autor concluye que las pacientes con márgenes positivos en la pieza de conización tienen mayor probabilidad de presentar enfermedad residual, pero no existe correlación entre la afectación de los márgenes y la enfermedad recurrente.

El Documento de Consenso de la SEGO (141) entiende como recurrencia ó enfermedad “de novo” cuando habiendo transcurrido un año tras el tratamiento, durante el cual se haya seguido un estricto control sin detectar enfermedad residual, aparece ésta. Destaca que el lapso de tiempo es arbitrario, pero es necesario definirlo para evitar que el médico se encuentre permanentemente expuesto a la imputación de fallo en su tratamiento.

2. Edad

También la edad es un factor predictivo de recurrencia controvertido, mientras la mayoría de los estudios no encuentran ninguna correlación entre la edad y la probabilidad de presentar una recidiva (62-65;67-70;72;76;79;89;90;92;101;110;114;123;124;134;142), varios autores señalan que las mujeres mayores de 35, 40 o 50 años tienen un riesgo aumentado, hasta cinco veces mayor, de enfermedad residual/recurrente (56;57;71;74;81;100;107;120;122;138;139). Sorprendentemente, Flannelly et al (137) observaron en su estudio que las mujeres menores de 21 años y las mayores de 40 años tenían tasas de recurrencia más elevadas que las de 26-40 años, aunque sin alcanzar la significación estadística. Igualmente, Jansen et al (126) encontraron que las pacientes con un seguimiento post-conización positivo (al menos 2 citologías con LSIL o una con HSIL) eran significativamente más jóvenes que aquellas en las que no se observó ningún signo de recurrencia.

3. Otros factores

Otros factores que podrían relacionarse con el riesgo de persistencia o recurrencia de la displasia, han sido mucho menos estudiados. Entre éstos se encuentran la paridad, el tabaquismo, el estado menopáusico, la inmunosupresión, la asociación con otras enfermedades de transmisión sexual, la edad de inicio de las relaciones sexuales y el método anticonceptivo utilizado. La mayoría de las publicaciones no encuentran significación estadística entre dichos factores y el riesgo de recurrencia (62;63;65;71;72;79;81;101;114;143), sin embargo Park et al y Lin et al (68;144) sí encontraron, en sus análisis multivariantes, el estado

postmenopaúsico como un factor de riesgo de persistencia-recurrencia de displasia.

Por otro lado, Acladious et al (109) en su importante estudio multicéntrico prospectivo de cohortes, destacan que el tabaco aumenta la probabilidad de presentar un fallo del tratamiento hasta en 3,17 veces, y que esta respuesta es dosis dependiente, es decir, que por cada 10 cigarrillos al día adicionales, ese riesgo aumenta 2,58 veces. También Sarian et al (120) encontraron que el tabaquismo estaba, independientemente del estado de los márgenes, fuertemente asociado con la persistencia de la infección por VPH post-tratamiento, aunque no especifica si este hecho se asocia con mayor riesgo de recurrencia. En este mismo estudio, no se encontró, sin embargo, ninguna relación entre el comienzo de relaciones sexuales antes de los 18 años o el empleo de anticonceptivos orales con la persistencia de la infección por el virus. Igualmente Kocken et al (94) encuentran un elevado riesgo adicional de recidiva entre las fumadoras de más de 10 cigarrillos diarios, mientras que no observan esta relación ni entre las usuarias de anticonceptivos orales ni en las mujeres que habían tenido uno o más partos.

En cuanto al estado de inmunosupresión, Coronado et al (145) y Brockmeyer et al (74) destacan su papel como factor de riesgo de persistencia-recurrencia de la displasia. Este último también encontró significación estadística, aunque sólo en el análisis univariante, para la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual asociadas; sin embargo señala que ni el tabaco ni el empleo de anticonceptivos orales son factores de riesgo. Otros investigadores no encontraron relación entre la presencia de enfermedades médicas asociadas ó el estado de inmunosupresión, y el riesgo de recidiva (65;71;101).

1.5 Infección persistente post-conización por VPH-AR como factor de riesgo de recidiva

Sin duda, el factor de riesgo de persistencia-recurrencia de la displasia más estudiado en los últimos años es la persistencia de la infección por el VPH de alto riesgo.

1. Técnicas de detección del ADN-VPH

En la actualidad se dispone de varias técnicas moleculares sensibles, fiables y reproducibles para la detección del ADN-VPH que han mejorado notablemente los resultados que se obtenían con las técnicas iniciales. La *reacción en cadena de polimerasa* (PCR) es un método de amplificación molecular que permite identificar cantidades muy pequeñas del ADN viral. Tiene una elevada sensibilidad y es capaz de detectar hasta un mínimo de 10 copias de ADN-VPH entre 1 millón de células. Su principal ventaja es que permite identificar el tipo específico de VPH, pero para realizar esta técnica es preciso disponer en el laboratorio de personal especializado, dada la posibilidad de contaminación cruzada y de interpretación diagnóstica errónea si no se tiene el material y el entrenamiento adecuados (146).

La *captura de híbridos* es una técnica de amplificación de la señal con buenos resultados. La Hybrid Capture II ® (HC-II) tiene una adecuada relación entre sensibilidad y especificidad si se establecen límites de señal lumínica adecuados. La utilización de un “cóctel” de sondas de alto riesgo, que en la última versión incluye 13 tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otro para el grupo de bajo riesgo que incluye 5 tipos (6, 11, 42, 43 y 44), permite la detección de cualquiera de estos tipos en dos

únicas reacciones, si bien en la práctica clínica sólo se usa habitualmente la de alto riesgo. El inconveniente principal de la captura de híbridos es que no permite distinguir entre los diferentes tipos virales ni la presencia de infecciones múltiples (5).

En un reciente estudio sueco se compararon ambas técnicas, PCR y HC-II, tomando muestras a 177 mujeres para test de ADN-VPV antes y 4-6 meses después de un tratamiento excisional por CIN 2-3. Los autores observaron una concordancia importante en los resultados, y concluyen que las sensibilidades de los 2 métodos son elevadas y casi equivalentes (147). También Kulmala et al (148) obtuvieron resultados muy similares en su trabajo comparativo. Las 2 técnicas han sido aprobadas por la FDA.

2. Aclaramiento del VPV post-conización

En el seguimiento post-conización, la tasa de aclaramiento del papilomavirus oscila en los estudios publicados entre el 26-100% (63; 64; 67-70; 72; 73; 75; 77; 78; 80; 83; 91; 93; 100; 101; 105; 106; 109-111; 113; 118; 120-122; 124; 142; 149-154). Es importante destacar que para hablar de aclaramiento en sentido estricto, no debe encontrarse el tipo de VPV inicial, previo a la conización, en los controles posteriores al tratamiento. De esta forma, aquellos casos en los que el test de VPV post-conización sea positivo para un tipo distinto al original, deben considerarse como nuevas infecciones y no como infecciones persistentes, resistentes al tratamiento. En este sentido, varios estudios cometen el error de describir su tasa de aclaramiento sin tener en cuenta el tipaje del virus, ya que para la detección del DNA viral emplean la técnica de captura de híbridos (63;68;70;75;93;100;118;120;121;142;149).

El aclaramiento viral es relativamente rápido tras el tratamiento; así Baloglu et al (100), Nagai et al (73), Bodner et al (111), Riethmuller et al (91) y Zielinski et al (149) encontraron a los 3 meses post-conización un 69%, 70%, 73%, 77% y 78% de aclaramiento respectivamente. Kim et al (63) encontraron una importante progresión a lo largo del tiempo, de forma que a los 3 meses habían aclarado el VPH el 54% de las pacientes previamente positivas con VPH de alto riesgo, a los 6 meses el 86% y así hasta que a los 24 meses de seguimiento el 99% de las mujeres eran VPH negativas. Lo mismo encontraron Aerssens et al (153), aunque con una tasa final de aclaramiento a los 24 meses algo menor, del 92%.

3. Factores relacionados con la infección persistente post-tratamiento por VPH-AR

Se han analizado diversos factores que podrían estar relacionados con la persistencia del virus después del tratamiento. Entre ellos se encuentra el estado de los márgenes del cono, la edad, la paridad y el tipo de VPH.

- Nuevamente la afectación de los *márgenes* es controvertida en el sentido de si influye ó no a la hora de aclarar el virus después del tratamiento. Park et al (68) y Kucera et al (150) no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes con márgenes libres ó afectos. Sin embargo, Bodner et al (111) y Gallwas et al (118) describen en sus estudios que la erradicación del virus fue significativamente menor si los márgenes eran positivos.
- La *edad* y la *paridad* no fueron significativas para Kim et al (63) ni para Park et al (68), aunque Sarian et al (120), en su análisis

multivariante, encontraron que el *tabaco* y una edad mayor de 35 años estaban fuertemente asociados con la persistencia del VPH durante el seguimiento, independientemente del estado de los márgenes. Sin embargo, este mismo autor no encontró relación entre el aclaramiento viral y el consumo de anticonceptivos orales, una edad de inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años ni con la afectación glandular de la displasia.

Chao et al (107) también describe en su estudio que las pacientes en las que el VPH no se aclaró, eran significativamente mayores.

Costa et al (122) objetivaron en su análisis univariante que la edad, el tiempo de vida sexual activa y la afectación del margen endocervical eran fuertes predictores de la persistencia del VPH, pero al realizar el análisis multivariante ajustado por edad, únicamente la afectación del margen endocervical era un factor predictivo independiente.

- En cuanto al *tipo viral*, un reciente estudio de Moore et al (154) en el que se analizó el aclaramiento del VPH post-tratamiento en 1.207 mujeres, reflejaba que los tipos 16 y 18 aclaran más rápidamente, con una media de 6 meses para cada uno de ellos, que el resto de tipos de VPH.

Este hallazgo, aunque en un principio pueda parecer sorprendente, es acorde con otro estudio previo de Kreimer et al (155) en el que se afirmaba que los tipos de alto riesgo tenían a los 6 meses de seguimiento una tasa de aclaramiento mayor que los de bajo riesgo (82% vs 72% respectivamente, $p < 0.001$). Según el autor, el tropismo por el tejido vaginal que presentan los VPH-BR los aleja

frecuentemente de la zona de transformación, que es la región cervical extirpada mediante LEEP. Otra posible explicación que aporta kreimer, es que la persistencia sea en realidad una re-infección desde una fuente intrínseca, como es el cérvix restante tras la excisión, ó desde una fuente extrínseca, como es la pareja sexual masculina, ya que se ha visto que la infección natural por el VPH induce una respuesta inmune humoral muy débil, con títulos bajos de anticuerpos tipo-específicos pero de duración incierta que no protegen de una re-infección por el mismo tipo viral ú otros tipos relacionados (156;157).

En esta misma línea, Bollen et al (124) publicaron que las infecciones con VPH de los tipos 16, 18, 45 y 56, que ellos consideraron de alto riesgo, pasaban de un 46% antes del tratamiento a un 11% después del mismo; mientras que el grupo de VPH que ellos consideraban de riesgo intermedio (tipos 31, 33, 35, 51, 52 y 58) pasaron de un 43% a un 46% después del tratamiento. Los autores emplean argumentos similares a los de Kreimer para explicar estos hallazgos. En contraste con estas publicaciones, un estudio más antiguo y con una muestra mucho menor (n=36), reflejaba que la persistencia post-conización del tipo 16 es mayor que la de los tipos 6, 11, 18, 31 y 33 (83).

Dentro del grupo de los VPH de alto riesgo, se ha visto en varios estudios (83;103;142;158) que el tipo 16 es el más difícil de aclarar. Sin embargo, Fen et al (106) encontraron en su investigación que es el tipo 33 el que más tiende a persistir de entre los tipos 16, 18 y 33.

1.6 Citología y test de VPH en el seguimiento post-conización

El balance entre la sensibilidad y especificidad de la citología en un programa de cribado resulta aceptable para reducir el número de falsos positivos y de intervenciones innecesarias. Por el contrario, su tasa de falsos negativos limita su eficacia en el control de curación post-LEEP, presentando una sensibilidad poco satisfactoria que oscila entre el 20 y el 100% en diferentes publicaciones (51;78;100;108;110;119;121;149;159;160).

Estas mujeres son un grupo de alto riesgo para cáncer invasivo, ya han demostrado una susceptibilidad al VPH, asociada a otros posibles co-factores ya comentados, y, por tanto, la sensibilidad y el valor predictivo negativo (VPN) son más importantes que la especificidad y los falsos positivos ya que el objetivo es no perder ningún caso de una enfermedad potencialmente letal (71;110). Además, algún estudio sugiere que la citología incluso pierde sensibilidad tras el tratamiento ablativo debido a que su lectura resulta más difícil por el efecto de “cicatrización” (82;161) y además, la arquitectura cervical puede cambiar impidiendo una toma correcta de la muestra endocervical (162).

Esta limitación de la citología en el control post-conización explica el interés por encontrar herramientas adicionales como el test de VPH que, ya sea de forma aislada ó en combinación con la citología, pueda incrementar la sensibilidad y el VPN para detectar enfermedad recurrente.

Por este motivo numerosos estudios han investigado en los últimos años el potencial del test de detección del ADN-VPH en el seguimiento después de una conización por CIN 2-3. Se ha propuesto que este test puede detectar tempranamente una persistencia ó recidiva de la lesión. Si bien el

tratamiento tiene el objetivo de eliminar la displasia, y no de tratar la infección por el VPH, actualmente se ha reunido gran cantidad de evidencia que indica que el VPH-AR se negativiza en las lesiones extirpadas completamente, mientras que sigue presente si la displasia persiste o recurre (61-67;69-73;75;77;78;80;82;85;89-91;94;96;97;100-119;163)

Paraskevaidis et al (51) destaca en su revisión del año 2004 que la sensibilidad del test VPH en un programa de cribado para un diagnóstico primario de displasia parece ser similar a la que presenta a la hora de predecir fracasos del tratamiento ó recurrencias. Señala también, sin embargo, que la mayor parte de los 11 estudios analizados son relativamente pequeños, que el tiempo de seguimiento varía enormemente entre 3-6 semanas post-tratamiento (164) hasta 17 años (82) y que se debe ser cautos al interpretar los resultados ya que los valores predictivos positivo y negativo del test están influenciados por la tasa de recidivas observada en los diferentes estudios.

Algunos casos de persistencia/recurrencia pueden presentar un test VPH negativo y una citología alterada. Por tanto, la combinación de ambas pruebas, citología y test VPH, puede incrementar la seguridad en el manejo del seguimiento. Así, por ejemplo, Acladious et al (109) realizaron un estudio prospectivo multicéntrico de casos y controles en el que los casos fueron aquellas pacientes que desarrollaron una recurrencia a lo largo de los 2 primeros años post-tratamiento (definida como displasia confirmada mediante biopsia), y los controles fueron las mujeres que estuvieron libres de enfermedad durante ese mismo periodo. Este autor observó que el test VPH en la primera visita de seguimiento, a los 6 meses del LEEP, tenía una sensibilidad para detectar recurrencias muy similar a la de la citología, 47% y 46,5% respectivamente, pero había 11 casos con VPH positivo y citología normal, de forma que la sensibilidad combinada ascendía al 72%. Sin

embargo, destacan que el 17% de los casos en este estudio fueron doble test negativo, por tanto, aunque la citología y el VPH sean normales en el primer control, no debe interrumpirse el seguimiento. Proponen que aquellas pacientes con cualquiera de los 2 test positivos sean remitidas a colposcopia, y si ambas pruebas son negativas simplemente se repetirá la citología en un año.

Este aumento de la sensibilidad combinada respecto a la del test VPH ó citología por separado, también la han observado otros autores. Así, Alonso et al (70) describen en su estudio prospectivo (n=203) que la sensibilidad de la primera citología post-tratamiento fue del 83,3%, la de citologías repetidas a lo largo del seguimiento del 94,4% y la del test VPH-AR del 97,2%. El valor predictivo negativo (VPN) fue 96,3%, 98,6% y 99,3% respectivamente. La determinación combinada de VPH-AR junto a una citología en la primera visita de control aportaba una sensibilidad y VPN del 100% para detectar recurrencias, definidas como CIN de cualquier grado en biopsia.

También Zielinski et al (149) publican una sensibilidad del 83% y un VPN del 99% tanto para la citología como para el test VPH por separado, ascendiendo a un 100% de sensibilidad y VPN cuando ambas pruebas se utilizan de forma conjunta ya sea a los 3 ó a los 6 meses del tratamiento. Este es uno de los pocos estudios que comparan la probabilidad de presentar una HSIL/CIN 2-3 en las pacientes en seguimiento post-conización con las de un grupo control, considerando como tal a una población de cribado con citologías normales (165). De las 77 mujeres tratadas que fueron doble test negativo, ninguna desarrolló una recurrencia, por lo que el autor indica que en estas pacientes de muy bajo riesgo de recidiva se puede suprimir alguna visita de seguimiento ya que tienen la misma probabilidad de presentar una

HSIL/CIN 2-3 que el grupo control. Sin embargo, aquellas que tengan la citología ó el test VPH positivo deben continuar con las revisiones a los 6, 12 y 24 meses y sólo devolverlas al cribado habitual cuando se negativicen ambas pruebas.

En una reciente revisión de la literatura (162), se analizaron en un principio 20 estudios: 8 empleaban la técnica de HC-II para la detección del ADN-VPH, 1 estudio utilizaba la HC-I y 11 la PCR. Estos últimos no se pudieron incluir finalmente en el análisis debido a su gran heterogeneidad en diseño, tamaño muestral y número de tipos virales estudiados. Con el resto de publicaciones, se calcularon una sensibilidad y especificidad globales para el test VPH como predictor de enfermedad residual ó recurrencia, del 90,7% y 74,6% respectivamente. Los 4 estudios que incluían datos de la citología en el seguimiento consideraban persistencia/recurrencia a un resultado citológico de ASCUS ó mayor (70-72;120). Al analizar estos 4 estudios en conjunto, la sensibilidad y especificidad globales estimadas para la citología fueron 76,6% y 89,7% respectivamente, mientras que para el doble test (citología combinada con HC-II) fueron 93,1% y 75,7%. Los autores deducen por tanto, que de una cohorte teórica de 1000 mujeres conizadas, el 6,6% tendrán una recurrencia histológica de CIN 2-3 (tasa calculada de forma global) y al añadir a la citología el test VPH, se detectarán 9 recurrencias más que si el seguimiento fuese únicamente citológico, ya que ante la positividad en cualquiera de las 2 pruebas, se remite a la paciente a colposcopia. Este aumento de la sensibilidad combinada es a costa de un descenso en la especificidad, ya que para captar esas 9 recurrencias adicionales, es necesario remitir a 297 mujeres a una unidad especializada, es decir, casi el doble que con el seguimiento citológico aislado (162). Esto supone un aumento considerable en el consumo de recursos sanitarios y en la ansiedad y molestias

innecesarias a las pacientes que, según algunos autores, debe tenerse en cuenta (166;167); sin embargo, como ya se ha comentado, parece prudente ofrecer un test con alta sensibilidad en un colectivo como éste.

Kocken et al (119), en su meta-análisis del año 2012, publican una sensibilidad combinada del 95%, mayor que la de cualquier prueba por separado, y recomiendan el doble test en el seguimiento.

Por otro lado, algunos autores publican una sensibilidad excelente del test VPH en la primera visita de seguimiento, sin observar un aumento sustancial de dicha sensibilidad al añadirle la citología (78;168).

Kitchener et al (117) llevaron a cabo en Reino Unido un estudio prospectivo con 917 mujeres controladas a los 6, 12 y 24 meses del tratamiento. Destacan que el valor añadido de la citología es dudoso porque de las 39 pacientes con citología alterada y test VPH negativo, sólo 2 tuvieron recurrencia CIN 2-3 en 24 meses, y es muy improbable que estos casos no se hubiesen detectado con la citología de *screening*.

También en el estudio retrospectivo alemán de Gallwas et al (118) se encontraron una sensibilidad y un VPN muy elevados y similares tanto para la citología como para el test VPH por separado (sensibilidad del 91% y 93% respectivamente; VPN del 98% y 99% respectivamente). Aunque estos autores no calcularon la sensibilidad ni el VPN del test combinado, concluyen, basándose en otros estudios (160), que dichos parámetros sí aumentan al emplear conjuntamente la citología y el test VPH.

En un reciente estudio belga (97), los autores señalan que la detección de VPH-AR a los 6 meses post-tratamiento es más sensible, pero menos específica que la citología para predecir recurrencias en los primeros 2 años

de seguimiento. Especifican, además, que la práctica de un tipaje viral presenta la misma sensibilidad que la simple detección de VPH-AR, pero con mayor especificidad, es decir, sería la técnica más eficiente en este sentido, ya que de esta forma se diferenciarían las auténticas recurrencias por una infección persistente, de los casos CIN incidentes debidos a otros tipos virales distintos de los presentes pre-conización.

No obstante, también se han publicado unos pocos artículos que contradicen lo expuesto por todos los anteriores, ya que consideran que el valor del test VPH es limitado para detectar recurrencias o para diseñar un seguimiento a largo plazo. Así, por ejemplo, Strander et al (169) realizaron en Suecia un gran estudio de casos y controles, en el que los casos fueron pacientes que presentaron una recurrencia histológica CIN 2-3 más allá de los 2 primeros años post-tratamiento y los controles fueron mujeres sin recurrencia (189 casos y 378 controles); eliminando así la enfermedad residual por tratamiento incompleto, que es la que suele aparecer en esos 2 primeros años. Cada paciente debía tener al menos 2 test VPH realizados entre los 3 y los 24 meses post-conización. El tiempo medio de seguimiento fue de 14 años y 7 meses. Los autores observaron que únicamente el 4,4% de los casos presentaban persistencia de la infección por VPH, es decir, el mismo tipo viral en ambas muestras; sin embargo, este porcentaje fue significativamente mayor que en los controles. Por otro lado, el 76% de las recurrencias ocurrieron en mujeres con ambos test VPH negativos. La adquisición de un nuevo tipo viral ó reinfección, es decir, el primer test VPH negativo y el segundo positivo, también fue significativamente mayor en los casos que en los controles. Estos hallazgos apoyan la idea de que la mayoría de las recurrencias a largo plazo ocurren por nuevas infecciones por VPH-AR en un momento posterior, y que las condiciones del huésped que permitieron

en un principio la persistencia del virus y el desarrollo de la displasia, perduran y condicionan que aparezca una recidiva. Concluyen que probablemente por este motivo, la protección relativa de un test VPH negativo es muy limitada al evaluar los efectos a largo plazo, y, además, esta protección es mayor si el test se realiza a los 12 meses post-tratamiento en vez de a los 6 meses. Por otro lado, critican que otros estudios prospectivos en los que se publica un altísimo valor predictivo negativo del test VPH son pequeños, con un periodo de seguimiento corto y un número mínimo de recurrencias (78;149;170). Otra publicación ya comentada de este mismo equipo sueco, destaca la importancia del seguimiento a largo plazo, incluso durante 25 años, con citología y posiblemente con test VPH, dado que el riesgo de recurrencia y cáncer invasivo persiste (56).

En esta misma línea crítica, se encuentra el estudio americano de Aschkenazi-Steinberg et al (171) en el que se analizó retrospectivamente el seguimiento de 61 mujeres conizadas. En 120 visitas de estas pacientes, se realizó simultáneamente el test de VPH y la citología. Considerando una citología positiva a aquella con un resultado de ASCUS ó mayor, se comprobó que ambas pruebas por separado eran igualmente efectivas para detectar recurrencias siguiendo las recomendaciones de la ASCCP del año 2001 (172). Efectivamente, empleando la citología de forma aislada, 40 mujeres habrían requerido colposcopia según este protocolo, frente a 31 mujeres que la habrían requerido utilizando únicamente el test VPH (no diferencias estadísticamente significativas). Sin embargo, el empleo de ambas pruebas combinadas, incrementaba significativamente el número de pacientes derivadas a colposcopia sin aumentar las recidivas detectadas. Por otro lado, destaca la escasa correlación que se observó entre las mujeres con citologías positivas y aquellas que presentaban el test VPH positivo (índice

Kappa=0.34) y que no hubo diferencias significativas en la especificidad de ambas pruebas por separado (68,3% la citología y 75,8% el test VPH), ni en el VPP (6,5% y 7,5% respectivamente) ni en el VPN (100% y 98,9% respectivamente). Los autores no especifican su tasa de recidivas comprobadas mediante colposcopia y biopsia, pero refieren que es muy baja y por tanto no se pudo calcular la sensibilidad de la citología y el test VPH de forma precisa. Por este mismo motivo, explican que el VPP sea tan bajo y el VPN tan alto ya que ambos están relacionados con la prevalencia de la enfermedad que se quiere detectar, y cualquier prueba de *screening* en pacientes tratadas se espera que tenga un VPP muy bajo y un alto VPN dada la baja tasa de recurrencias post-conización. También critican que algunas publicaciones que destacan el papel del VPH en el seguimiento de estas pacientes, son simplemente pequeños estudios piloto (84;151;159) y que la mayoría de los autores emplean la técnica de la PCR para la detección del VPH, pero en la práctica diaria la mayoría de los clínicos utilizan la HC-II que no distingue entre diferentes tipos virales por lo que la persistencia del VPH es difícil de constatar. Los autores concluyen que su propio estudio también es pequeño y que sería necesario repetirlo con una muestra mucho mayor para encontrar una pequeña diferencia entre la citología y el test VPH que pudiese ser clínicamente relevante.

1.7 Situación actual en el seguimiento post-conización por CIN 2-3

Todos estos estudios son profundamente heterogéneos en cuanto a diseño, características de la muestra, modalidades de tratamiento, técnica de detección de ADN-VPH y los intervalos y la duración del seguimiento; por tanto, resulta difícil extraer conclusiones definitivas.

Reflejo de este estado de confusión, es la inexistencia de un protocolo común, universal para el seguimiento de estas pacientes. En España, el documento de consenso actual de la SEGO es del año 2006 y establece que el primer control debe realizarse en la unidad especializada donde se practicó el tratamiento, a los 3 meses de la conización si los márgenes de la pieza están afectados, y a los 6 meses si están libres. En este primer control ha de realizarse citología, test de detección de ADN-VPH y colposcopia; si los márgenes están afectados ó la colposcopia no es valorable, se estudiará además el endocervix (legrado endocervical ó cepillado). Si los resultados de todas estas pruebas son normales, se realizará una citología anual durante 2 años y si ambas son negativas, se devolverá a la mujer al programa de cribado habitual. Si el test VPH es positivo y el resto del estudio negativo, deberá realizarse un doble test (citología y test VPH) a los 6 meses. Si el doble test es negativo, se devuelve a la paciente al cribado y si cualquiera de los 2 es positivo (citología ó test VPH), se realizará una colposcopia (141).

En Estados Unidos, la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) en coordinación con otras sociedades como el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) y la International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy, actualizaron en el año 2006 su antigua guía de consenso del año 2001 (172) a la vista de los resultados de las nuevas investigaciones (6). Esta guía destaca que ninguno de los protocolos propuestos en los diversos estudios publicados, ha sido evaluado en ensayos clínicos aleatorizados y resulta difícil compararlos al ser tan diferentes unos de otros. Ellos consideran aceptables 2 opciones: un test de ADN-VPH-AR a los 6 y 12 meses post-tratamiento ó bien citología sola ó combinada con colposcopia a los 6 y 12 meses. Si el test VPH es negativo ó si

2 citologías consecutivas son negativas, se devuelve a la mujer al *cribado de rutina* durante al menos 20 años, a los 12 meses de la conización. El término *cribado de rutina* no quedaba especificado en el documento de la ASCCP, pero recientemente la ACOG ha sugerido una citología anual en estas pacientes (173). Si el test VPH es positivo ó el resultado citológico es ASCUS ó superior, se recomienda colposcopia y estudio endocervical. Si los márgenes del cono están afectados ó el estudio endocervical realizado inmediatamente tras la conización es positivo, debe realizarse a los 4-6 meses otra citología y nuevo estudio endocervical. En este último caso, también se acepta una re-conización.

En Reino Unido, aún no han incorporado el test VPH-AR en sus programas de seguimiento y recomiendan citología a los 6 y 12 meses del tratamiento seguido de citología anual durante al menos otros 9 años (174).

Sin embargo, en Países Bajos, si las citologías realizadas a los 6,12 y 24 meses de la conización son negativas, se devuelve a la paciente al cribado habitual que consiste en citología cada 5 años. Si, por el contrario, alguna de esas primeras citologías es positiva, recomiendan continuar con citología anual hasta que 3 consecutivas sean negativas antes de volver al cribado de rutina (94).

Dado este creciente interés por la utilidad del test del VPH en el control post-conización, y ante las discrepancias existentes entre diversos estudios, nos propusimos analizar nuestros resultados en el seguimiento de estas pacientes en la Unidad de Patología Cervical del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

2.OBJETIVOS

El tratamiento conservador estándar de las displasias cervicales de alto grado es una conización. Sin embargo, entre el 1,5-48% de estas pacientes van a presentar enfermedad residual o recurrente y el principal objetivo del clínico es detectar precozmente estas recidivas. La afectación de los márgenes en la pieza de la conización se ha considerado clásicamente como un factor de riesgo de recurrencia aunque es inexacto. La citología para el seguimiento de estas pacientes tiene algunas limitaciones por lo que el test VPH se ha propuesto últimamente como otra herramienta útil en este contexto.

Con este estudio nos propusimos analizar los resultados del seguimiento post-conización por HSIL/CIN 2-3 en la Unidad de Patología Cervical del Hospital Universitario Central de Asturias.

Dividimos el estudio en 2 análisis:

- Análisis retrospectivo de la mujeres conizadas entre los años 1995 y 2009, en el que se recogieron los datos de sus historias clínicas archivadas.
- Análisis prospectivo de las mujeres que se sometieron a una conización a lo largo del año 2010, en las que se realizó una consulta de seguimiento post-tratamiento cada 6 meses.

En este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Conocer la tasa de recidivas después de una conización por displasia cervical de alto grado y el tiempo medio de aparición de dichas recidivas

2. Analizar la influencia de una serie de variables epidemiológicas en las tasa de recidivas (edad, estado menopáusico, paridad, edad de inicio de las relaciones sexuales, método anticonceptivo,...)
3. Conocer la proporción de piezas de conización con márgenes afectos y la posible influencia de esta afectación en la tasa de recidivas.
4. Conocer la proporción de piezas de conización con afectación endocervical y su relación con la tasa de recidivas
5. Estudiar la prevalencia de la infección por el VPH antes de la conización, así como la distribución de los tipos virales más frecuentes.
6. Estudiar el porcentaje de aclaramiento del VPH después de la conización relacionándolo, a su vez, con los diferentes genotipos virales.
7. Conocer el tiempo de aclaramiento viral y si existen diferencias en este aspecto entre los distintos tipos de VPH.
8. Conocer la proporción de mujeres que adquirieron una nueva infección por VPH después del tratamiento, los tipos virales presentes en dichas infecciones y su porcentaje de aclaramiento.
9. Calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la citología, del test VPH y del doble test (citología y test VPH) para predecir recidivas durante el seguimiento de estas pacientes.
10. Estudiar el grado de concordancia entre las citologías y los test VPH post-conización, así como la concordancia entre las citologías y la biopsias guiadas por colposcopia en las visitas de seguimiento.

11. Conocer la proporción de conos *sin displasia* en el estudio anatómo-patológico y si este hallazgo se relaciona con una ausencia de recidivas.
12. Estudiar la proporción de pacientes que fueron sometidas a una segunda-tercera conización o histerectomía por recidiva y analizar los resultados histológicos de las piezas, así como la existencia de posibles factores de riesgo para presentar dichas recidivas difíciles de erradicar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANÁLISIS RETROSPECTIVO

3.1.1 Población del estudio

El análisis retrospectivo se llevó a cabo mediante la revisión de las historias clínicas de las mujeres conizadas en la Unidad de Patología Cervical del HUCA entre los años 1995 y 2009. A lo largo de estos 15 años, 939 pacientes fueron sometidas a una o varias conizaciones debido a diferentes diagnósticos. Se incluyeron en el estudio todas aquellas mujeres conizadas por presentar HSIL/CIN 2-3 en biopsia guiada por colposcopia o en citología, y también aquellas pacientes con LSIL/CIN 1 persistente en citología o biopsia en las que se objetivó CIN 2-3 en la pieza quirúrgica. Sin embargo, no se incluyeron 339 mujeres conizadas por LSIL/CIN 1 en las que el análisis microscópico del cono confirmó CIN 1 y no CIN 2-3.

Por otro lado, de las 600 historias restantes, se excluyeron 201 en las que o bien no estaba disponible el test de VPH previo a la conización o bien no se le había practicado ninguno post-conización o ambas cosas junto con la ausencia de múltiples datos epidemiológicos. Sin embargo, no se excluyeron 33 historias en las que no estaban disponibles ciertos test VPH, pero el resto de datos epidemiológicos o de seguimiento estaban recogidos de forma exhaustiva y nos serían útiles para algunos de los análisis del estudio (17 sin test VPH pre-tratamiento, 12 sin test VPH post-tratamiento y 4 sin ninguno de ellos).

También se excluyeron 9 pacientes que no acudieron nunca más a la consulta después del tratamiento, y otras 4 que únicamente realizaron una visita post-conización en la que no se practicó test de VPH, solo citología. Por último, tampoco se incluyeron en el estudio a 14 mujeres que fueron

histerectomizadas inmediatamente tras la conización por hallazgo de CIN 2-3 extenso o multifocal, o sospecha de microinvasión.

En resumen, el tamaño muestral del análisis retrospectivo de este estudio fue de 372 pacientes (n=372), figura 1.

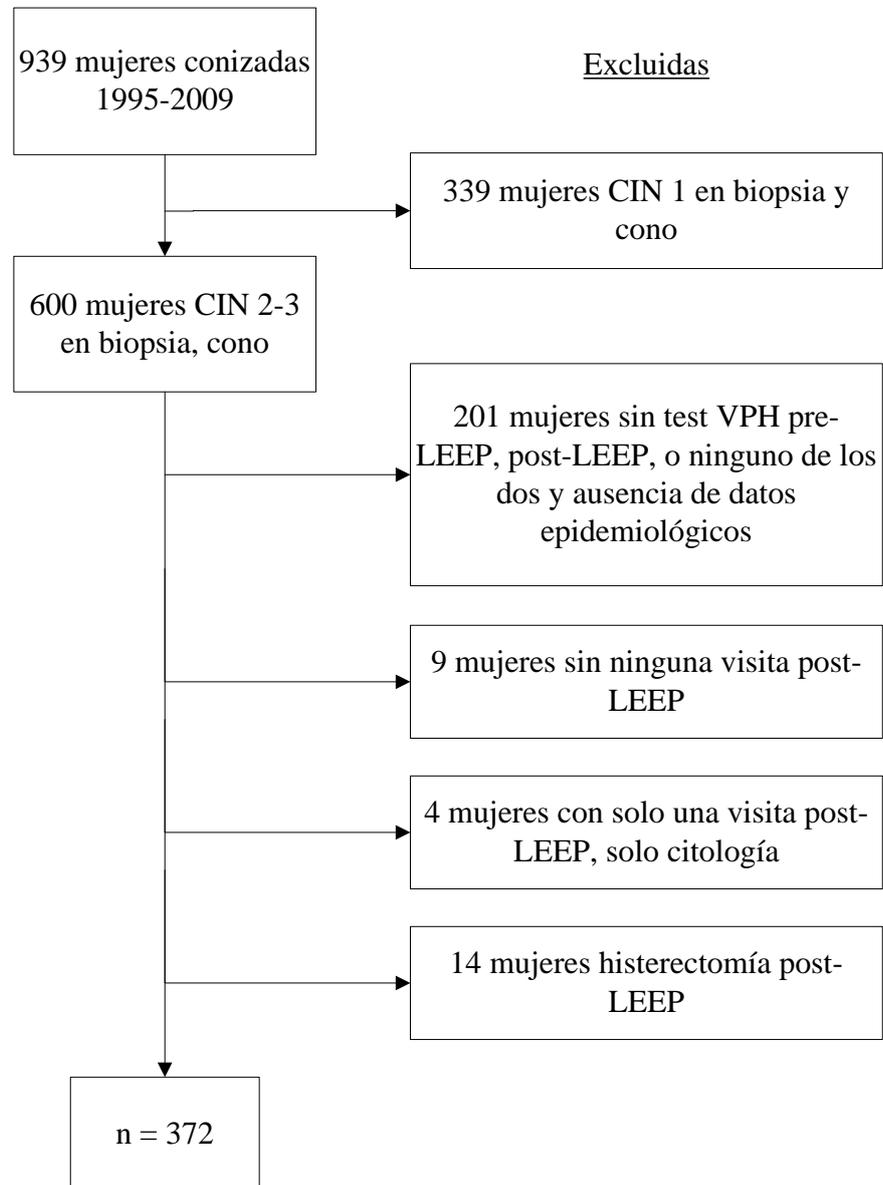


Figura 1. Tamaño muestral del análisis retrospectivo

3.1.2 Variables analizadas

Mediante la revisión de las historias clínicas, para lo cual no se precisa consentimiento informado de las pacientes, se recogieron todos los datos epidemiológicos disponibles:

- Edad en el momento de la conización
- Estado menopáusico
- Paridad (número de partos vaginales, abortos, cesáreas)
- Hábito tabáquico (ninguno, menos o más de 20 cigarrillos al día)
- Enfermedades sistémicas asociadas o estado de inmunosupresión
- Antecedentes de otras enfermedades de transmisión sexual
- Edad de inicio de las relaciones sexuales
- Método anticonceptivo utilizado hasta el diagnóstico

En cuanto a los datos clínicos, se recogieron:

- Test VPH previo a la conización, con su tipaje en caso de ser positivo
- Citología y biopsia guiada por colposcopia previas a la conización
- El resultado anatomo-patológico de la pieza, junto con el estado de los márgenes y la posible afectación endocervical.
- Todas las citologías, biopsias y test VPH posteriores a la conización, con sus fechas y tipaje viral en caso de ser positivo.
- Los resultados de sucesivas conizaciones o histerectomía en caso de recidiva.

3.1.3 Conizaciones

Las conizaciones fueron realizadas de forma ambulatoria en la consulta de la Unidad de Patología Cervical por 3 ginecólogos especializados, previa firma del consentimiento informado.

Tras visualizar el cérvix con un espéculo adaptado que permite la aspiración de humos, se aplica una solución de lugol para delimitar el área de la lesión a extirpar y se inyectan 0,9 ml de lidocaína 2% en cada cuadrante como anestésico local.

A continuación, se practica la conización mediante asa de diatermia de tamaño acorde al de la lesión y al del propio cuello uterino. Se utilizó un equipo Cooper Surgical LEEP System 1000® para electrocirugía empleando una energía de corte y coagulación de 50-52 W. Las técnicas empleadas fueron conización con asa triangular tipo Apple® comenzando el corte a las 12 horarias, o bien la técnica del “sombrero de vaquero o de ala”, es decir, un primer pase amplio y poco profundo en el exocervix con un asa circular tipo Electrode® grande (generalmente de 2x0,8 cm) y un segundo pase con un asa más pequeña (generalmente de 1x1 cm) por el endocervix, más profundo pero sólo alrededor del canal. En este último caso, se marcan las 12 horarias y el canal con tinta china.

Finalizada la resección, se coagula el lecho cervical con electrodo de esfera metálica de 0,5 cm con una energía de electrocauterización de 60-62 W, se deposita un material hemostático tipo AstrinGyn® (subsulfato férrico) o Surgicel® y la pieza se envía en formol al Servicio de Anatomía Patológica.

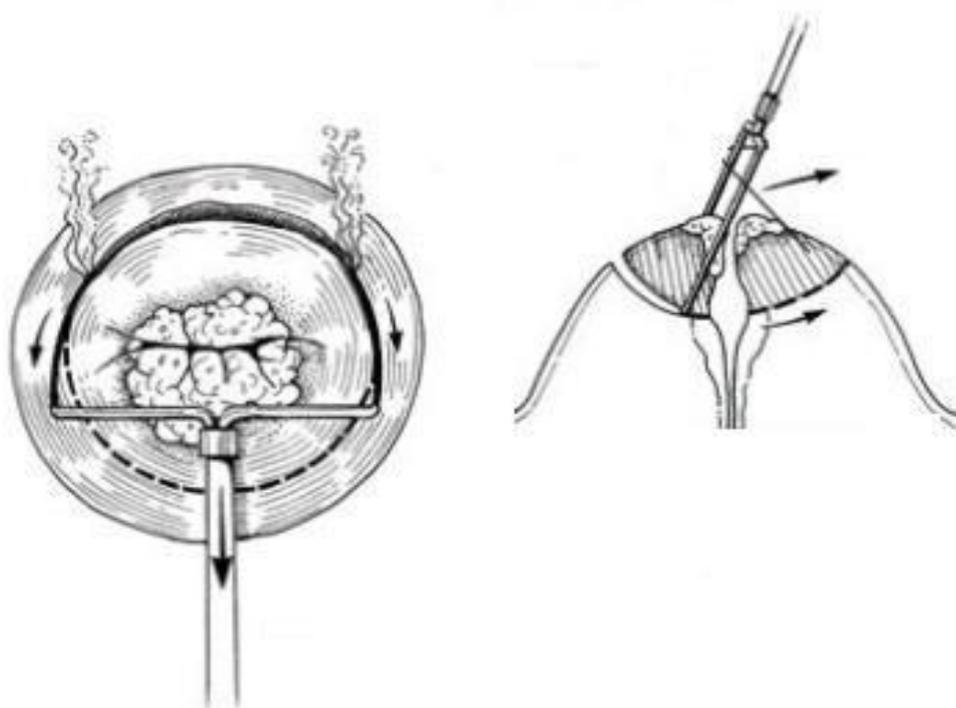


Figura 2. Esquema de conización con asa circular.

3.1.4 Citologías

1. Recogida de las muestras

Tras la exposición del cérvix mediante un espéculo, se realiza una toma de células exocervicales utilizando una espátula de Ayre y otra toma de células endocervicales con ayuda del *citobrush*. Se extienden ambas tomas, una junto a otra, sobre un portaobjetos que se introduce en alcohol 96° para su fijación (frotis convencional, no citología líquida) y posteriormente se envía a la Sección de Citologías del Servicio de Anatomía Patológica.

2. Procesamiento de las muestras en el laboratorio

Tras la recepción y la identificación de las muestras en el laboratorio, se procede a la tinción de los frotis con el método de Papanicolaou, el montaje con una resina sintética (Entellan®) y la revisión de las láminas al microscopio tras la colocación de un cubreobjetos.

La tinción de Papanicolaou es un método de tinción policromado que comprende una tinción nuclear (hematoxilina) y dos contra-tinciones (Naranja G y tinte EA-50). Se requiere la hidratación del frotis una vez fijado en alcohol para que las células tomen la hematoxilina mientras que la deshidratación prepara al frotis para la contra-tinción. Desde el año 2005 se emplea en el laboratorio de citologías del HUCA un teñidor automático que realiza todas las inmersiones en soluciones alcohólicas y tinciones que antiguamente se hacían de forma manual (anexo 2) .

La tinción resultante es como sigue:

- Núcleo -azul negro
- Citoplasma (no queratinizado) - azul y rojo pálido
- Células sanguíneas-verde
- Citoplasma (queratinizado) -rosa
- Eritrocitos-naranja

Los criterios citológicos para definir ASCUS, LSIL, HSIL y ASC-HSIL se pueden apreciar en el anexo 3 y ejemplos de distintas citologías (normal, LSIL y HSIL) en la figura 3.

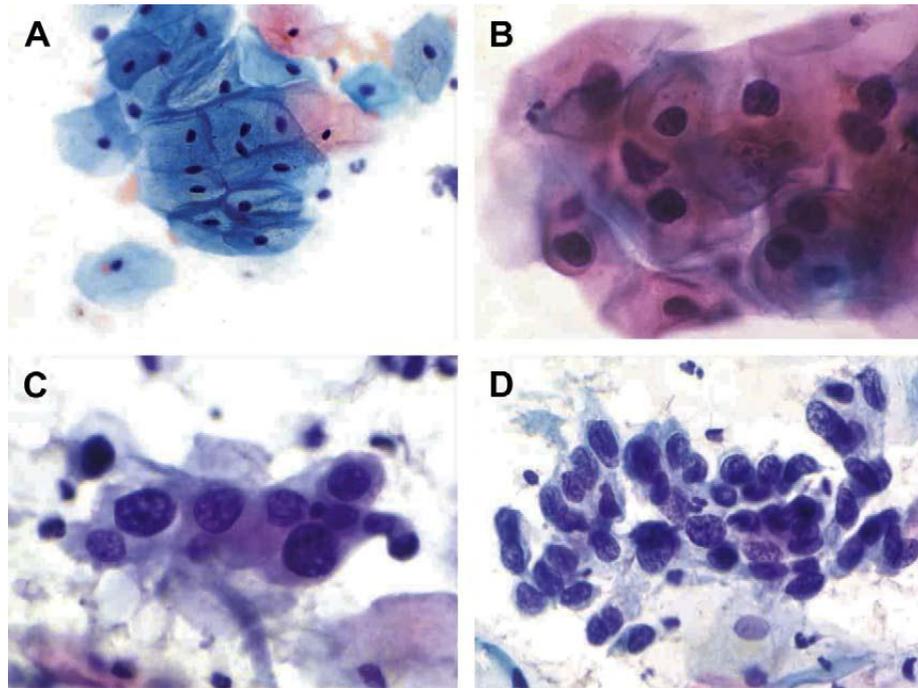


Figura 3. Citología de las células epidermoides en la prueba Papanicolaou. (A) Células epidermoides y endocervicales normales. (B) LSIL (C) HSIL (D) HSIL.

3.1.5 Biopsias

Tras la recepción de las muestras de biopsias incluidas en formol en el Servicio de Anatomía Patológica, en primer lugar se procede a la descripción macroscópica, el tallado y la introducción en los casetes. En las piezas de conización se realizan cortes seriados de 2-3 mm de espesor a través de todo el cono, paralelos y radiales al eje del canal endocervical, teniendo cuidado de que cada corte incluya epitelio, la unión escamo-columnar y el espesor completo de la pieza para poder valorar la afectación de los bordes.

Después del tallado, los casetes con los cortes de las muestras se introducen en un procesador automático en el que se someten sucesivamente a una fijación con formol y agua destilada para que el tejido conserve sus elementos constitutivos celulares, a una deshidratación con alcohol en concentraciones crecientes (80°, 95° y absoluto) que elimina completamente el fijador y el agua, a un aclaramiento con xilol que sustituye al alcohol por una sustancia miscible con el medio de inclusión y finalmente a una impregnación con parafina que disuelve el xilol y penetra en el tejido dándole la dureza necesaria para obtener cortes finos y de calidad.

Posteriormente, se confeccionan los bloques de parafina, se practican los cortes con el micrótopo y tras extender y montar el corte en una laminilla, se desparafina para poder teñir el tejido.

La tinción se realiza con hematoxilina-eosina, ya que es la mejor técnica para diferenciar las estructuras celulares y tisulares, y, por último, se adhiere un cubreobjetos de cristal antes de observar la muestra al microscopio.

Si existen dudas del grado de displasia, el anatómo-patólogo solicita, desde el año 2006, técnicas de inmuno-histoquímica como son el Ki-67 y la

p16 ya que la co-detección de estos dos biomarcadores en la misma célula es un indicador de desregulación del ciclo celular, lo que ocurre durante la transformación oncogénica inducida por VPH-AR, por lo que se identifican mujeres con mayor probabilidad de albergar una lesión de alto grado (figura 4)

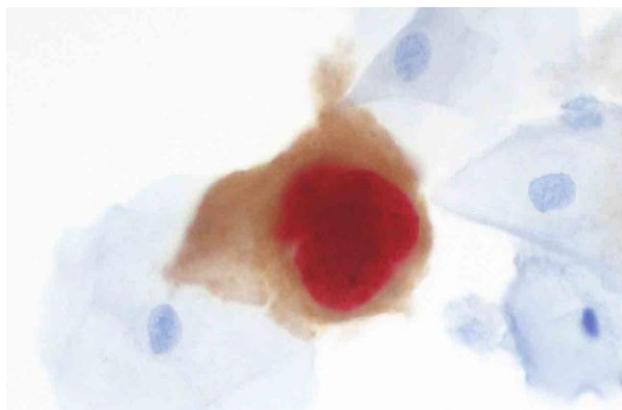
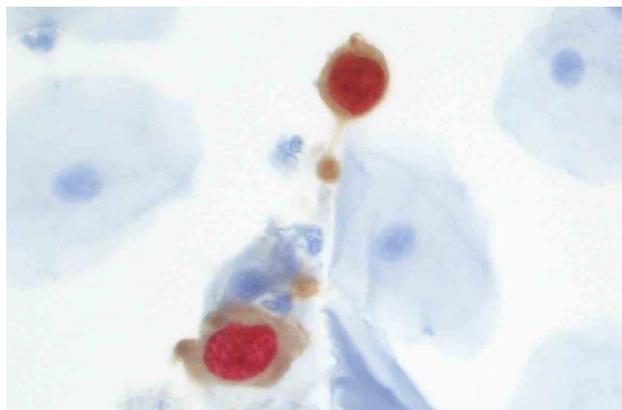


Figura 4. Tinción citoplasmática marrón indica sobreexpresión de p16 y la tinción nuclear roja indica sobreexpresión de Ki-67.

Si la existencia de microinfiltración es dudosa, es necesario resaltar la membrana basal mediante la técnica histoquímica PAS (ácido periódico-reactivo de Schiff) y las inmuno-histoquímicas que detectan colágeno IV y laminina-5, componentes importantes de dicha membrana.

En la figura 5 se aprecian imágenes de biopsias cervicales normales, con CIN 1, 2 y 3.

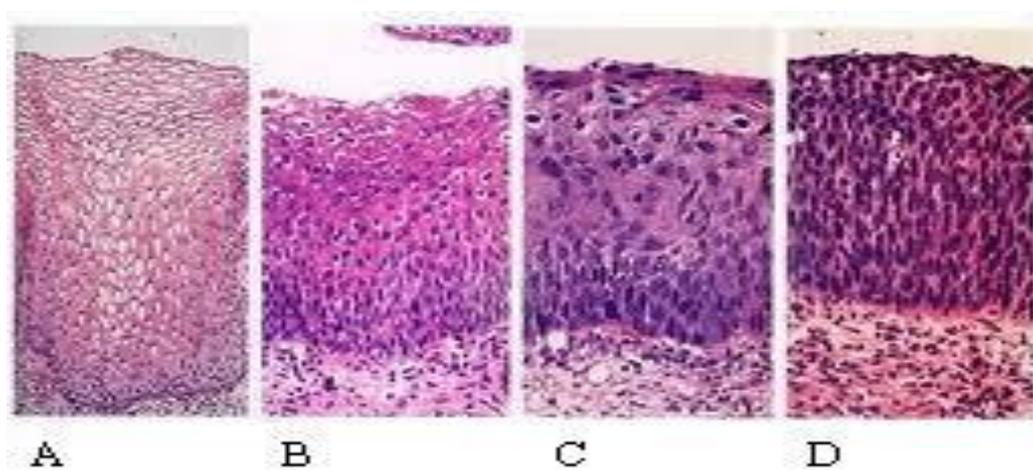


Figura 5. Biopsias cervicales. A) Normal B) CIN I C) CIN II D) CIN III

3.1.6 Detección genómica del VPH

Para la detección del VPH, se recoge una muestra de células endocervicales con un *citobrush*, el mismo utilizado para la toma citológica en caso de haberla realizado previamente, que posteriormente se introduce en un medio líquido con tampón tris-clorhídrico-EDTA y se envía a la sección de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Central de Asturias, donde se mantiene a 4° C hasta el momento de su procesamiento, en las 3 ó 4 horas siguientes.

El método de detección genómica que se aplicó fue la PCR o amplificación del genoma por medio de una polimerasa termoestable. Este método se llevó a cabo en tres fases: preparación o extracción genómica, amplificación genómica y revelado del producto de amplificación.

1. Extracción del material genético

Con la preparación de las muestras, se pretenden obtener altas concentraciones del ADN libre y eliminar inhibidores que pudiesen afectar a la reacción de amplificación posterior. Para ello, se llevó a cabo una extracción del genoma por medio de un método enzimático de la siguiente forma:

- La mitad de la muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos, desechándose el sobrenadante.
- Al sedimento se añadieron 200 µl de tampón de extracción de ADN con proteinasa-K a una concentración final de 0,1 µg/µl y se permitió que actuará durante 45 minutos a 56°C en agitación.

- Se inactivó la proteinasa-K por calentamiento a 96°C durante 10 minutos.
- Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

El resto de la muestra también se mantuvo a -20°C por si fuese necesario su uso en caso de inhibición de la reacción.

2. Técnica de amplificación por PCR

La PCR o amplificación genómica es un método enzimático que por medio de una polimerasa termoestable duplica de forma cíclica una secuencia específica de ADN de doble cadena, pudiéndose obtener millones de copias de esa región del genoma.

Cada ciclo consta de tres fases térmicas: desnaturalización, momento en el que se separan las dos hebras del ADN; acoplamiento, cuando se produce la unión de los cebadores; y polimerización, con síntesis de la hebra complementaria.

Para la detección del gen que codifica la cápside viral se utilizaron los cebadores MY11/MY09. En algunas ocasiones, para aclarar resultados inespecíficos con los cebadores MY11/MY09, se utilizaron los cebadores GP5+/6+ diseñados sobre una región conservada del gen L1, pero que sólo se aparean completamente en algunos tipos del VPH.

Los cebadores VPHONC-1/ VPHONC-2 amplifican un fragmento del gen E6-E7 de tipo oncogénico.

Con cada una de estas parejas de cebadores se procedió a realizar una mezcla de reacción de amplificación para cada una de las dianas buscadas.

3. Identificación del producto amplificado

En todos los casos, el producto final de la amplificación se puso de manifiesto mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se preparó una mezcla del producto amplificado con el tampón de carga, se transfirió al gel de agarosa sumergido en una cubeta de electroforesis con tampón TBE y se sometió a un campo eléctrico continuo durante 30-45 minutos. El producto de la PCR se monitorizó mediante transiluminación con luz ultravioleta. Se comparó el producto amplificado con un marcador de control de pesos moleculares. Se consideró positiva la reacción cuando se observaron las siguientes bandas:

- 450 pb fragmento gen L1 amplificado con la pareja de cebadores MY11/MY09,
- 150 pb fragmento del gen L1 amplificado con la pareja de cebadores GP5/GP6
- 250 pb gen E6-E7
- 100 pb para la beta globina

La figura 6 muestra una electroforesis en gel de agarosa.

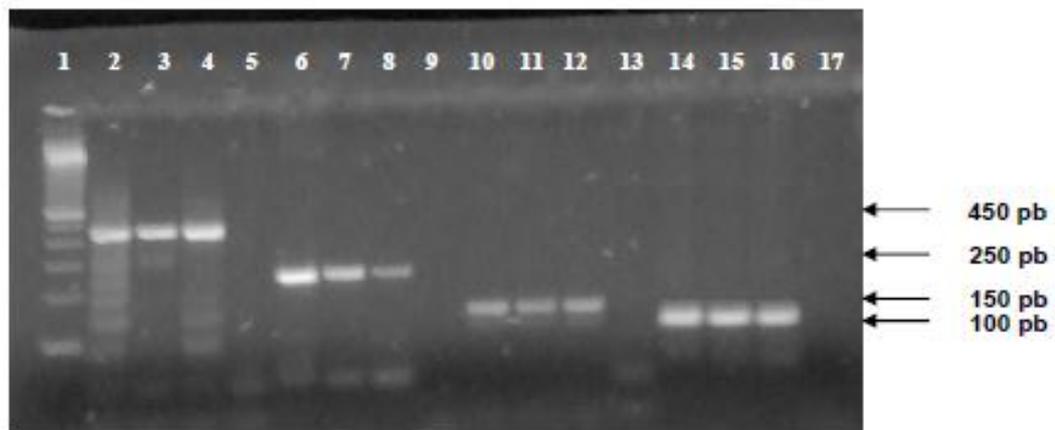


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa. La calle 1 del peine corresponde al control de pesos, las calles 2, 3, 4, muestran el fragmento correspondiente al gen L1 amplificado con MY11/MY09 a 450 pb, las calles 6, 7, 8 muestran fragmentos del gen E6/E7 a 250 pb; las calles 10, 11, 12 muestran el fragmento de 150 pb correspondiente gen L1 amplificado con GP5/GP6, las calles 14, 15 y 16 muestran fragmentos de 100pb correspondientes a la betaglobina y por último las calles 5, 9, 13 y 17 son los controles negativos.

4. Genotipado por hibridación con oligonucleótidos

Para llevar a cabo el genotipado del VPH, se llevaron a cabo dos formatos de hibridación diferentes inmovilizando los amplificadores en un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa): técnica *dot blot* (hibridación clásica) o técnica *spot blot* (modificación empleada en la actualidad).

Los productos amplificados, y positivos para el fragmento L1, se hibridaron con sondas específicas para los VPH de bajo riesgo 6, 11 y alto riesgo 16, 18, 33, marcadas con fósforo 32. A partir del año 2001 se añadieron sondas frente a los genotipos 31, 45 y 58.

Una vez hibridadas las sondas, se procedió a los lavados y por último se realizó el revelado como una placa de rayos obteniendo las imágenes de la figura 7.

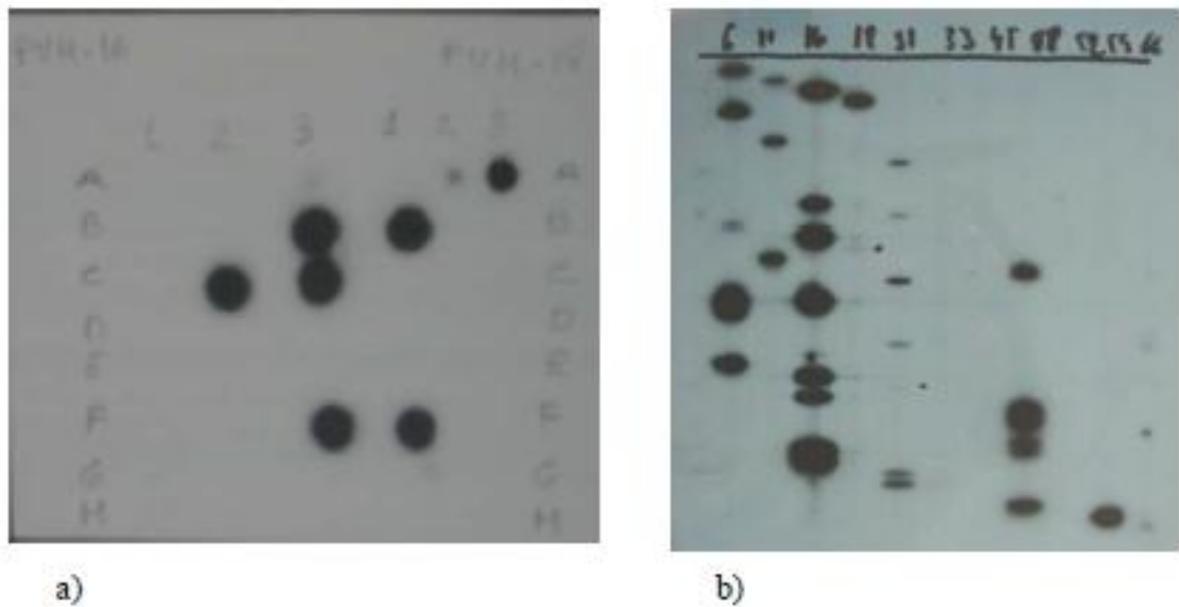


Figura 7. Representación de distintas técnicas de hibridación: a) Representación de una hibridación mediante el protocolo clásico y b) representación de una hibridación mediante el protocolo actual. Los puntos negros representan muestras positivas para VPH.

5. Genotipado por secuenciación

Entre los años 2002 y 2007 se comenzaron a aplicar protocolos de secuenciación para tipar todas aquellas muestras que no se caracterizaban con la hibridación.

Existen diferentes métodos de secuenciación genómica; unos utilizan los dideoxinucleótidos marcados y otros los cebadores marcados que son empleados para determinar la secuencia de bases, pero todas ellas tienen en común la generación de una nueva hebra de ADN que comienza en un punto específico, que viene determinado por el cebador y acaba con la incorporación a la cadena en síntesis de un terminador dideoxinucleótido trifosfato, obteniéndose así secuencias de distinta longitud que difieren en una sola base y que pueden ser separadas electroforéticamente por tamaños de menor a mayor al aplicar una corriente eléctrica.

3.1.7 Análisis de los datos y metodología estadística

Todos los cálculos estadísticos de este estudio se llevaron a cabo mediante el programa informático SPSS versión 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

La significancia estadística de la diferencia entre las proporciones se determinó usando el test exacto de Fisher para variables cualitativas en celdas de dos por dos.

Se utilizó el test del Chi al cuadrado cuando existían más de 2 categorías dentro de la variable a estudio.

El nivel de significación requerido en todos los casos fue de $p < 0.05$.

El índice Kappa (κ) se emplea para evaluar la concordancia entre pruebas o instrumentos de medida cuyo resultado es categórico. Es la razón entre el exceso de concordancia observado más allá del atribuible al azar y el máximo exceso de concordancia posible (considerando la máxima concordancia posible como $\kappa=1$ y el valor de $\kappa=0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera exclusivamente por el azar).

$$\kappa = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

P_0 = concordancia observada entre las 2 pruebas a evaluar (tanto por 1)

P_e = concordancia esperada debida al azar

Para interpretar el valor de κ se considera la siguiente escala:

Valor de κ	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21-0.40	Débil
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Buena
0.81-1	Muy buena

Tabla 1. Valor del índice kappa

3.2 ANÁLISIS PROSPECTIVO

3.2.1 Población del estudio y protocolo de seguimiento

Un total de 111 pacientes fueron sometidas a una conización por HSIL/CIN 2-3 a lo largo del año 2010 (entre el 2 de enero y el 30 de diciembre) en la Unidad de Patología Cervical del HUCA.

En 5 de ellas el seguimiento fue incompleto por diferentes motivos, como por ejemplo la vuelta a su país de origen, por lo que se excluyeron del estudio.

Tampoco se incluyeron en este análisis otras 4 mujeres a las que se les realizó una histerectomía inmediatamente después de la conización debido al hallazgo de cáncer infiltrante en el estudio anatómo-patológico del cono.

Por último, se excluyeron otras 5 pacientes en las que la citología inicial fue informada como HSIL, pero éste no se confirmó ni en la biopsia preoperatoria ni en la pieza de conización.

Por tanto, el tamaño muestral definitivo del análisis prospectivo fue de 97 pacientes (n=97), figura 8.

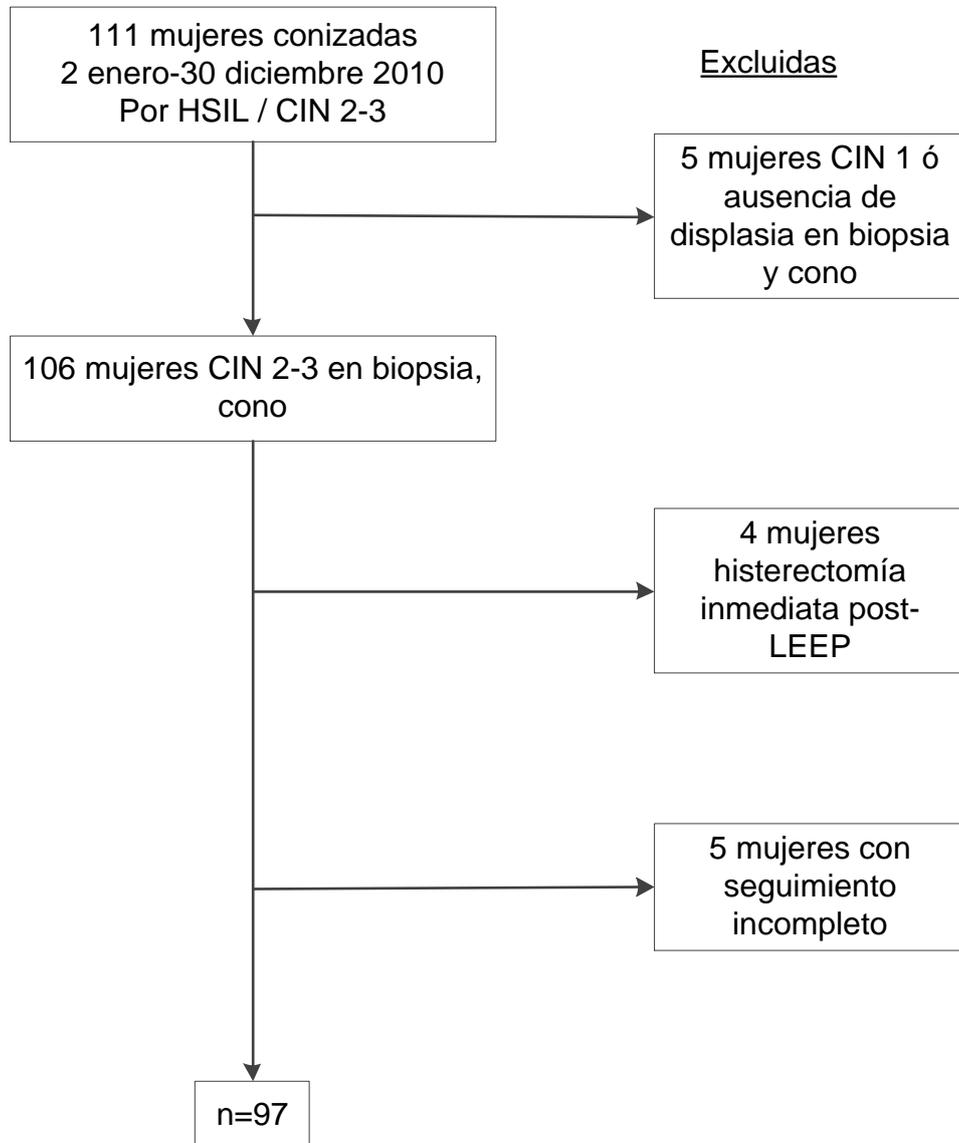


Figura 8. Tamaño muestral del análisis prospectivo

Las pacientes se citaron cada 6 meses para una visita de seguimiento en la que se practicó citología, test VPH, colposcopia y biopsia si era procedente.

Este análisis prospectivo concluyó en julio del 2012 por lo que el seguimiento mínimo fue de 19 meses con 3 visitas (a los 6,12 y 18 meses) en las pacientes conizadas en diciembre de 2010 y el seguimiento máximo fue de 30 meses con 5 visitas (6-12-18-24-30 meses) en aquellas mujeres conizadas en enero de 2010.

Todas las participantes en este análisis prospectivo firmaron un consentimiento informado (anexo 4) aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias (anexo 5).

3.2.2 Variables analizadas

Además de las visitas de seguimiento post-conización, se recogieron todas las variables epidemiológicas citadas previamente para el análisis retrospectivo (edad, paridad, estado menopáusico, edad de inicio de relaciones sexuales, anticoncepción...) así como los resultados del test VPH, la citología y la biopsia previas a la conización.

También se analizaron los resultados histológicos de los conos, junto con el estado de los márgenes y la posible afectación endocervical, así como el estudio anatómo-patológico de sucesivas conizaciones o histerectomías en el caso de recidivas.

3.2.3 Conizaciones, citologías, biopsias y test ADN-VPH

Las conizaciones se realizaron mediante la técnica del “sombrero de vaquero” empleando asas de diatermia circulares.

En 4 mujeres jóvenes sin deseo genésico cumplido, se realizó únicamente el pase por el exocérvix conservando el endocérvix con la idea de mantener al máximo su función reproductiva.

En otras 4 pacientes en las que la biopsia preoperatoria revelaba sospecha de cáncer infiltrante, se utilizaron asas triangulares grandes para una conización generosa. Estas 4 mujeres se excluyeron posteriormente del estudio por ser sometidas a una histerectomía inmediatamente tras la conización (figura 8).

El resto de aspectos técnicos de las conizaciones, citologías y biopsias así como la metodología estadística, son los mismos que los ya comentados para el análisis retrospectivo.

En cuanto a la determinación genómica del VPH, desde mayo de 2011 se empleó la técnica validada de Cobas 4800 (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany). Este sistema está compuesto por el automático cobas X, el termociclador cobas Z y el software necesario para la realización de una PCR a tiempo real con *primers* de la región L1 del VPH. Los resultados aparecen en pantalla diferenciados en cuatro canales: genotipo 16, genotipo 18, otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66) y beta-globina que se usa como control interno en cada muestra. Es una técnica totalmente automatizada y no presenta reactividad cruzada con otros genotipos(175).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS RETROSPECTIVO

Las 372 mujeres que fueron incluidas en este estudio tenían una media de edad de 35,64 años en el momento de la conización (rango 18-80,5 años).

4.1.1 Estudio anatomo-patológico previo a la conización

La comparativa entre la citología, la biopsia preoperatoria guiada por colposcopia y el resultado anatomo-patológico final de la pieza de conización se puede observar en la tabla 2.

Cabe destacar varias discordancias entre los resultados de estas pruebas, señaladas en la tabla mediante letra en negrita:

- Hubo 12 casos en los que, tras una citología HSIL, la biopsia preoperatoria venía informada como normal o condiloma. Los conos de estos casos confirmaban CIN 2-3, explicándose este hecho probablemente porque la lesión se encontrase en el canal endocervical y no en el exocérnix
- En 37 casos se practicó la conización ante una citología alterada (32 HSIL y 5 LSIL) sin realizar biopsia previa para confirmar el diagnóstico. La mayoría de estas pacientes eran mayores, con deseo genésico cumplido y en todas ellas el cono fue informado como CIN 2-3. Es llamativa la discordancia observada en esas 5 mujeres con citología inicial LSIL.

- Hubo 82 pacientes con citología LSIL en las que la biopsia preoperatoria y la pieza de conización confirmaron CIN 2-3. En otros 3 casos discordantes especialmente preocupantes, la citología se informó como LSIL y la biopsia preoperatoria fue normal, mientras que el cono revelaba CIN 2-3.
- De nuevo hubo discordancia entre citología-histología en 10 casos con citologías de significado incierto (6 ASCUS y 4 con cambios por VPH/células atípicas) en los que la biopsia y la pieza de conización reflejaron CIN 2-3.
Los 4 casos AGUS en citología se consideraron concordantes con el CIN 2-3 revelado histológicamente, ya que es más prudente considerar las anomalías de células glandulares de cualquier tipo como de alto grado.
- En 32 pacientes (8,6%) la citología fue falsamente negativa: en 18 de ellas la biopsia y el cono se informaron como CIN 2-3, mientras que en las otras 14 la biopsia reveló CIN 2-3 pero el cono fue normal. Esto último puede deberse a que la lesión fuese tan pequeña que se extirpase completamente con la pinza sacabocados de la biopsia preoperatoria.
- En otros 45 casos con citología alterada (5 ASCUS, 21 LSIL y 19 HSIL) y CIN 2-3 o AIS confirmado en la biopsia, no se encontró displasia en la pieza de la conización. Estos hallazgos pueden deberse, como ya se comentó en el punto anterior, a que la lesión, de dimensiones reducidas, hubiese sido extirpada completamente con la biopsia. Sin embargo, como veremos más adelante, estas pacientes no están exentas de riesgo de recidiva.

Citología	Biopsia preoperatoria	Pieza conización	Total (n=372)
HSIL	CIN 2-3	CIN 2-3	138
HSIL	CIN 2-3	AIS	1
HSIL	CIN 2-3	Microinvasión	3
HSIL	Normal	CIN 2-3	9
HSIL	Condiloma	CIN 2-3	3
HSIL	No practicada	CIN 2-3	32
Ca.escamoso infiltrante	Ca. Células grandes dudosa microinvasión	Microinvasión	1
LSIL	No practicada	CIN 2-3	5
LSIL	Normal	CIN 2-3	3
LSIL	CIN 2-3	CIN 2-3	82
LSIL	CIN 2-3 con microinvasión	CIN 2-3	1
AGUS	CIN 2-3	CIN 2-3	4
ASCUS	CIN 2-3	CIN 2-3	6
Cambios VPH / células atípicas	CIN 2-3	CIN 2-3	4
Normal	CIN 2-3	CIN 2-3	18
No practicada	CIN 2-3	CIN 2-3	3
HSIL	CIN 2-3	Normal	19
LSIL	CIN 2-3	Normal	20
LSIL	AIS	Normal	1
ASCUS	CIN 2-3	Normal	5
Normal	CIN 2-3	Normal	14

Tabla 2. Comparativa entre citología, biopsia preoperatoria y pieza conización. Análisis retrospectivo

4.1.2 Estudio viral previo a la conización

El test VPH previo a la conización estaba disponible en 351 mujeres de las 372 incluidas en el estudio.

Dicho test resultó negativo en 101 pacientes (28,77%) y positivo en 250 (71,23%). En 6 de estas 250 mujeres VPH-positivo, el tipo viral no estaba disponible.

Entre el resto de mujeres VPH-positivo pre-conización a las que se les había realizado el tipaje viral (n=244), se observó que el 16 era el tipo más frecuente, presentando una gran diferencia respecto al resto ya que aparecía en solitario en 126 mujeres y acompañado por otros tipos (infecciones mixtas) en 34 pacientes, es decir, estaba presente en el 64% del total (tabla 3).

A gran distancia del tipo 16, le seguían en frecuencia los tipos 33, presente en el 6,4% de las pacientes, y el 18 que se objetivó en el 5,6%.

Varias pacientes presentaban VPH no tipificables con las sondas utilizadas. Los VPH no tipificables que eran positivos para el gen oncogénico E6-E7 se consideraron *no tipificables de alto riesgo* y los negativos para dicho gen, *no tipificables de bajo riesgo*. En los casos en que el gen E6-E7 tampoco se pudo determinar, simplemente se denominaron *no tipificables*.

Tipo viral pre-conización	Número de pacientes (%)
16	126 (50,4 %)
16-18	18 (7,2 %)
33	16 (6,4 %)
18	14 (5,6 %)
Mixtas poco frecuentes (16-11, 16-31, 16-6,16-52-31,31-33-51, 16-18-31-33,16-18-31-33-51)	10 (4 %)
31	9 (3,6 %)
58	9 (3,6 %)
No tipificable	9 (3,6 %)
No tipificable alto riesgo	9 (3,6 %)
No tipificable bajo riesgo	9 (3,6 %)
Sin tipificar	6 (2,4 %)
16-33	4 (1,6 %)
16-58	4 (1,6 %)
11	2 (0,008 %)
45	2 (0,008 %)
6	1 (0,004 %)
66	1 (0,004 %)
73	1 (0,004 %)
Total	250

Tabla 3. Distribución de los tipos virales observados pre-conización. Análisis retrospectivo

4.1.3 Tiempo de seguimiento y pruebas realizadas durante el mismo

El **tiempo** medio de seguimiento post-conización fue de 66 meses, es decir, 5 años y medio (rango 4-181 meses, mediana de 57 meses) como puede apreciarse en la figura 9.

Fue un seguimiento largo, mayor de 2 años en el 76% de las pacientes del estudio.

Durante este tiempo de seguimiento, el promedio de **citologías** realizadas a cada paciente fue de 11,64 (rango 1-22, mediana de 5) ya que lo más habitual era realizar una citología en cada visita de control (figura 10).

Sin embargo, el promedio de **test VPH** realizados a cada paciente fue más bajo, de 2,6 (rango 0-19, mediana de 2) como se puede objetivar en la figura 11.

Este menor número de test VPH respecto al de citologías se debe a que en los primeros años de este estudio no era tan habitual como hoy en día el realizar un test VPH como control post-conización.

De todas formas, el 60,2% de las pacientes tenían 2 ó más test VPH disponibles durante su seguimiento.

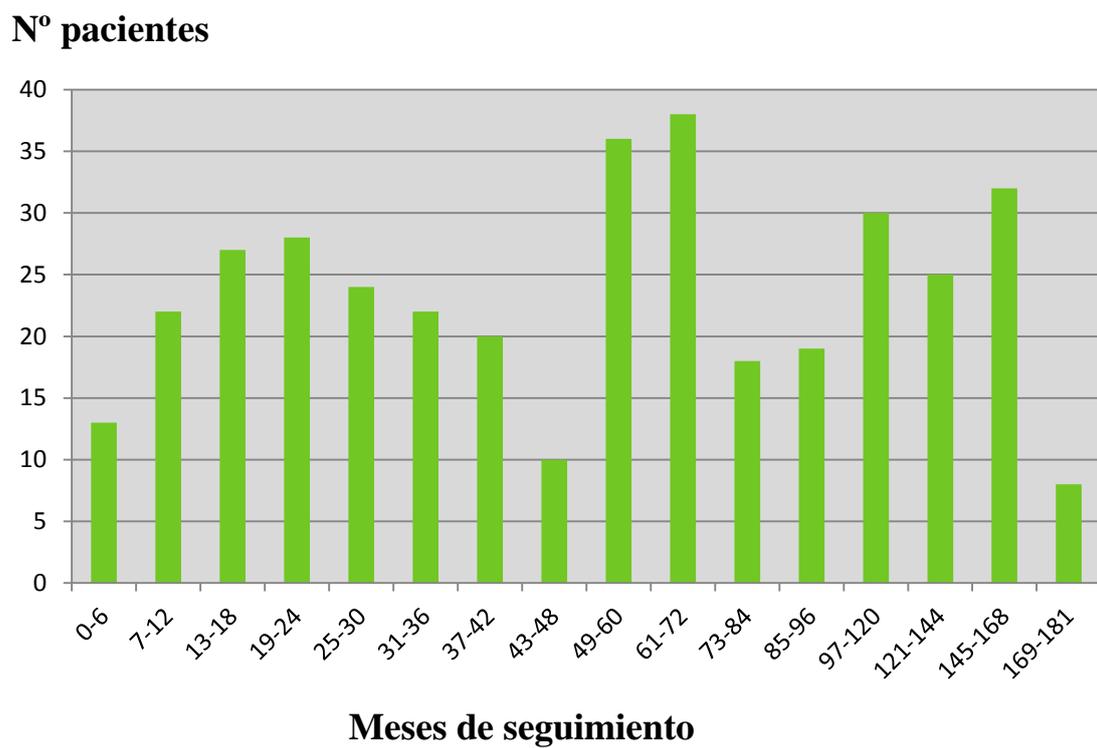


Figura 9. Meses de seguimiento post-conización. Análisis retrospectivo

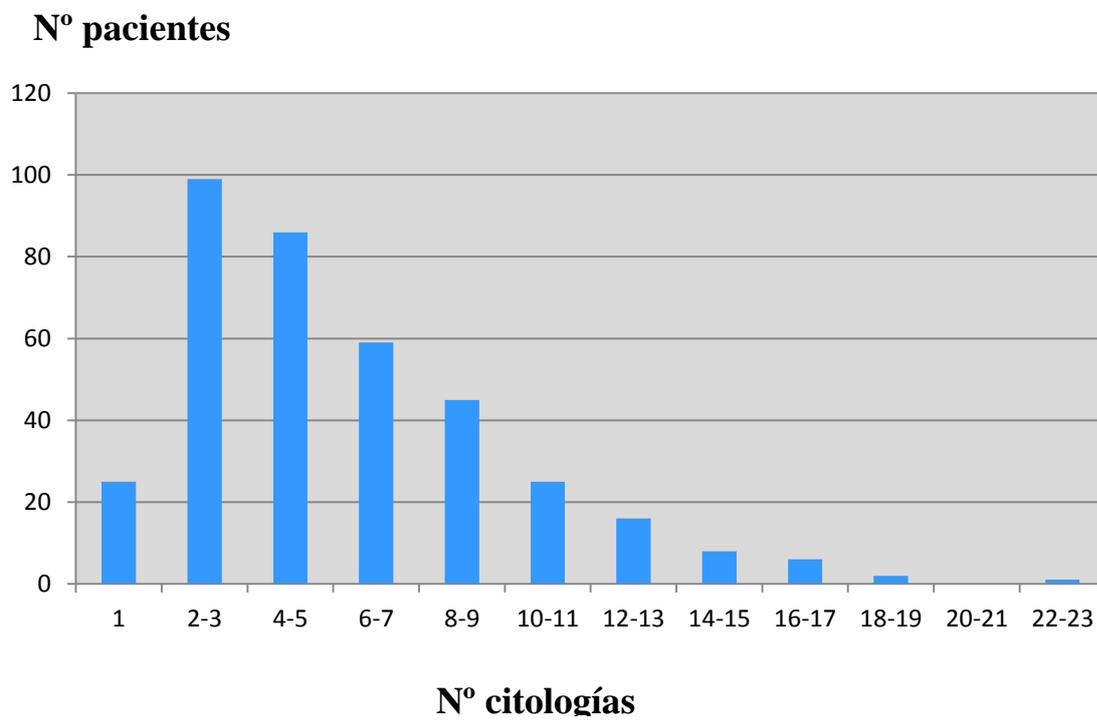


Figura 10. Citologías de seguimiento realizadas. Análisis retrospectivo

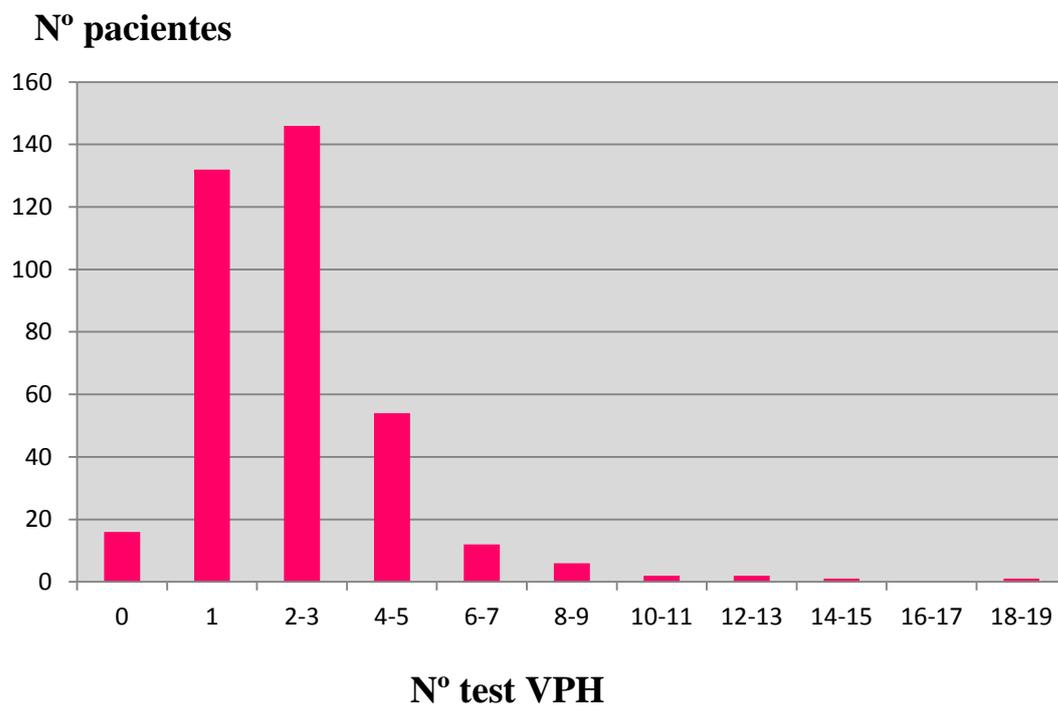


Figura 11. Test VPH de seguimiento realizados. Análisis retrospectivo

4.1.4 Tasa y tiempo de aparición de las recidivas

A lo largo de este tiempo de seguimiento se objetivaron 32 casos de recidivas, considerando como tales a las CIN 2-3 demostradas mediante biopsia, es decir, una tasa de recidivas del 8,6%.

La mayoría de las recidivas (68,75%) se detectaron durante el primer año de seguimiento, siendo el tiempo medio de aparición de 19 meses (rango 3-140 meses, mediana de 7 meses. Figura 12). Se consideró como el momento del diagnóstico de la recidiva a la fecha de la primera citología de seguimiento alterada (\geq ASCUS) que originó una biopsia guiada por colposcopia.

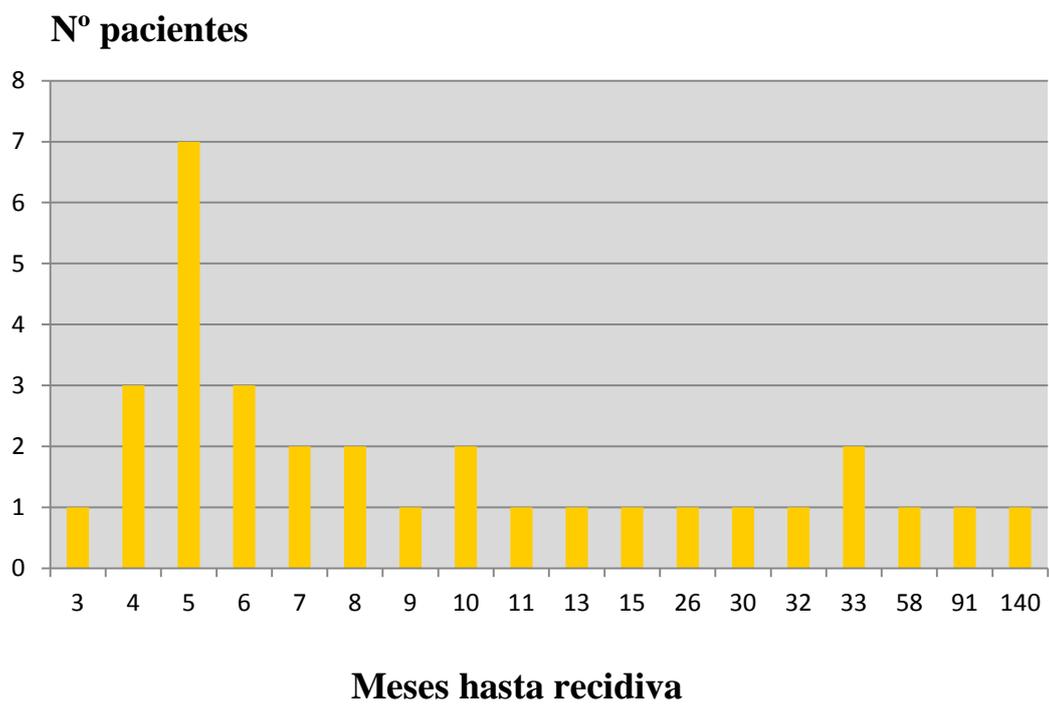


Figura 12. Meses transcurridos hasta la recidiva. Análisis retrospectivo

4.1.5 Influencia de distintos factores epidemiológicos sobre la tasa de recidivas

Las características epidemiológicas de la población estudiada en cuanto al hábito tabáquico, estado menopáusico, paridad, edad, antecedente de otras enfermedades de transmisión sexual (excluido el VIH ya que se incluyó en el estado de inmunosupresión), edad de inicio de las relaciones sexuales y el estado de inmunosupresión u otras enfermedades médicas asociadas, están reflejadas, junto con su nivel de significancia en relación a la tasa de recidivas, en la tabla 4.

Para evitar posibles sesgos de confusión, antes de estudiar cada variable epidemiológica se tuvo en cuenta que cada grupo de mujeres fuese homogéneo respecto al tiempo de seguimiento, meses hasta la aparición de la recidiva en caso de haberla, la edad, hábito tabáquico y el estado de inmunosupresión por considerarse éstos los factores que más podrían influir en la tasa de recurrencias.

Las mujeres menopáusicas presentaron una tasa de recidivas significativamente mayor que las no menopáusicas (21,7% vs 7,7%). Entre las mujeres de mayor edad, tanto estableciendo el punto de corte en los 40 como en los 50 años, también se diagnosticaron más casos de recidivas de una forma estadísticamente significativa (15,5% vs 6% con punto de corte en los 40 años, y 20% vs 7,8% con punto de corte en los 50 años).

En cuanto al hábito tabáquico, se diferenciaron inicialmente dos subgrupos dentro del grupo de fumadoras: uno de 125 mujeres que fumaban 20 cigarrillos o más al día y otro de 97 mujeres que consumían menos de 20

cigarros al día. Como la tasa de recidivas fue homogénea en ambos subgrupos (8,8% vs 10,31%), se decidió dividir a las pacientes simplemente en fumadoras y no fumadoras para el cálculo de la significación estadística. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar el hábito tabáquico ni el resto de factores epidemiológicos estudiados.

Variables epidemiológicas		Nº recidivas (%)	Significación estadística
Hábito tabáquico	222 Fumadoras	21 (9,4%)	p= 0,547 (NS)
	144 No fumadoras	11 (7,6%)	
	6 Sin dato		
Estado Menopáusico	23 Menopáusicas	5 (21,7%)	p=0,020 (significativo)
	349 No menopáusicas	27 (7,7%)	
Edad	103 mujeres ≥40 años	16 (15,5%)	p=0,003 (significativo)
	269 mujeres <40 años	16 (6%)	
	25 mujeres ≥50 años	5 (20%)	p=0,035 (significativo)
	347 mujeres <50 años	27 (7,8%)	
Paridad	35 mujeres ≥3 partos v.	5 (14,28%)	p=0,207 (NS)
	337 mujeres <3 partos v.	27 (8%)	
Antecedentes de otras ETS	42 mujeres SI	3 (7,14%)	p=0,716 (NS)
	329 mujeres NO	29 (8,81%)	
	1 mujer sin dato		
Edad inicio R.Sexuales	11 mujeres <15 años	2 (18,18%)	p=0,273 (NS)
	314 mujeres ≥15 años	27 (8,6%)	
	47 mujeres sin dato		p=0,82 (NS)
	230 mujeres <20 años	20 (8,7%)	
95 mujeres ≥20 años	9 (9,4%)		
Inmunosupresión / enfermedades médicas asociadas	76 mujeres SI	10 (13,15%)	p=0,09 (NS)
	295 mujeres NO	21 (7,11%)	
	1 mujer sin dato		
Método anticonceptivo	138 mujeres Hormonal	11 (8%)	p=0,807 (NS)
	107 mujeres Barrera	7 (6,5%)	
	114 mujeres no H-no B	12 (10,5%)	
	13 mujeres sin dato		

Tabla 4. Variables epidemiológicas en relación a tasa de recidivas. Parto v.(parto vaginal), NS (no significativo). No H-no B (no Hormonal-no Barrera). Análisis retrospectivo.

4.1.6 Aclaramiento VPH

Se consideró que una paciente VPH positivo pre-conización había aclarado el virus cuando el último test VPH post-conización realizado durante el seguimiento, era negativo para el tipo viral presente pre-conización de forma espontánea, es decir, sin haber practicado ningún otro tratamiento como por ejemplo, una segunda conización por recidiva.

Por tanto, para el cálculo del aclaramiento se excluyeron un total de 134 mujeres de las 372 iniciales (n=238):

- 17 pacientes sin test VPH pre-conización disponible
- 101 pacientes VPH pre-conización negativo
- 12 pacientes sin test VPH post-conización disponible
- 4 pacientes sin test VPH pre ni post-conización disponibles

De las 238 pacientes incluidas en este análisis, se objetivó aclaramiento del VPH durante el seguimiento post-conización en 216 mujeres (90,75%) y persistencia del mismo tipo viral detectado pre-conización en 22 (9,25%).

No surgieron dudas con las 6 mujeres VPH positivas pre-conización sin tipaje viral, ya que todas ellas aclararon el virus, fuese cual fuese su tipo original.

Los tipos virales de los 22 casos VPH-persistentes, se pueden apreciar en la figura 13, donde destaca claramente el tipo 16 objetivado en 18 de esos 22 casos (en 17 casos solo y en uno como infección mixta, supone un 82%). El resto fueron los tipos 33, 58, no tipificable y no tipificable de bajo riesgo, cada uno de ellos representado por un caso, es decir, un 4,5%.

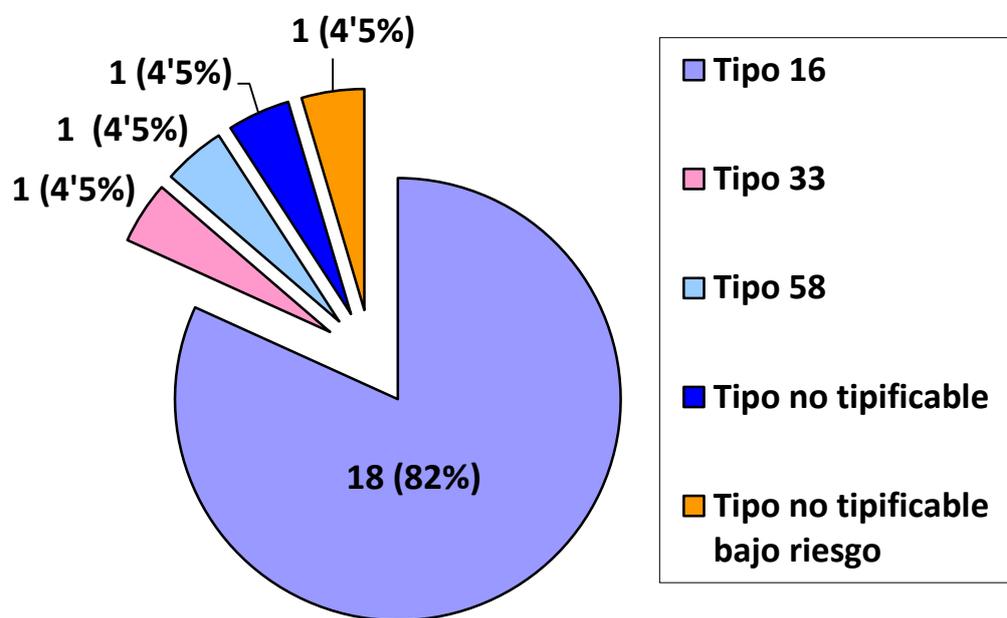


Figura 13. Tipos virales persistentes post-conización. Análisis retrospectivo

A pesar de esta dominancia del tipo 16 en los casos VPH-persistentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aclaramiento según fuese el tipo viral previo a la conización ya que la mayoría de las infecciones se aclararon tras el tratamiento fuese cual fuese el tipaje original (tabla 5).

Es decir, el hecho de que el 82% de los virus que no se aclararon tras la conización fuesen del tipo 16 probablemente se debe a que este tipo viral es el más frecuente en general, previo a la conización (tabla 3). Su tasa de aclaramiento tras el tratamiento (86%) es ligeramente inferior a la de los otros tipos virales (88-100%), pero sin demostrarse diferencias estadísticamente significativas.

Tipo viral pre-conización	Aclaramiento (%)	Persistencia (%)	Total pacientes
16	104 (86%)	17 (14%)	121
18	13 (100%)	-	13
31	9 (100%)	-	9
33	15 (93,75%)	1 (6,2%)	16
58	8 (88%)	1 (11%)	9
16 y 33	4 (100%)	-	4
16 y 18	14 (100%)	-	14
16 y 58	4 (100%)	-	4
No tipificable bajo riesgo	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8
No tipificable alto riesgo	8 (100%)	-	8
No tipificable	8 (88%)	1 (11%)	9
Sin tipificar	6 (100%)	-	6
Otros poco frecuentes (6,11,45,66,73)	7 (100%)	-	7
Mixtas poco frecuentes (16-11,16-31,16-6,31-33-51,...)	9 (90%)	1 (10%) Mixta 16-18 y 31-33	10
Total	216	22	238

Tabla 5. Tasas de aclaramiento post-conización según tipo viral pre-conización. Análisis retrospectivo

4.1.7 Tiempo de aclaramiento

En cuanto al tiempo requerido para aclarar la infección VPH, 151 pacientes (72%) lo aclararon en el **primer año** de seguimiento:

- Dentro de este grupo, 76 de ellas (35%) tenían el primer test VPH realizado a los 6 meses de la conización y era negativo, así que podemos afirmar que aclararon el VPH en 6 meses o menos.
- Otras 7 mujeres (3%) tenían su primer test VPH post-conización (realizado a los 6 meses) positivo y el siguiente (a los 12 meses) negativo, es decir, el aclaramiento fue entre los 6 y los 12 meses post-tratamiento.
- En las 73 mujeres restantes de este grupo (34%) el primer test VPH fue realizado a los 12 meses y era negativo, es decir, se puede afirmar que aclararon la infección a lo largo del primer año pero no es posible precisar si antes o después de 6 meses.

Por otro lado, hubo 6 pacientes (3%) que aclararon el virus tras más de 1 año de seguimiento, ya que sus primeros test VPH a los 6 o 12 meses fueron positivos y los posteriores negativos en un tiempo variable. En concreto, una paciente aclaró el virus más allá de 2 años post-conización y otra en 5 años.

Por último, en 54 mujeres (25%) que aclararon el virus, no es posible conocer el momento en el que lo hicieron ya sea porque el primer test VPH de seguimiento disponible es posterior al primer año o bien porque, aunque tengan un test VPH de control precoz (a los 6 meses) positivo, el siguiente disponible es tardío (más de 12 meses). Figura 14.

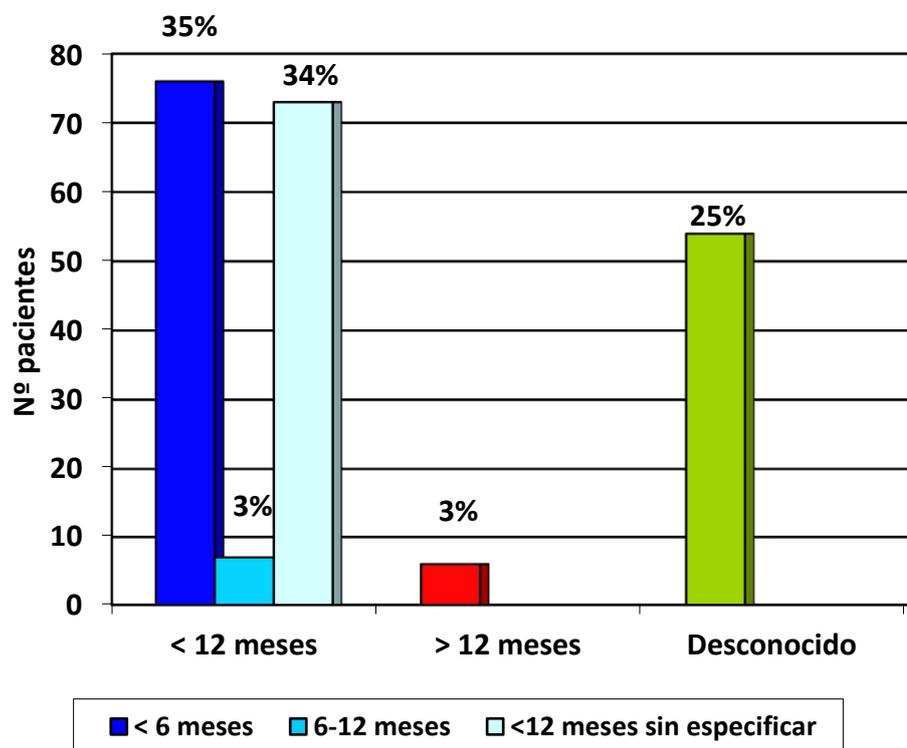


Figura 14. Tiempo de aclaramiento VPH post-conización. Análisis retrospectivo

Al relacionar el tiempo de aclaramiento con los diferentes tipos virales pre-conización, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (tabla 6).

De todas formas, el tamaño muestral de cada grupo es pequeño, con escasa potencia estadística, al dividir el total de pacientes de cada tipo viral en 5 categorías (aclaramiento antes de 1 año sin precisar el momento, aclaramiento antes de 6 meses, entre 6-12 meses, más allá de 1 año o desconocido).

Tipo viral pre-LEEP	Tiempo de aclaramiento					Total pacientes
	< 12 meses (sin precisar momento)	< 6 meses	6-12 meses	>12 meses	Desconocido	
16	31	39	5	2	27	104
18	5	3	-	-	5	13
31	4	3	-	-	2	9
33	6	6	-	2	1	15
58	3	3	-	-	2	8
16 y 33	1	3	-	-	-	4
16 y 18	3	3	-	1	7	14
16 y 58	1	2	-	-	1	4
No tipificable bajo riesgo	2	2	1	-	2	7
No tipificable alto riesgo	1	4	-	-	3	8
No tipificable	2	3	1	1	1	8
Sin tipificar	3	1	-	-	2	6
Otros poco frecuentes	3	2	-	-	2	7
Mixtas poco frecuentes	3	2	-	-	4	9

Tabla 6. Tiempo de aclaramiento según tipo viral pre-conización. Análisis retrospectivo

4.1.8 Nuevas infecciones

De las 101 mujeres **VPH negativas pre-conización**, 84 permanecieron negativas durante todo el seguimiento (83%), mientras que 17 (17%) adquirieron una *nueva infección*, es decir, algún test VPH post-conización fue positivo.

Los tipos virales correspondientes a estas nuevas infecciones se pueden observar en la figura 15, en la que cada sector corresponde a un tipo viral y sobre ellos quedan reflejados el número absoluto de pacientes y porcentaje que representa cada tipo dentro del total.

Nuevamente destaca el tipo 16 con un 35%.

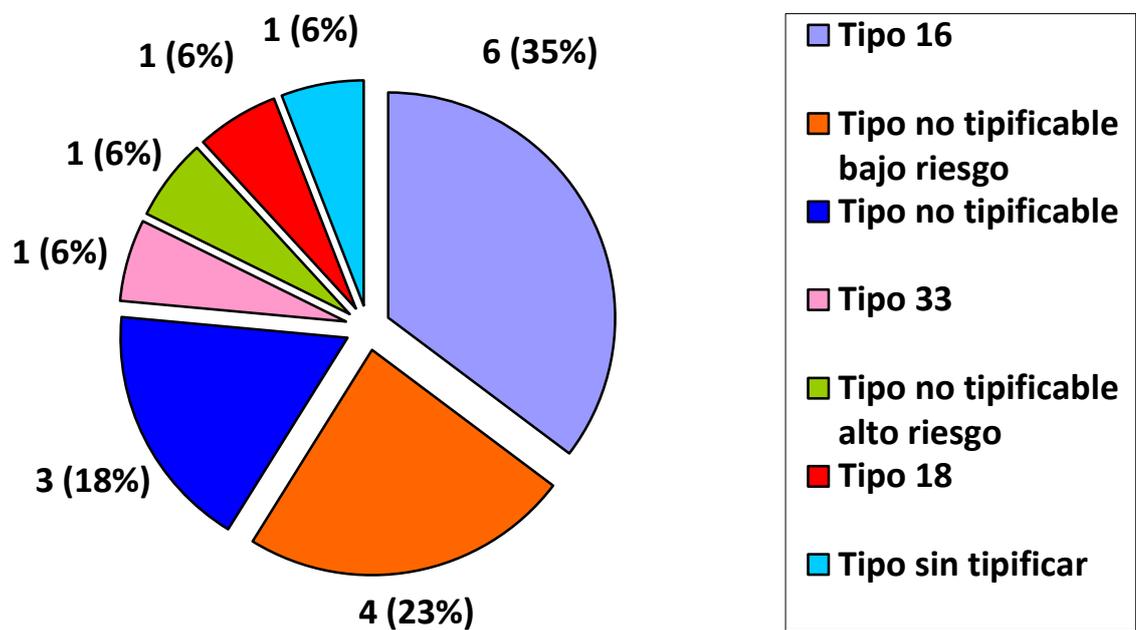


Figura 15. Tipos virales de las *nuevas infecciones*. Análisis retrospectivo

De estos 17 casos, 10 nuevas infecciones se aclararon durante el tiempo de seguimiento (59%), 3 fueron persistentes (17,5%) y en 4 de ellas no se pudo determinar el aclaramiento (23,5%) ya que no estaba disponible ningún otro test VPH posterior al que revelaba la nueva infección (figura 16).

El aclaramiento de estas *nuevas infecciones* aquí descrito ocurrió de forma espontánea durante el seguimiento, es decir sin practicar ningún otro tratamiento o conización.

De las 3 *nuevas infecciones* persistentes, 2 fueron provocadas por el tipo 16 y la otra por el tipo 33. Todas ellas ocasionaron recidivas que fueron tratadas mediante conización o histerectomía (apartado 4.1.15) siendo entonces aclarado el virus definitivamente.

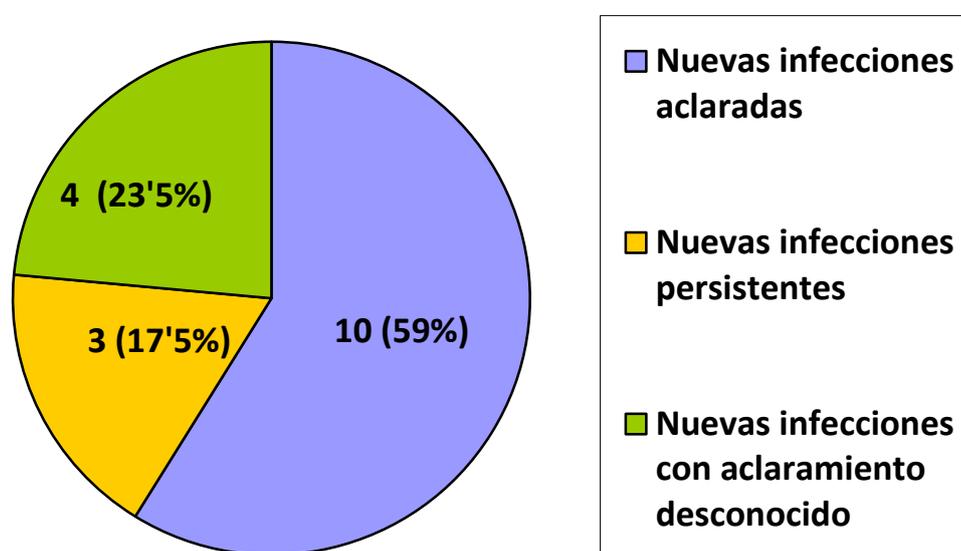


Figura 16. Tasa de aclaramiento de las *nuevas infecciones*. Análisis retrospectivo

4.1.9 Otras infecciones adquiridas

Hubo 25 pacientes (10%) que, siendo **VPH positivas pre-conización**, adquirieron otra infección VPH durante el seguimiento de un tipo viral distinto al original, independientemente de que éste se hubiese aclarado o no. A esta situación la llamaremos *otra infección adquirida*.

El VPH inicial, pre-conización, ya se había aclarado en 23 de estas 25 pacientes antes de adquirir la otra infección; sin embargo, 2 de estas mujeres eran VPH-16 persistentes y puntualmente resultaron positivas para un tipo viral distinto en alguno de los test VPH de seguimiento.

Teniendo en cuenta que 3 de estas mujeres tuvieron más de una infección añadida a lo largo de su seguimiento, el total de *otras infecciones adquiridas* es 28 y la distribución de los tipos virales se puede apreciar en la figura 17. Las más frecuentes son las infecciones transitorias por un VPH no tipificable que, aunque sin determinar si era de alto o bajo riesgo, lo más probable es que fuese de bajo riesgo precisamente por ese carácter transitorio de la infección.

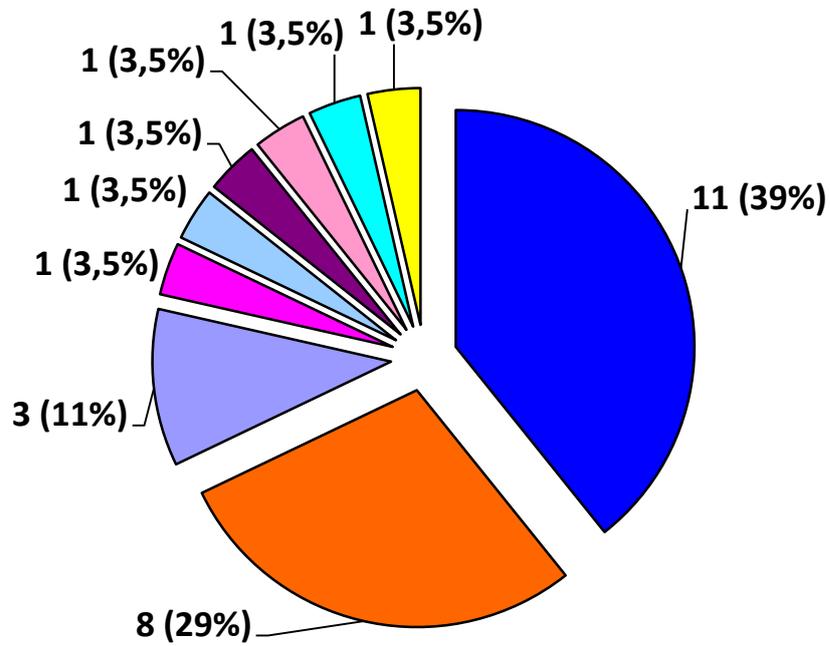


Figura 17. Tipos virales de *otras infecciones adquiridas*. Análisis retrospectivo

En conjunto, de estas 28 infecciones se aclararon 19 y persistieron 4, mientras que el aclaramiento fue desconocido en 5 de ellas por no disponer de ningún test VPH posterior al que revelaba la *otra infección adquirida* (figura 18).

Al igual que en el apartado anterior, estos aclaramientos fueron espontáneos, sin otras conizaciones de por medio.

De los 4 casos con *otra infección adquirida* persistente, 2 fueron provocados por el VPH tipo 16, otro por el tipo 11 y el último por un tipo no tipificable. De nuevo el tipo 16 es el más frecuente entre las infecciones que no se aclaran aunque, como ya se comentó anteriormente, probablemente sea debido a que es el genotipo más prevalente en general.

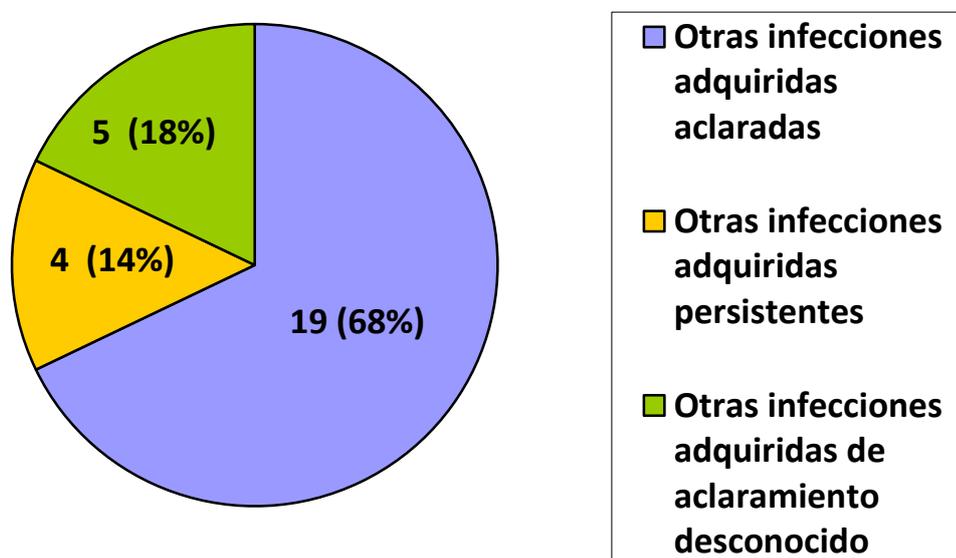


Figura 18. Tasa de aclaramiento de *otras infecciones adquiridas*. Análisis retrospectivo

4.1.10 Márgenes y afectación endocervical

El estudio de los márgenes en la pieza de conización reveló una afectación de los mismos en 36 de las 372 mujeres incluidas (9,67%), mientras que en 334 (89,8%) estaban libres. En 2 pacientes el informe anatómo-patológico refería que los márgenes eran difíciles de valorar.

De las 334 mujeres con márgenes libres, 23 presentaron una recidiva (6,8%), sin embargo, de las 36 pacientes con márgenes afectados recidivaron 9 (25%). Esta diferencia es estadísticamente muy significativa ($p=0,00024$).
Figura 19.

A pesar de que la afectación de los márgenes en una pieza de conización por CIN 2-3 eleva el riesgo de presentar enfermedad residual o recidivante, la inmensa mayoría de las pacientes con márgenes positivos no presentará ninguna recidiva durante su seguimiento y, por otro lado, aquellas mujeres con márgenes libres no están exentas de riesgo.

Por otro lado, e independientemente del estado de los márgenes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al relacionar la afectación endocervical en la pieza quirúrgica con la tasa de recidivas (8% de recidivas en los casos sin afectación endocervical vs. 10,75% en los casos con afectación endocervical).

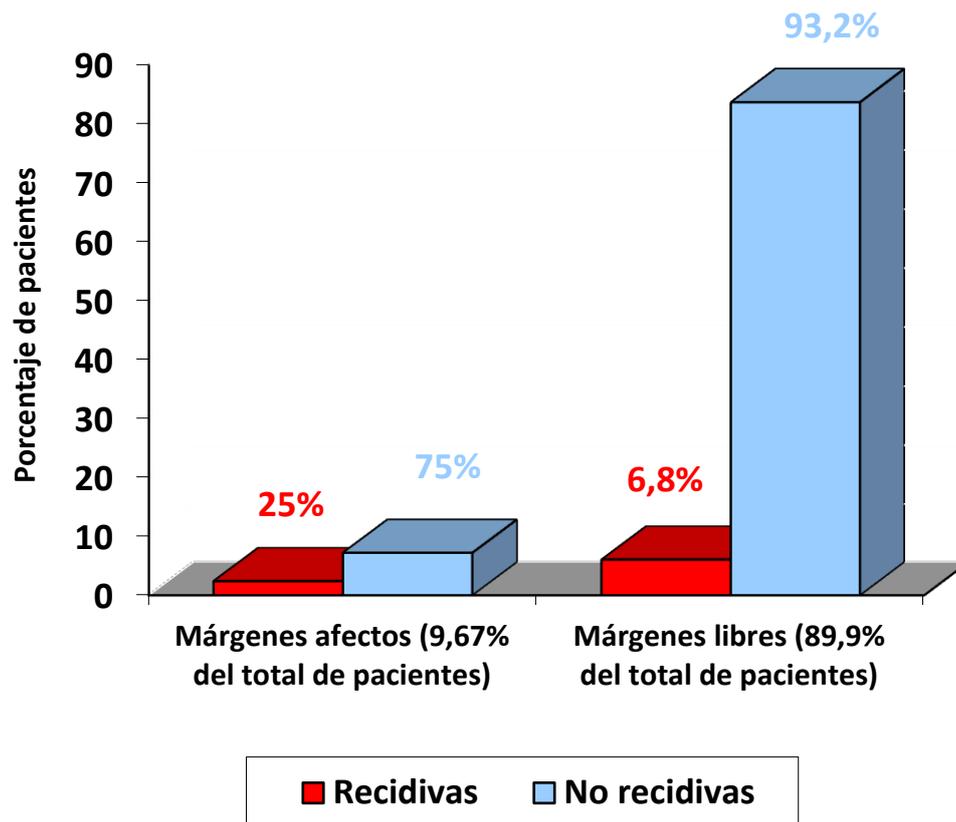


Figura 19. Tasa de recidivas en función de la afectación de los márgenes quirúrgicos. Análisis retrospectivo

4.1.11 Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del test VPH, citología y doble test

1. Test VPH

Para el análisis del valor estadístico del test VPH como predictor de recidivas, de las 372 mujeres incluidas inicialmente en este estudio, se eliminaron 16 en las que no estaba disponible ningún test VPH post-conización, 4 pacientes con una *nueva infección* de aclaramiento desconocido y 4 con *otra infección adquirida* también de aclaramiento desconocido.

Por tanto, el cómputo global para este cálculo fue de 348 pacientes, 32 de las cuales eran VPH-persistentes post-conización o, al menos, en el momento de la recidiva histológica y las 316 restantes se consideraron VPH negativas en el seguimiento a largo plazo:

- 32 pacientes VPH persistentes:
 - 25 sin aclaramiento del VPH inicial pre-conización (o al menos sin aclaramiento en el momento de la recidiva, en caso de producirse)
 - 3 *nuevas infecciones* persistentes
 - 4 *otras infecciones adquiridas* persistentes

- 316 pacientes no VPH persistentes:
 - 208 aclaramiento del VPH inicial pre-conización sin *otras infecciones adquiridas*

- 14 sin test VPH pre-conización disponible, pero todos los test VPH post-conización son negativos
- 10 *nuevas infecciones* que se aclaran
- 84 VPH pre-conización negativo que permanece negativo

Como ya se comentó anteriormente, en este estudio se demostraron 32 recidivas durante el seguimiento, considerando como tales a las CIN 2-3 en análisis histológico.

Entre las 32 pacientes VPH-persistentes se diagnosticaron 22 de estas recidivas, mientras que únicamente 10 de las 316 mujeres sin persistencia viral desarrollaron una recidiva. Estos datos suponen una sensibilidad del test VPH post-conización del 68,75% para predecir una recidiva y una especificidad del 96,83%. El valor predictivo positivo (VPP) de dicho test resultó igual que la sensibilidad, del 68,75% y el valor predictivo negativo (VPN) del 96,83%.

Además de esas 32 pacientes con recidiva de CIN 2-3 en biopsia, hubo otras 54 mujeres que presentaron durante el seguimiento alguna citología alterada (\geq ASCUS) o CIN 1 en biopsia que se resolvieron espontáneamente, sin llegar a desarrollar HSIL/CIN 2-3. Si considerásemos a todas ellas como

recidiva, es decir, un total de 86, los falsos negativos del test VPH aumentan de forma que la sensibilidad de dicho test disminuye al 31,4% y la especificidad aumenta al 98,1%. Los VPP y VPN serían del 84,37% y 81,33% respectivamente. De todas formas, en estos casos podríamos encontrarnos ante aclaramientos espontáneos virales previos a la normalización citológica y no ante falsos negativos del test VPH. Por este motivo, consideramos mucho

más “real” clínicamente definir recidiva como la demostración en biopsia de CIN 2+ y no a cualquier alteración en la citología.

2. Citología

Para el cálculo del poder predictivo de la citología respecto a las recidivas CIN 2-3 histológicas, consideramos de forma global todas las citologías que cada paciente tenía durante su seguimiento. Así, si una paciente tenía al menos una citología alterada (\geq ASCUS) se consideraba positiva y si todas las de su seguimiento eran normales, negativa. En el caso de las pacientes con recidiva histológica, para considerar la prueba como positiva, la/s citología/s alteradas debían ser previas o al menos simultáneas a la toma de la biopsia que revelaba CIN 2-3.

Se estudiaron 372 mujeres entre las que 27 con recidiva presentaron previamente citología positiva, mientras que todas las citologías de las otras 5 recidivas fueron negativas.

Estos datos suponen una sensibilidad para la citología aislada del 84,37% y una especificidad muy similar, del 84,7%, para predecir las recidivas. Por otro lado, el VPP fue del 34,17% y el VPN del 98,3%.

3. Doble test

Llamaremos *doble test* a la combinación de citología y test VPH durante el seguimiento. Cuando alguna de ambas pruebas resulta alterada en cualquier consulta de control post-tratamiento, es decir, citología \geq ASCUS o

el VPH positivo, el doble test se considera positivo y si ambas pruebas son normales durante todo el seguimiento, el doble test se considera negativo.

Para el cálculo de los valores estadísticos del doble test, el cómputo global de pacientes fueron 356 (excluyendo simplemente las 16 sin ningún test VPH post-conización disponible de las 372 iniciales) entre las que se detectaron las 32 recidivas histológicas CIN 2-3 ya comentadas.

En 29 de estas recidivas, alguna de las dos pruebas, citología o test VPH, resultaron positivas; sin embargo en los otros 3 casos de recidiva el doble test fue negativo. En estos 3 últimos casos, las recidivas se detectaron en biopsias que se realizaron gracias a la colposcopia rutinaria en nuestra unidad. De todas formas, estas 3 recidivas se resolvieron espontáneamente, sin necesidad de otra conización.

La sensibilidad y el VPN para predecir dichas recidivas fueron muy altos, 90'62% y 98'74% respectivamente, mientras que la especificidad fue del 72,53% y el VPP del 24,57%.

	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Test VPH	68,75	96,83	68,75	96,83
Citología	84,37	84,7	34,17	98,3
Doble test	90,62	72,53	24,57	98,74

Tabla 7. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del test VPH, la citología y el doble test como predictores de recidivas. Análisis retrospectivo

4.1.12 Concordancia citología-test VPH post-conización

Para calcular la concordancia entre la citología y el test de VPH se tuvieron en cuenta todas las visitas de cada paciente en las que se hubiese realizado simultáneamente una citología y un test VPH, esto es un total de 898 visitas. Se consideró positiva cualquier alteración citológica, es decir ASCUS o peor.

Hubo concordancia entre ambas pruebas en el 82% de las visitas, es decir, una P_0 de 0'82 en tanto por 1. Dado que la concordancia esperada simplemente por el azar en este caso sería un 74% ($P_e = 0'74$), el índice kappa entre la citología y el test VPH, calculado según la fórmula expuesta en *Material y Métodos*, es de 0'314, lo que supone una concordancia débil.

De todas formas, hay que tener en cuenta que estas 2 pruebas miden metas distintas. La detección del VPH, sobre todo de los tipos de alto riesgo, predice la presencia o futuro desarrollo de una displasia; mientras que la citología detecta anomalías citológicas que incluyen el efecto citopático viral producido por el VPH. Esto significa que se esperan resultados discordantes en los que el VPH sea positivo aunque la citología sea normal, pero lo contrario (citología positiva con VPH negativo) debería ser la excepción.

A pesar de esta concordancia débil que hemos obtenido, el porcentaje de estos casos citología positiva-VPH negativo fue bajo, del 5,8%.

Los casos discordantes citología negativa-VPH positivo supusieron un 11,7% del total.

4.1.13 Concordancia citología-biopsia post-conización

Para el cálculo del índice kappa el resultado de las pruebas a estudiar debe ser categórico, es decir, positivo o negativo. Por tanto, para comparar citología frente a biopsia consideramos positivas aquellas citologías o biopsias que presentasen cualquier alteración (\geq ASCUS) y negativas cuando eran informadas como estrictamente normales.

Se tuvieron en cuenta todas las visitas de cada paciente en las que se hubiese realizado simultáneamente una citología y una biopsia cervical, esto es un total de 220 visitas.

Se observó concordancia entre ambas pruebas en el 80% de las visitas ($P_o = 0'8$), mientras que la concordancia esperada simplemente por el azar en este caso sería un 57,25% ($P_e = 0'57$). Por tanto, el índice kappa entre la citología y la biopsia es de 0'532, es decir, una concordancia moderada.

Considerando a la biopsia como *gold standard*, de las 44 visitas discordantes, 24 fueron falsos negativos de la citología y 20 fueron falsos positivos.

4.1.14 Piezas de conización sin displasia

De las 372 conizaciones, hubo 59 piezas informadas anatómopatológicamente *sin displasia* (15,86%), 307 con CIN 2-3, 4 como CIN 2-3 con microinvasión, una con metaplasia atípica y otra con displasia queratinizante (figura 20). La displasia queratinizante es una variante del CIN

2-3 con células de citoplasma queratinizado hipermaduro y a menudo con forma de renacuajo.

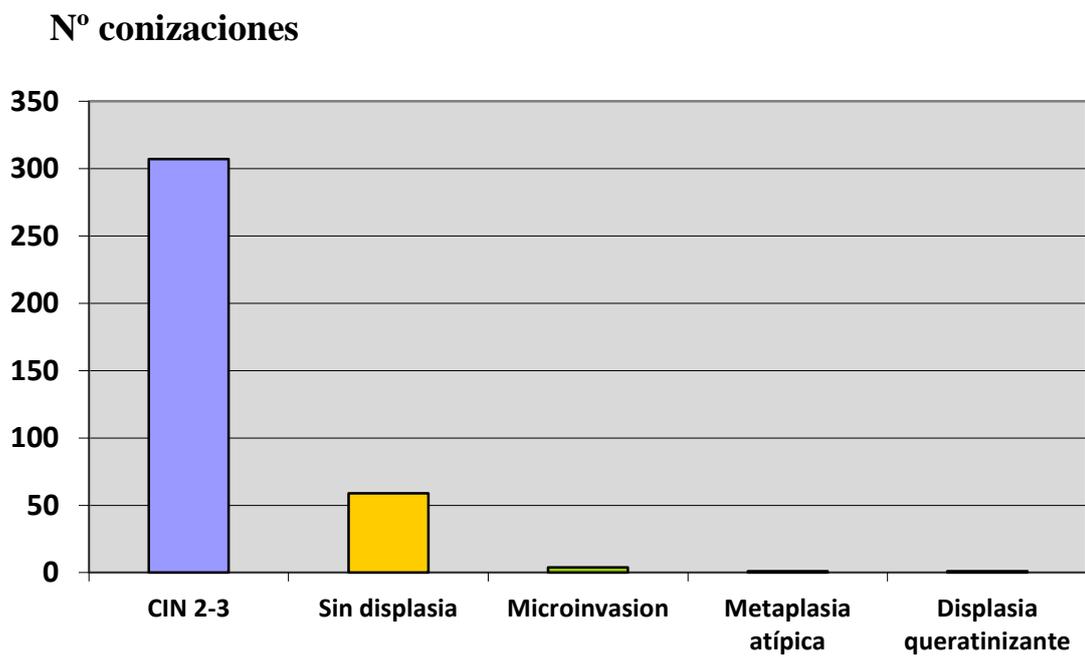


Figura 20. Resultado anatómico-patológico de las piezas de conización. Análisis retrospectivo

De las 59 pacientes cuya pieza fue informada como normal, 8 (13,5%) tuvieron alguna anomalía en el seguimiento:

- Seis de ellas presentaron citología alterada o CIN 1 en biopsia de forma puntual
- Las otras 2 desarrollaron una recidiva CIN 2-3 en biopsia:
 - Una de ellas fue sometida a una segunda conización que nuevamente fue informada *sin displasia* aunque posteriormente volvió a presentar CIN 2-3 en biopsia que finalmente se resolvió de forma espontánea.
 - La otra paciente con recidiva histológica, presentó a los 3 meses de la conización una citología informada como *carcinoma infiltrante* por lo que se le practicó una histerectomía que reveló CIN 2-3 en el estudio histológico.

Estos hallazgos deben alertarnos: el hecho de que la pieza de una conización sea informada como *normal* frecuentemente se justifica pensando que la displasia demostrada inicialmente mediante la biopsia con pinza de sacabocados fuese tan pequeña que se habría extirpado completamente en dicha biopsia; sin embargo, las anomalías pueden persistir en una zona más alta del canal endocervical no alcanzada con el asa de la conización por lo que estas pacientes deben continuar bajo control estricto como el resto.

4.1.15 Conizaciones sucesivas e histerectomías

De las 372 pacientes incluidas en este estudio, 26 fueron sometidas a una segunda e incluso una tercera conización por los resultados del seguimiento (figura 21).

En 2 de estas pacientes, se realizó una segunda conización, una de ellas en otra Comunidad Autónoma, simplemente por presentar bordes afectos en la pieza de la primera conización. En ambos casos el resultado anatómico-patológico del segundo tratamiento fue informado *sin displasia* y el resto del seguimiento fue normal.

En otras 2 pacientes, la segunda conización se realizó por presentar CIN 1 en biopsia o LSIL en citologías de forma persistente durante el seguimiento. En una de ellas el segundo cono se informó como CIN 2-3 con un seguimiento largo posterior completamente normal, y la otra, en la que la pieza del segundo tratamiento revelaba microinfiltración, falleció por otro motivo en un breve periodo de tiempo.

En las 22 pacientes restantes, se indicó una segunda conización por detectarse HSIL/CIN 2-3 en biopsias o citologías de seguimiento. En 7 de ellas no se encontró displasia en el segundo cono, aunque, como ya se comentó en el apartado anterior, 3 de estas 7 mujeres volvieron a presentar alguna alteración LSIL/CIN 1 o HSIL/CIN 2-3 en citologías o biopsias posteriores que se resolvieron espontáneamente.

El resto del seguimiento en las otras 4 pacientes con segundo cono *sin displasia* fue estrictamente normal.

Algunas de las otras 15 mujeres con segunda conización por detectarse HSIL/CIN 2-3 en biopsias o citologías de seguimiento, se sometieron a una tercera conización o incluso a una histerectomía, con resultados diversos.

El curso de todas las pacientes sometidas a varios tratamientos por anomalías en su seguimiento, se puede observar en la figura 21 junto con su *status* VPH representado en colores.

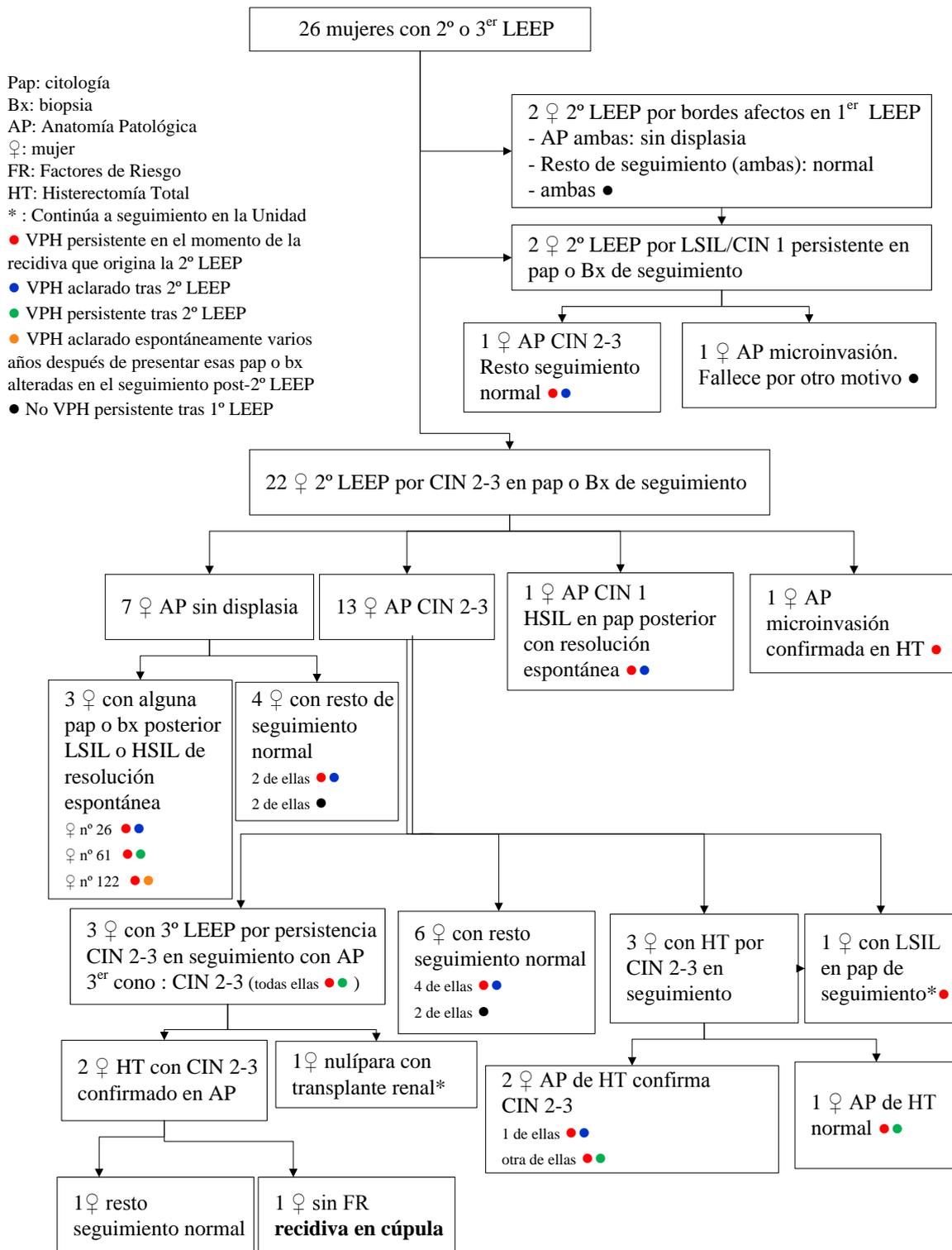


Figura 21. Mujeres con 2ª-3ª conización o histerectomía, motivos y seguimiento. Análisis retrospectivo

Histerectomías

Se realizaron **16 histerectomías** entre las 372 pacientes de este estudio.

Seis de ellas se practicaron después de que una segunda o tercera conización revelase CIN 2-3 persistente o microinvasión y ya han quedado reflejadas en la figura 21.

Tres histerectomías fueron debidas a causas ajenas a la displasia cervical (2 por miomas y otra por cáncer ovárico) y en ninguna de ellas se encontró recidiva en el cérvix que no se hubiese detectado con las visitas de control post-conización.

Las 7 restantes se practicaron en mujeres que presentaron HSIL en citología o legrado endocervical de seguimiento:

- En 5 de estas 7 histerectomías se confirmó CIN 2-3 en el estudio anatómo-patológico (3 de las cuales eran VPH persistentes)
- En las otras 2 hubo discrepancia entre la citología o biopsia preoperatorias y el análisis de la pieza quirúrgica:
 - En una paciente cuya citología preoperatoria revelaba HSIL, con colposcopia normal, el estudio de la pieza reflejaba simplemente *atipia* por lo que se revisó la citología que debería haber sido informada como AGUS y no HSIL.

- En otra paciente con citología de seguimiento informada como *carcinoma epidermoide, proliferación celular atípica* y CIN 2-3 en biopsia aunque con limitaciones por muestra escasa, al estudiar la pieza uterina no se encontró ninguna displasia.

4.2 ANÁLISIS PROSPECTIVO

Las 97 mujeres que fueron incluidas en este estudio tenían una media de edad de 40 años en el momento de la conización (rango 22-71 años).

4.2.1 Estudio anatomo-patológico previo a la conización

La comparativa entre la citología, la biopsia preoperatoria guiada por colposcopia y el resultado anatomo-patológico final de la pieza de conización se puede observar en la tabla 8.

Cabe destacar varias discordancias entre los resultados de estas pruebas, señaladas en la tabla mediante letra en negrita:

- Hubo 3 casos en los que, tras una citología HSIL, la biopsia preoperatoria venía informada como normal. Los conos de estos casos confirmaban CIN 2-3, explicándose este hecho probablemente porque la lesión se encontrase en el canal endocervical y no en el exocérnix, donde se habían realizado las biopsias.
- En 9 casos se practicó la conización ante una citología HSIL sin realizar biopsia previa para confirmar el diagnóstico. La mayoría de estas pacientes eran mayores, con deseo genésico cumplido y en todas ellas el cono fue informado como CIN 2-3.
- Hubo 21 pacientes con citología LSIL y otras 3 con citología ASCUS en las que la biopsia preoperatoria y la pieza de conización confirmaron CIN 2-3. En otro caso discordante especialmente

preocupante, la citología se informó como LSIL y la biopsia preoperatoria como CIN 1, mientras que el cono revelaba CIN 2-3.

- En 4 pacientes con citología LSIL y biopsia preoperatoria discordante CIN 2-3, el estudio anatómo-patológico definitivo en el cono se informó como CIN 1.

Este hecho podría explicarse por la coexistencia, en ciertas ocasiones, de CIN 1 y CIN 2-3; siendo en estos 4 casos de nuestro estudio el CIN 2-3 más reducido que el CIN 1 por lo que el primero se habría extirpado completamente con la biopsia.

En otro caso similar, que podría explicarse de la misma forma, la citología revelaba HSIL posteriormente confirmado en el cono con CIN 2-3, pero la biopsia pre-conización se había informado como CIN 1.

Dado que nuestro hospital es un centro universitario con médicos residentes en formación, otra posible explicación para estas discrepancias es un error en la toma de la biopsia guiada por colposcopia o en la técnica de la conización.

- El único caso con AGUS en citología se consideró concordante con el CIN 2-3 revelado histológicamente ya que las anomalías de células glandulares de cualquier tipo involucran un aumento de riesgo de que exista una entidad neoplásica maligna relacionada.
- En otros 11 casos con citología alterada (2 ASCUS, 5 LSIL y 4 HSIL) y CIN 2-3 confirmado en la biopsia, no se encontró displasia en la pieza de la conización. Estos hallazgos pueden deberse, como

ya se comentó anteriormente, a que la lesión, de dimensiones reducidas, hubiese sido extirpada completamente con la biopsia.

- En una única paciente (1%) la citología fue falsamente negativa ya que la biopsia y el cono se informaron como CIN 2-3.

Citología	Biopsia preoperatoria	Pieza conización	Total (n=97)
HSIL	CIN 2-3	CIN 2-3	39
HSIL	No practicada	CIN 2-3	9
HSIL	Insuficiente	CIN 2-3	2
HSIL	Normal	CIN 2-3	3
HSIL	CIN 2-3	Microinvasión	1
HSIL	CIN 1	CIN 2-3	1
LSIL	CIN 2-3	CIN 2-3	21
LSIL	CIN 1	CIN 2-3	1
LSIL	CIN 2-3	CIN 1	4
ASCUS	CIN 2-3	CIN 2-3	3
AGUS	CIN 2-3	CIN 2-3	1
ASCUS	CIN 2-3	Normal	2
LSIL	CIN 2-3	Normal	5
HSIL	CIN 2-3	Normal	4
Normal	CIN 2-3	CIN 2-3	1

Tabla 8. Comparativa entre citología, biopsia preoperatoria y pieza conización. Análisis prospectivo

4.2.2 Estudio viral previo a la conización

El test VPH previo a la conización resultó negativo en 29 pacientes (30%) y positivo en 68 (70%).

Entre las mujeres VPH-positivo pre-conización, el tipo 16 era el más frecuente, presentando una gran diferencia respecto al resto ya que aparecía en solitario en 23 casos y acompañado por otros tipos (infecciones mixtas) en 5 pacientes, es decir, estaba presente en el 41% del total (tabla 9).

A gran distancia del tipo 16, le seguían en frecuencia los tipos 31, presente en el 13% de las pacientes, y el 18 que se objetivó en el 7%.

Tipo viral pre-conización	Número de pacientes (%)
16	23 (34%)
31	9 (13%)
18	5 (7%)
No tipificable alto riesgo	4 (6%)
Mixtas poco frecuentes incluyendo el 16 (16-31-60,16-31,16-31-35-66,16-45, 16-52)	5 (7%)
Otras mixtas poco frecuentes (31-52,35-53,33-58,6-58,53-66)	5 (7%)
33	3 (4,4%)
35-58	2 (3%)
35	2 (3%)
45	2 (3%)
58	2 (3%)
39	1 (1,6%)
53	1 (1,6%)
68	1 (1,6%)
No tipificable bajo riesgo	1 (1,6%)
No tipificable	2 (3%)
Total	68

Tabla 9. Distribución de los tipos virales observados pre-conización.
Análisis prospectivo

4.2.3 Tiempo de seguimiento y pruebas realizadas durante el mismo

El tiempo medio de seguimiento post-conización fue de 24 meses (rango 19-30 meses, mediana de 24 meses) como puede apreciarse en la figura 22.

El 59% de las pacientes se siguieron durante 2 años o más.

El seguimiento mínimo en este estudio fue de 19 meses, es decir, todas las pacientes, como mínimo, deberían haber realizado 3 visitas de control a los 6-12-18 meses con sus respectivas citologías y test VPH.

Sin embargo, bien fuese por embarazo, por un cumplimiento insuficiente por parte de las pacientes o por una recidiva precoz que obligase a una segunda o tercera conización, a varias mujeres se les realizó un menor número de pruebas del establecido inicialmente para este análisis prospectivo.

El promedio de test VPH realizados a cada paciente fue de 3,4 (rango 1-5, mediana de 3) que coincide con el de citologías (media 3,4; rango 1-5 y mediana de 3) aunque no siempre se realizaron ambos test simultáneamente (figuras 23 y 24).

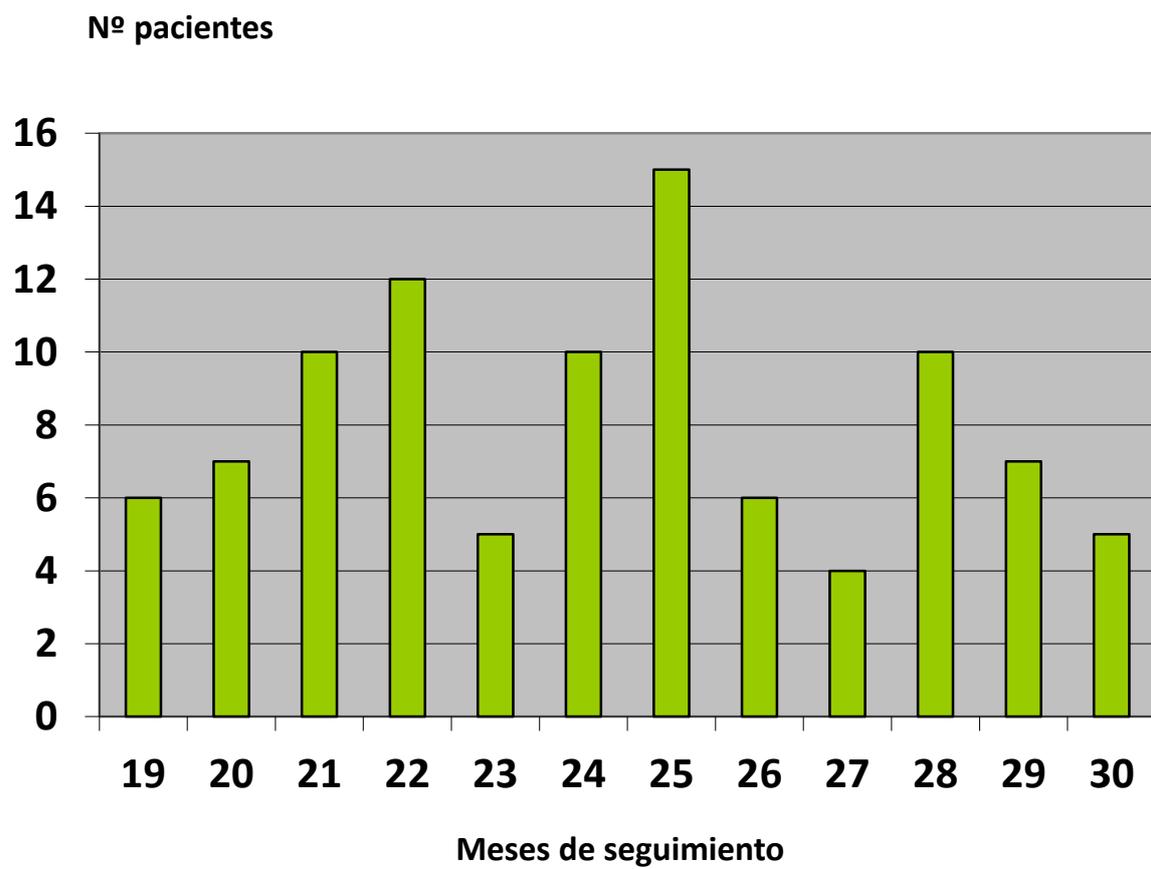


Figura 22. Meses de seguimiento post-conización. Análisis prospectivo

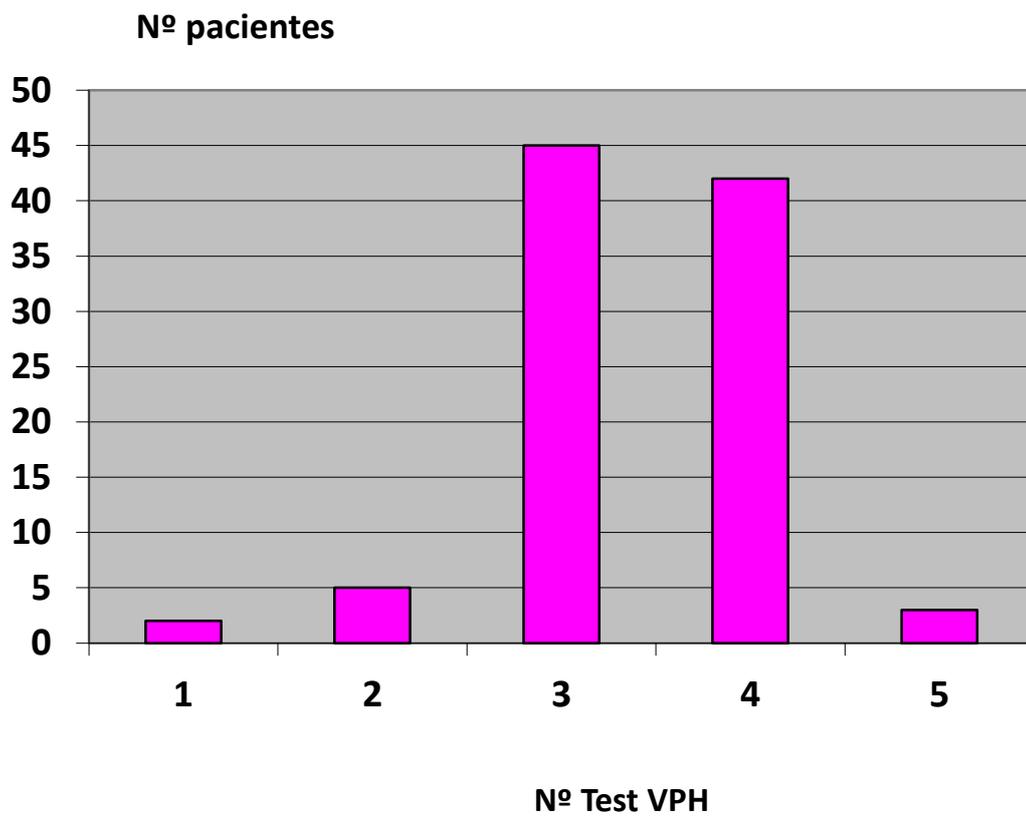


Figura 23. Test VPH de seguimiento realizados. Análisis prospectivo

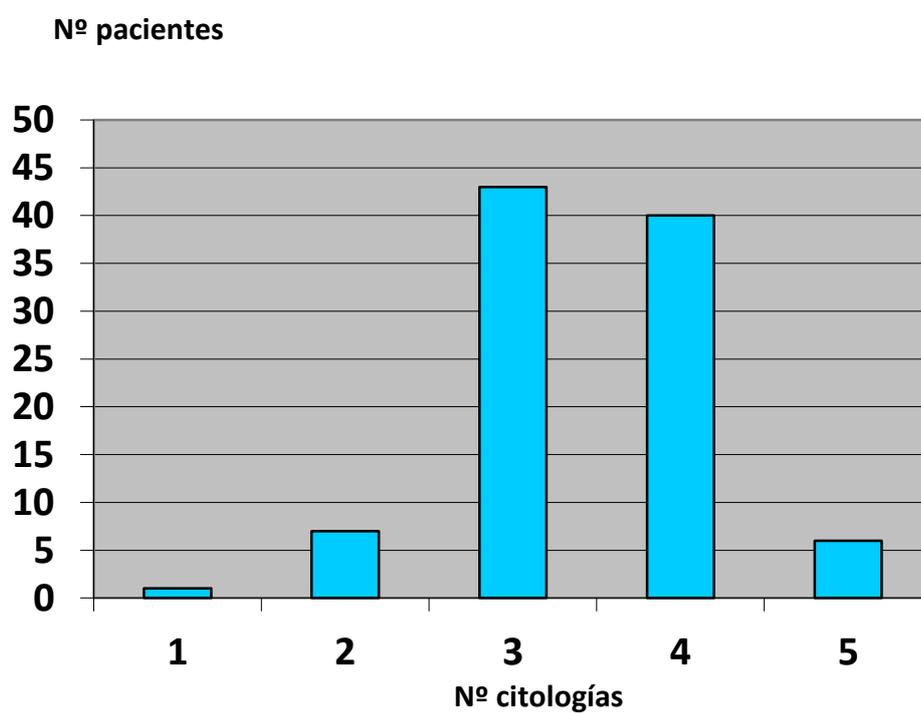


Figura 24. Citologías de seguimiento realizadas. Análisis prospectivo

4.2.4 Tasa y tiempo de aparición de las recidivas

A lo largo de este tiempo de seguimiento se objetivaron 15 casos de recidivas, considerando como tales a las CIN 2-3 demostradas mediante biopsia, es decir, una tasa de recidivas del 15,4%.

La mayoría de las recidivas (60%) se detectaron durante los 6 primeros meses de seguimiento, siendo el tiempo medio de aparición de 10 meses (rango 4-24 meses, mediana de 6. Figura 25). Se consideró como el momento del diagnóstico de la recidiva a la fecha de la primera citología de seguimiento alterada (\geq ASCUS) que originó una biopsia guiada por colposcopia en la que se demostró el CIN 2-3.

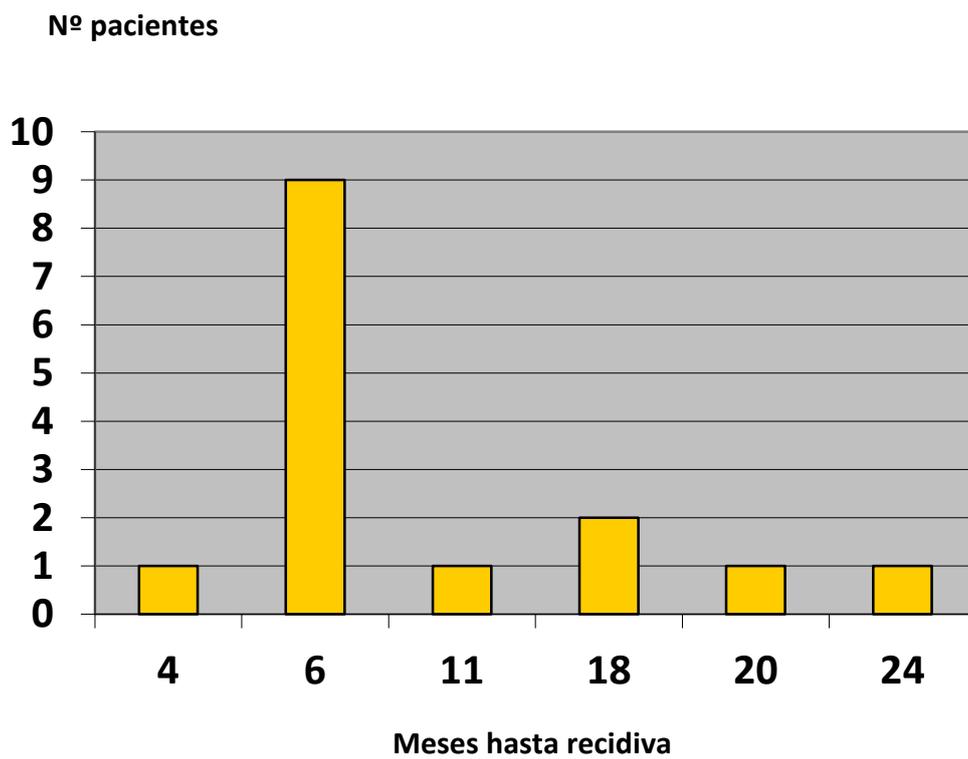


Figura 25. Meses transcurridos hasta la recidiva. Análisis prospectivo

4.2.5 Influencia de distintos factores epidemiológicos sobre la tasa de recidivas

Las características epidemiológicas de la población estudiada en cuanto al hábito tabáquico, estado menopáusico, paridad, edad, antecedente de otras enfermedades de transmisión sexual, edad de inicio de las relaciones sexuales, método anticonceptivo y el estado de inmunosupresión u otras enfermedades médicas asociadas, están reflejadas, junto con su nivel de significancia en relación a la tasa de recidivas, en la tabla 10.

Al igual que en el análisis retrospectivo, para evitar posibles sesgos de confusión, antes de estudiar cada variable epidemiológica se tuvo en cuenta que cada grupo de mujeres fuese homogéneo respecto al tiempo de seguimiento, meses hasta la aparición de la recidiva en caso de haberla, la edad, hábito tabáquico y el estado de inmunosupresión por considerarse éstos los factores que más podrían influir en la tasa de recurrencias.

Las mujeres de 40 años o más presentaron una tasa de recidivas significativamente mayor que las menores de esa edad (24% vs 8%). Sin embargo, no hubo diferencias si el corte de edad se establecía en los 50 años ni entre mujeres menopáusicas y no menopáusicas. Esto es debido a que 9 de las 15 recidivas que hubo en total, se desarrollaron en la franja de edad entre los 40 y los 49 años; y la mayoría de las mujeres de este segmento etario no eran aún menopáusicas.

Las pacientes con antecedentes de otras enfermedades de transmisión sexual presentaron también una tasa de recidivas significativamente mayor que las mujeres sin estos antecedentes (37,5% vs 11%).

En cuanto al hábito tabáquico, se diferenciaron inicialmente dos subgrupos dentro del grupo de fumadoras: uno de 29 mujeres que fumaban 20 cigarros o más al día y otro de 23 mujeres que consumían menos de 20 cigarros al día. Como la tasa de recidivas fue homogénea en ambos subgrupos, se decidió dividir a las pacientes simplemente en fumadoras y no fumadoras para el cálculo de la significación estadística. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar el hábito tabáquico ni el resto de factores epidemiológicos estudiados.

Variables epidemiológicas		Nº recidivas (%)	Significación estadística
Hábito tabáquico	52 Fumadoras	9 (17,3%)	p= 0,59 (NS)
	45 No fumadoras	6 (13,3%)	
Estado menopáusico	16 Menopáusicas	3 (19%)	p=0,7 (NS)
	81 No menopáusicas	12 (15%)	
Edad	46 mujeres ≥40 años	11 (24%)	p=0,03 (significativo)
	51 mujeres <40 años	4 (8%)	
	14 mujeres ≥50 años	2 (14,3%)	p=0,9 (NS)
	83 mujeres <50 años	13 (16%)	
Paridad	10 mujeres ≥3 partos v.	1 (10%)	p=0,61 (NS)
	87 mujeres <3 partos v.	14 (16%)	
Antecedente otras ETS	16 mujeres SI	6 (37,5%)	p=0,007 (significativo)
	81 mujeres NO	9 (11%)	
Edad inicio R.Sexuales	3 mujeres <15 años	1 (33,3%)	p=0,38 (NS)
	94 mujeres ≥15 años	14 (15%)	
	73 mujeres <20 años	14 (19%)	p=0,077 (NS)
	24 mujeres ≥20 años	1 (4%)	
Inmunosupresión / enfermedades médicas asociadas	30 mujeres SI	6 (20%)	p=0,4 (NS)
	67 mujeres NO	9 (13,4%)	
Método anticonceptivo	35 mujeres Hormonal	5 (14,3%)	p=0,826 (NS)
	26 mujeres Barrera	5 (19,2%)	
	36 mujeres no H-no B	5 (14%)	

Tabla 10. Variables epidemiológicas en relación a tasa de recidivas. Parto v. (parto vaginal), NS (no significativo). No H-no B (no barrera-no hormonal). Análisis prospectivo.

4.2.6 Aclaramiento VPH

Se consideró que una paciente VPH positivo pre-conización había aclarado el virus cuando el último test VPH post-conización realizado durante el seguimiento, era negativo para el tipo viral objetivado antes del tratamiento. Este aclaramiento debía producirse de forma espontánea, es decir, sin haber practicado ningún otro tratamiento como por ejemplo, una segunda conización por recidiva.

Por tanto, para el cálculo del aclaramiento sólo se tuvieron en cuenta las 68 mujeres VPH positivo pre-conización, excluyéndose 29 pacientes de las 97 iniciales por ser VPH pre-conización negativo.

De las 68 pacientes incluidas en este análisis, se objetivó aclaramiento del VPH durante el seguimiento post-conización en 56 mujeres (82,3%) y persistencia del mismo tipo viral detectado pre-conización en 12 (17,7%).

Los tipos virales de los 12 casos VPH-persistentes, se pueden apreciar en la figura 26, donde destaca claramente el tipo 16 objetivado en 8 de esos 12 casos (en 6 casos solo y en otros 2 como infección mixta, supone un 67%). El resto fueron los tipos 33, 31 y las infecciones mixtas 35-58 y 31-52, cada uno de ellos representado por un caso, es decir, un 8,25%.

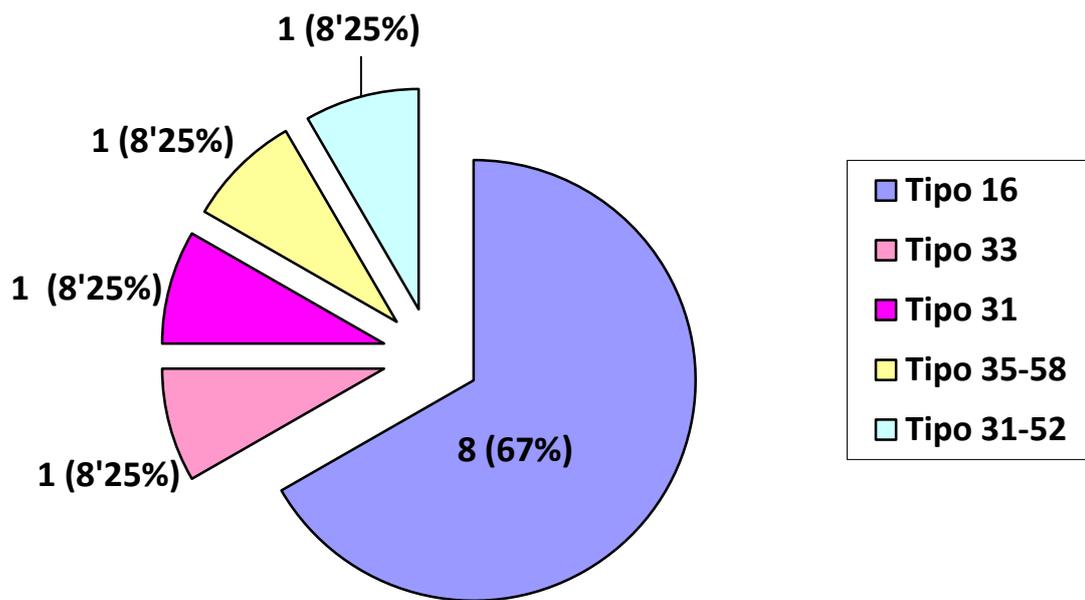


Figura 26. Tipos virales persistentes post-conización. Análisis prospectivo

A pesar de esta dominancia del tipo 16 en los casos VPH-persistentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aclaramiento según fuese el tipo viral previo a la conización ya que la mayoría de las infecciones se aclararon tras el tratamiento fuese cual fuese el tipaje original (tabla 11).

Es decir, el hecho de que el 67% de los virus que no se aclararon tras la conización fuesen del tipo 16 probablemente se debe a que este tipo viral es el más frecuente en general, previo a la conización (tabla 9).

De todas formas, el tamaño muestral de varios tipos virales es pequeño, con escasa potencia estadística.

Tipo viral pre-conización	Aclaramiento (%)	Persistencia (%)	Total pacientes
16	17 (74%)	6 (26%)	23
31	8 (89%)	1 (11%)	9
18	5 (100%)	-	5
33	2 (67%)	1 (33%)	3
35	2 (100%)	-	2
39	1 (100%)	-	1
45	2 (100%)	-	2
53	1 (100%)	-	1
58	2 (100%)	-	2
68	1 (100%)	-	1
35-58	1 (50%)	1 (50%)	2
Mixtas poco frecuentes incluyendo el 16 (16-31-60,16-31,16-31-35-66, 16-45, 16-52)	3 (60%)	2 (40%)	5
Otras mixtas poco frecuentes (31-52,35-53,33-58,6-58,53-66)	4 (80%)	1 (20%)	5
No tipificable alto riesgo	4 (100%)	-	4
No tipificable	2 (100%)	-	2
No tipificable bajo riesgo	1 (100%)	-	1
Total	56	12	68

Tabla 11. Tasas de aclaramiento post-conización según tipo viral pre-conización. Análisis prospectivo

4.2.7 Tiempo de aclaramiento

En cuanto al tiempo requerido para aclarar la infección VPH, 51 pacientes (91%) lo aclararon en los primeros 6 meses de seguimiento ya que el primer test VPH realizado a los 6 meses post-conización era negativo para el tipo viral presente pre-conización.

Las otras 5 mujeres lo aclararon entre los 6 y 12 meses post-tratamiento ya que el primer test VPH realizado a los 6 meses era aún positivo, pero el siguiente, realizado al año post-conización, ya era negativo.

Al relacionar el tiempo de aclaramiento con los diferentes tipos virales pre-conización, observamos que de las 5 mujeres que tardaron más tiempo (6-12 meses) en aclarar el virus, 2 eran portadoras del VPH-16, otras 2 de un tipo de alto riesgo no tipificable y la última de un tipo no tipificable (sin especificar alto o bajo riesgo).

Como estos 3 tipos virales también son aclarados, incluso en mayor proporción, dentro de los primeros 6 meses de seguimiento, podemos afirmar que ningún tipo viral tiende a persistir en el tiempo más que otros. Tabla 12.

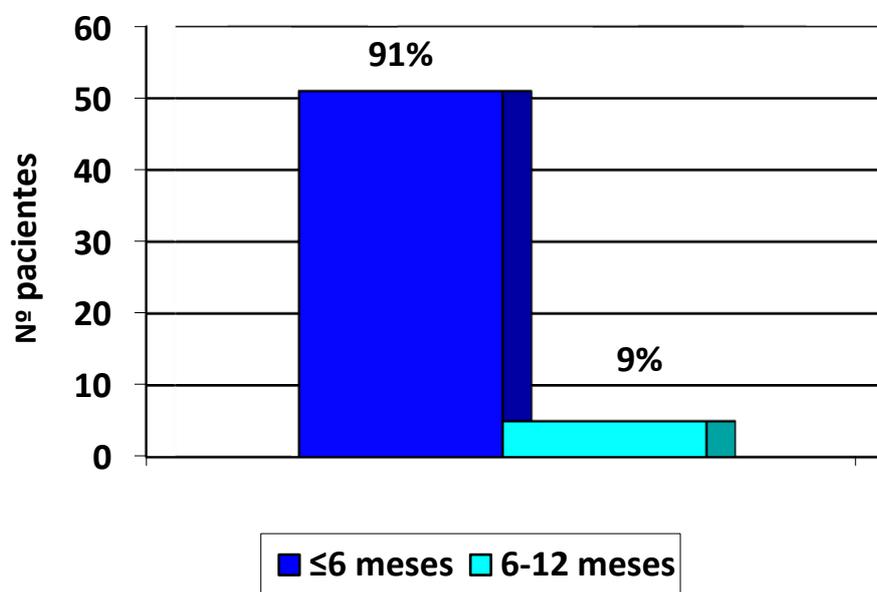


Figura 27. Tiempo de aclaramiento VPH post-conización. Análisis prospectivo

Tipo viral pre-LEEP	Tiempo de aclaramiento		Total pacientes
	≤ 6 meses	6-12 meses	
16	15	2	17
No tipificable alto riesgo	2	2	4
No tipificable	1	1	2

Tabla 12. Tiempo de aclaramiento según tipo viral pre-conización. Análisis prospectivo

4.2.8 Nuevas infecciones

De las 29 mujeres **VPH negativas pre-conización**, 21 permanecieron negativas durante todo el seguimiento (72,4%), mientras que 8 (27,6%) adquirieron una *nueva infección*, es decir, algún test VPH post-conización fue positivo.

Los tipos virales correspondientes a estas nuevas infecciones se pueden observar en la figura 28, en la que cada sector corresponde a un tipo viral y sobre ellos quedan reflejados el número absoluto de pacientes y porcentaje que representa cada tipo dentro del total.

Nuevamente destaca el tipo 16 que aparece solo en 2 casos y acompañado (infección mixta) en otro caso, es decir, un total del 37,5%.

De estas 8 *nuevas infecciones*, 5 se aclararon durante el tiempo de seguimiento (62,5%) y las otras 3 fueron persistentes (37,5%).

El aclaramiento de estas *nuevas infecciones* aquí descrito ocurrió de forma espontánea durante el seguimiento, es decir sin practicar ningún otro tratamiento o conización.

De las 3 *nuevas infecciones* persistentes, 1 fue provocada por el tipo 16, otra por el tipo 31 y la última por el tipo 52. Todas ellas ocasionaron recidivas que fueron tratadas mediante conización.

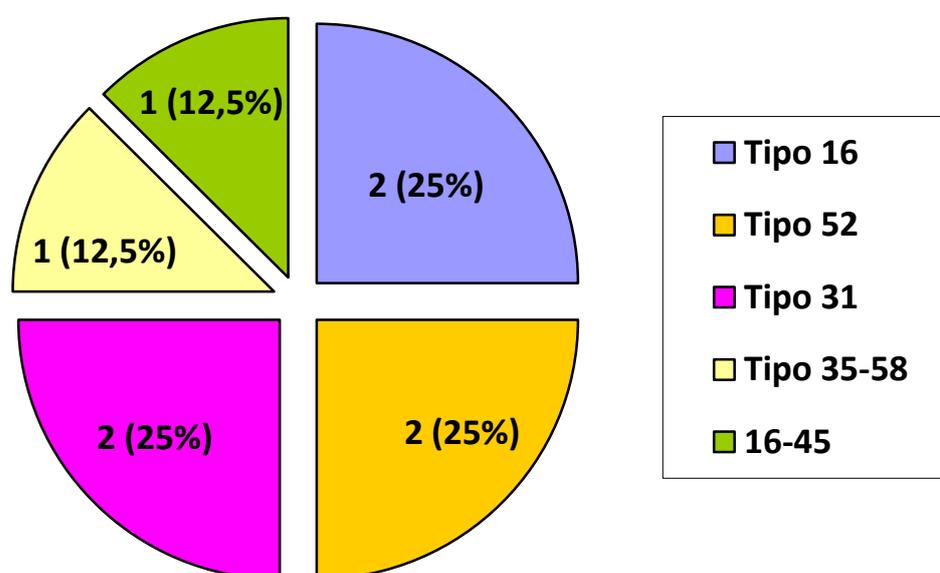


Figura 28. Tipos virales de las *nuevas infecciones*. Análisis prospectivo

4.2.9 Otras infecciones adquiridas

Hubo 12 pacientes (17,6%) que, siendo **VPH positivas pre-conización**, adquirieron otra infección VPH durante el seguimiento de un tipo viral distinto al original, independientemente de que éste se hubiese aclarado o no. A esta situación la llamaremos, al igual que en el análisis retrospectivo, *otra infección adquirida*.

El VPH inicial, pre-conización, ya se había aclarado en 8 de estas 12 pacientes antes de adquirir la otra infección; sin embargo, 4 de estas mujeres eran VPH-16 o VPH-31 persistentes y puntualmente resultaron positivas para un tipo viral distinto en alguno de los test VPH de seguimiento.

Teniendo en cuenta que una de estas mujeres tuvo 2 infecciones añadidas a lo largo de su seguimiento, el total de *otras infecciones adquiridas* es 13 y la distribución de los tipos virales se puede apreciar en la figura 29. Las más frecuentes son las producidas por el tipo 31 y otro tipo VPH no tipificable sin determinar si era de alto o bajo riesgo.

En conjunto, de estas 13 infecciones se aclararon 9 (69%) y persistieron 4 (31%). Al igual que en el apartado anterior, estos aclaramientos fueron espontáneos, sin otras conizaciones de por medio.

Las 4 *infecciones adquiridas* persistentes fueron provocadas por los tipos 16, 31, 52 y 53. Únicamente la paciente con los tipos 52 y 53 persistentes (infecciones consecutivas, no mixta) experimentó una recidiva durante el tiempo de seguimiento del estudio.

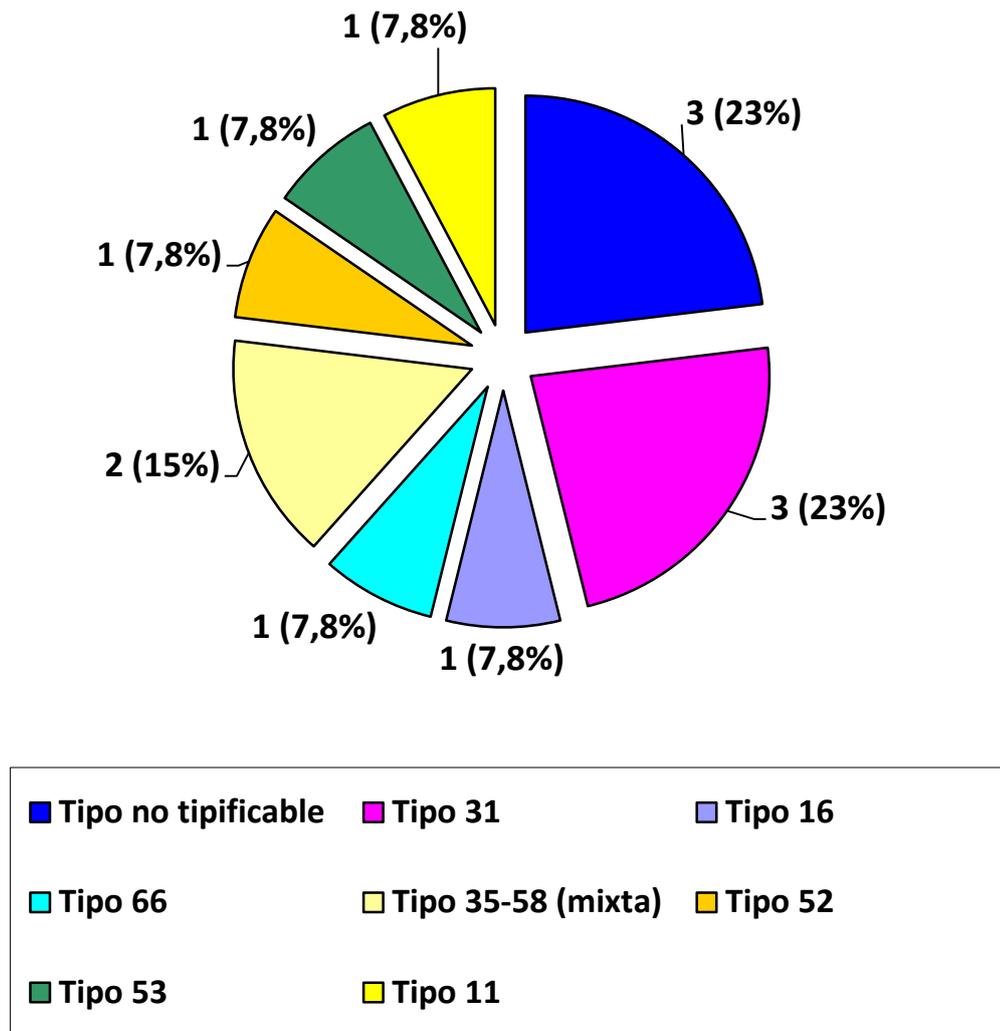


Figura 29. Tipos virales de *otras infecciones adquiridas*. Análisis prospectivo

4.2.10 Márgenes y afectación endocervical

El estudio de los márgenes en la pieza de conización reveló una afectación de los mismos en 30 de las 97 mujeres incluidas (31%), mientras que en 64 (66%) estaban libres. En 3 pacientes el informe anatómo-patológico refería que los márgenes eran difíciles de valorar.

De las 64 mujeres con márgenes libres, 3 presentaron una recidiva (4,7%), sin embargo, de las 30 pacientes con márgenes afectados recidivaron 12 (40%). Esta diferencia es estadísticamente muy significativa ($p=0,000013$).
Figura 30.

Como ya hemos comentado anteriormente, a pesar de que la afectación de los márgenes en una pieza de conización por CIN 2-3 eleva el riesgo de presentar enfermedad residual o recidivante, la inmensa mayoría de las pacientes con márgenes positivos no presentará ninguna recidiva durante su seguimiento y, por otro lado, aquellas mujeres con márgenes libres no están exentas de riesgo.

Por otro lado, en 41 de las 97 pacientes el **segmento endocervical** de la pieza quirúrgica (independientemente del estado de los márgenes) estaba afectado por la displasia (42%), en 51 mujeres estaba libre y en las 5 restantes era difícil de valorar.

De las 41 pacientes con afectación endocervical, 11 desarrollaron una recidiva (27%), mientras que de las 51 pacientes con endocérvix libre de lesión solo recidivaron 4 (8%). Esta diferencia es también estadísticamente significativa ($p=0,01$).

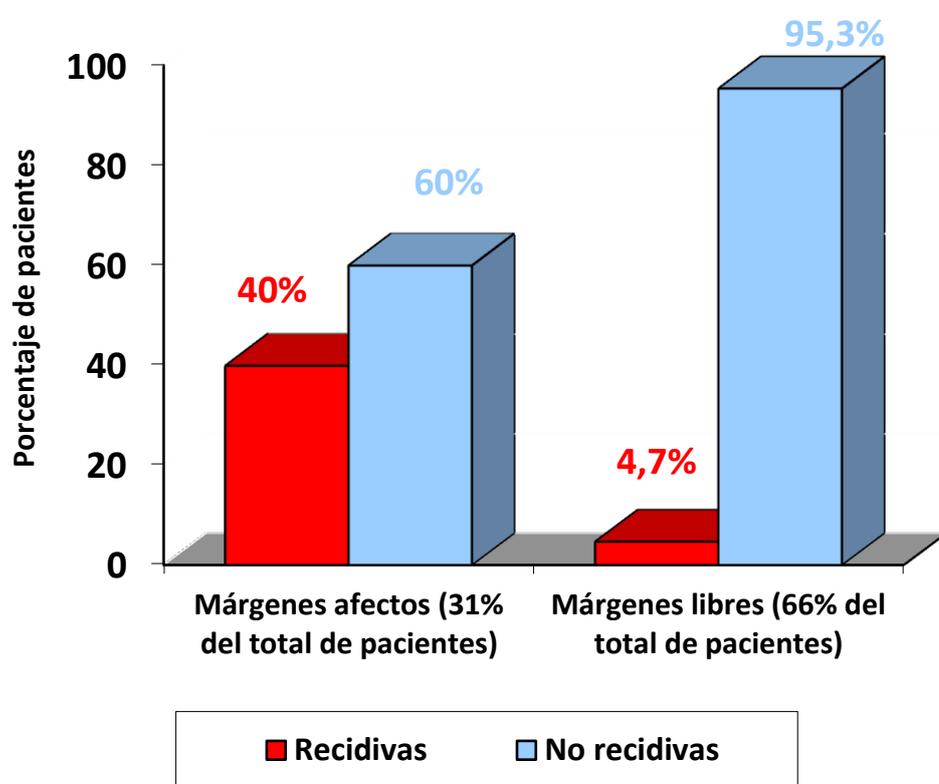


Figura 30. Tasa de recidivas en función de la afectación de los márgenes quirúrgicos. Análisis prospectivo

4.2.11 Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del test VPH, citología y doble test

1. Test VPH

Para el análisis del valor estadístico del test VPH como predictor de recidivas, hay que tener en cuenta que de las 97 mujeres incluidas en este estudio, 18 eran VPH-persistentes post-conización o, al menos, en el momento de la recidiva histológica y las 79 restantes se consideraron VPH negativas en el seguimiento a largo plazo:

- 18 pacientes VPH persistentes:
 - 12 sin aclaramiento del VPH inicial pre-conización (o al menos sin aclaramiento en el momento de la recidiva, en caso de producirse)
 - 3 *nuevas infecciones* persistentes
 - 3 *otras infecciones adquiridas* persistentes

- 79 pacientes no VPH persistentes:
 - 53 aclaramiento del VPH inicial pre-conización sin *otras infecciones adquiridas*
 - 5 *nuevas infecciones* que se aclaran
 - 21 VPH pre-conización negativo que permanece negativo

Como ya se comentó anteriormente, en este estudio se demostraron 15 recidivas durante el seguimiento, considerando como tales a las CIN 2-3 en análisis histológico.

Entre las 18 pacientes VPH-persistentes se diagnosticaron 12 de estas 15 recidivas, mientras que únicamente 3 de las 79 mujeres sin persistencia viral desarrollaron una recidiva. Estos datos suponen una sensibilidad del test VPH post-conización del 80% para predecir una recidiva y una especificidad del 92,7%. El valor predictivo positivo (VPP) de dicho test resultó del 66,6% y el valor predictivo negativo (VPN) del 96,2%.

Además de esas 15 pacientes con recidiva de CIN 2-3 en biopsia, hubo otras 16 mujeres que presentaron durante el seguimiento alguna citología alterada (\geq ASCUS) o CIN 1 en biopsia que se resolvieron espontáneamente, sin llegar a desarrollar CIN 2-3. En concreto, hubo 1 paciente con HSIL en citología sin concordancia histológica (biopsias normales) que se resolvió sin ningún tratamiento adicional, de forma espontánea.

Si considerásemos a todas ellas como recidiva, es decir, un total de 31, los falsos negativos del test VPH aumentan de forma que la sensibilidad de dicho test disminuye al 51,6% y la especificidad aumenta al 97%. Los VPP y VPN serían del 89% y 81% respectivamente. De todas formas, como ya hemos comentado en el análisis retrospectivo, estos casos podrían deberse a aclaramientos espontáneos virales previos a la normalización citológica y no a falsos negativos del test VPH.

2. Citología

Para el cálculo del poder predictivo de la citología respecto a las recidivas CIN 2-3 histológicas, consideramos de forma global todas las citologías que cada paciente tenía durante su seguimiento. Así, si una paciente tenía al menos una citología alterada (\geq ASCUS) se consideraba positiva y si todas las de su seguimiento eran normales, negativa. En el caso de las pacientes con recidiva histológica, para considerar la prueba como positiva, la/s citología/s alteradas debían ser previas o al menos simultáneas a la toma de la biopsia que revelaba CIN 2-3.

De las 15 mujeres con recidiva de este estudio, todas habían presentado previamente citología positiva, es decir, no hubo ningún falso negativo.

Estos datos suponen una sensibilidad para la citología aislada del 100% y una especificidad más baja, del 81,7%, para predecir las recidivas. Por otro lado, el VPP fue del 50% y el VPN también del 100%.

3. Doble test

Como ya explicamos previamente, llamamos *doble test* a la combinación de citología y test VPH durante el seguimiento. Cuando alguna de ambas pruebas resulta alterada en cualquier consulta de control post-tratamiento, es decir, citología \geq ASCUS o el VPH positivo, el doble test se considera positivo y si ambas pruebas son normales durante todo el seguimiento, el doble test se considera negativo.

En el caso de las pacientes con recidiva histológica, para considerar el doble test como positivo, la/s prueba/s alteradas debían ser previas o al menos simultáneas a la toma de la biopsia que revelaba CIN 2-3.

Como es lógico, al tener la citología aislada una sensibilidad y VPN del 100% como hemos visto en el apartado anterior, este doble test debe tener, al menos, esa misma capacidad predictiva.

Sin embargo, los falsos positivos aumentan de forma considerable, de forma que la especificidad y VPP descienden hasta un 66% y 35% respectivamente.

	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Test VPH	80	92,7	66,6	96,2
Citología	100	81,7	50	100
Doble test	100	66	35	100

Tabla 13. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del test VPH, la citología y el doble test como predictores de recidivas. Análisis prospectivo

4.2.12 Protocolo propuesto del doble test según el estado de los márgenes

Analizando la periodicidad en la que realizamos el doble test (6-12-18-24-30 meses), observamos que entre las 36 pacientes con **márgenes libres** cuyo seguimiento fue al menos de 2 años, hubo 24 mujeres en las que el doble test fue negativo en todas las visitas. Es decir, en ninguna de estas 24 mujeres se objetivó una alteración en la citología o en el test VPH en el control de los 18, 24 o 30 meses si las visitas de los 6 y 12 meses habían sido normales.

Por tanto, en las pacientes con márgenes libres en las que el doble test es negativo a los 6 y 12 meses, podría obviarse la visita de los 18 meses y citarlas directamente a los 24 meses.

Del resto de pacientes con márgenes libres, o bien tuvieron un seguimiento más corto en el que no se pudo evaluar su comportamiento a los 24 meses, o bien ya presentaron alguna alteración citológica o virológica en las visitas de los 6 o 12 meses. En concreto, en las 3 mujeres con márgenes libres que presentaron una recidiva histológica, ya a los 6 meses se detectó citología positiva.

Sin embargo, entre las pacientes con **márgenes afectados** es más prudente ser cautelosos y realizar todas las visitas establecidas a los 6-12-18-24 meses.

En este análisis prospectivo, una paciente con márgenes positivos cuyo doble test fue negativo a los 6 y 12 meses, presentó HSIL en el control de los 18 meses que se confirmó como CIN 2-3 en una segunda conización.

4.2.13 Concordancia citología-test VPH post-conización

Para calcular la concordancia entre la citología y el test de VPH se tuvieron en cuenta todas las visitas de cada paciente en las que se hubiese realizado simultáneamente una citología y un test VPH, esto es un total de 327 visitas. Se consideró positiva cualquier alteración citológica, es decir ASCUS o peor.

Hubo concordancia entre ambas pruebas en el 85% de las visitas, es decir, una P_0 de 0,85 en tanto por 1. Dado que la concordancia esperada simplemente por el azar en este caso sería un 75% ($P_e = 0,75$), el índice kappa entre la citología y el test VPH, calculado según la fórmula expuesta en *Material y Métodos*, es de 0,40, lo que supone una concordancia débil, casi moderada.

Solo el 4,6% de estas 327 visitas fueron discordantes con citología positiva y VPH negativo (ya comentado anteriormente que estos casos deben ser la excepción).

Los casos discordantes citología negativa-VPH positivo supusieron un 10% del total.

4.2.14 Concordancia citología-biopsia post-conización

Al igual que en el análisis retrospectivo, para comparar citología frente a biopsia consideramos positivas aquellas citologías o biopsias que

presentasen cualquier alteración (\geq ASCUS) y negativas cuando eran informadas como estrictamente normales.

Se tuvieron en cuenta todas las visitas de cada paciente en las que se hubiese realizado simultáneamente una citología y una biopsia cervical, esto es un total de 35 visitas.

Se observó concordancia entre ambas pruebas en casi el 70% de las visitas ($P_o = 0,68$), mientras que la concordancia esperada simplemente por el azar en este caso sería un 37,5% ($P_e = 0,375$). Por tanto, el índice Kappa entre la citología y la biopsia es de 0,488, es decir, una concordancia moderada.

Considerando a la biopsia como *gold standard*, de las 11 visitas discordantes, 3 fueron falsos negativos de la citología y 8 fueron falsos positivos.

4.2.15 Piezas de conización sin displasia

De las 97 conizaciones, hubo 11 piezas informadas anatómopatológicamente *sin displasia* (11,3%), 81 con CIN 2-3, 4 como CIN 1 y una con carcinoma microinfiltrante (figura 31).

Solo una de las 11 pacientes sin displasia en el cono (9%) presentó ASCUS de forma puntual en la primera citología post-tratamiento a los 6 meses que se resolvió espontáneamente. Ninguna de ellas desarrolló recidiva histológica.

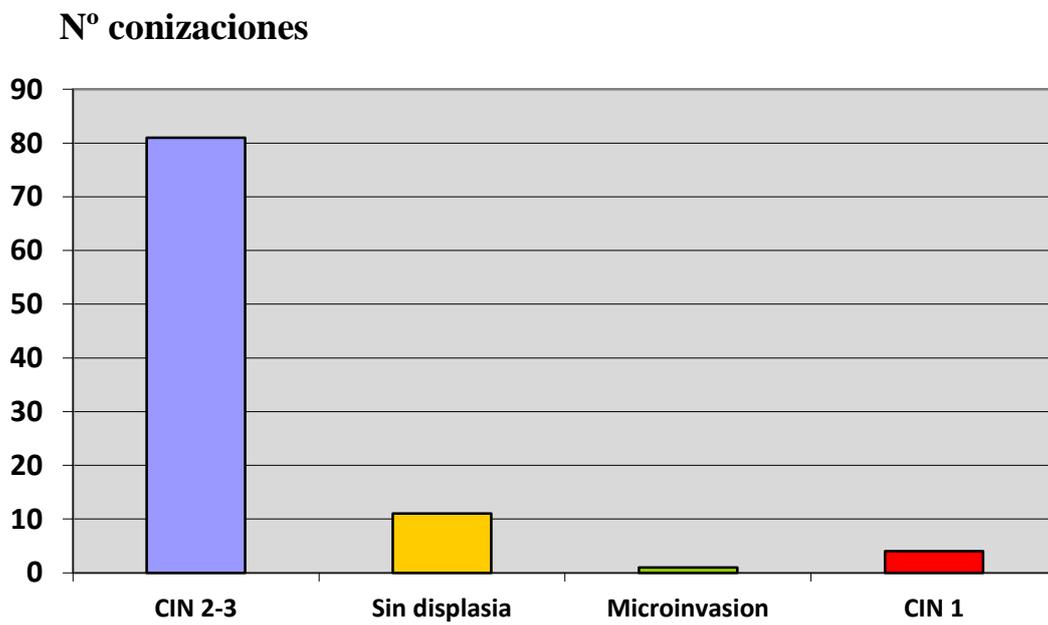


Figura 31. Resultado AP de las piezas de conización. Análisis prospectivo

4.2.16 Conizaciones sucesivas e hysterectomías

De las 97 pacientes incluidas en este estudio, 13 fueron sometidas a una segunda e incluso una tercera conización por los resultados del seguimiento (figura 32).

En 12 de estas 13 mujeres, la segunda conización se realizó por presentar CIN 2-3 en biopsia o simplemente HSIL en citología sin confirmación histológica si la paciente era mayor. En 10 de ellas se confirmó la displasia severa en el segundo cono, pero en otras 2 resultó CIN 1. De estas 2 pacientes con CIN 1 en el segundo cono, una no había realizado más revisiones al cierre de este estudio, y la otra presentó citologías normales, pero *otra infección adquirida* por VPH 66.

En la última de estas 13 pacientes, la segunda conización se realizó por presentar LSIL en citología y persistencia de VPH 52. El segundo cono reveló CIN 2-3 y el resto de su seguimiento fue normal.

El curso de todas las pacientes sometidas a varios tratamientos por anomalías en su seguimiento, se puede observar en la figura 32 junto con su *status* VPH representado en colores.

De los 3 casos más rebeldes, que precisaron una tercera conización o la displasia persistía tras el segundo tratamiento, una era VIH positivo con múltiples antecedentes de otras ETS, otra era una gran fumadora de 40 cigarrillos / día y la última era una mujer muy joven sin aparentes factores de riesgo.

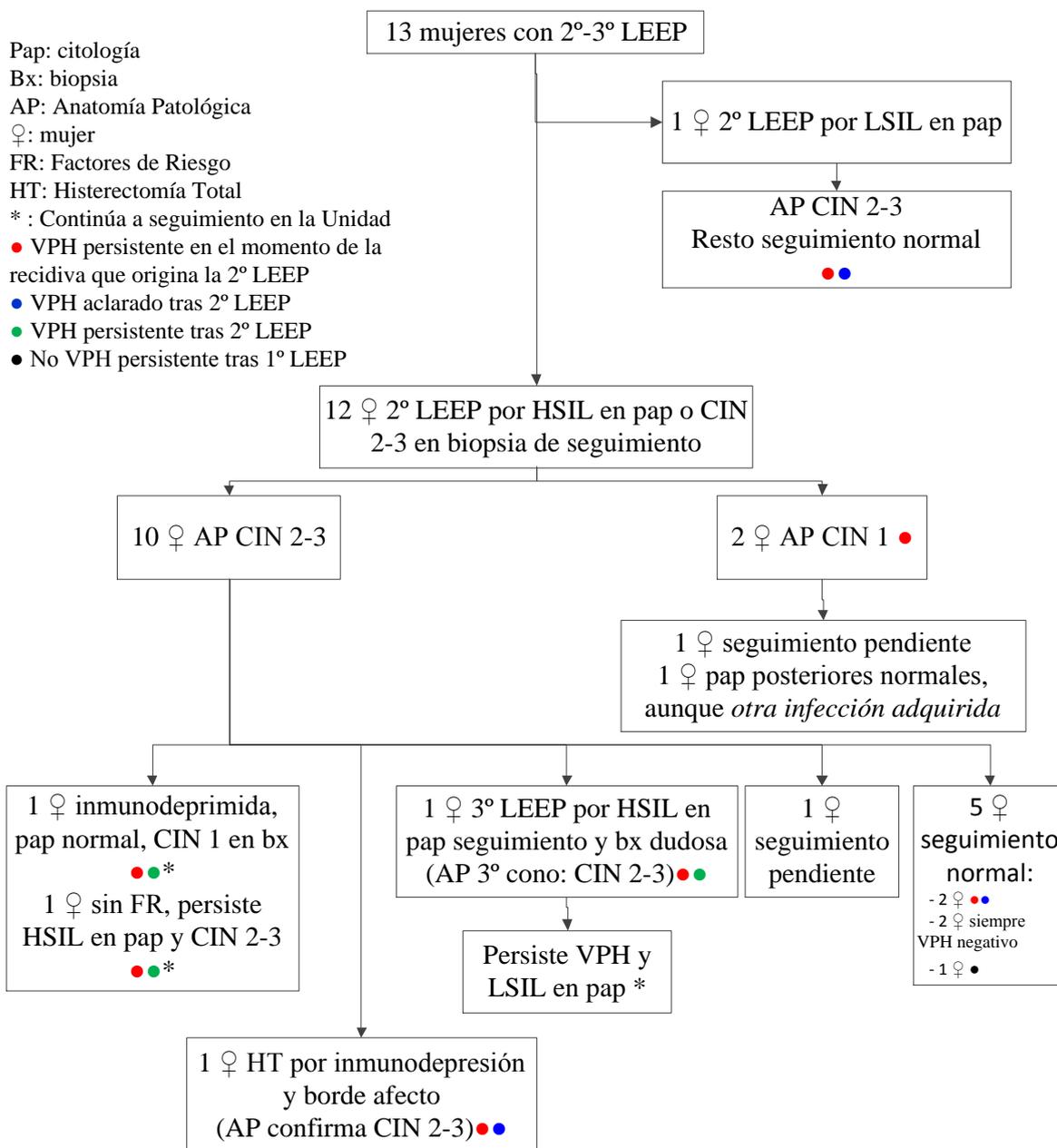


Figura 32. Mujeres con 2°-3° LEEP o histerectomía, motivos y seguimiento. Análisis prospectivo

Histerectomías

Se realizaron 3 histerectomías entre las 97 pacientes de este estudio.

- Una de ellas se practicó después de que la segunda conización revelase CIN 2-3 con márgenes afectos en una paciente inmunodeprimida y poco cumplidora. En la pieza de histerectomía se confirmó CIN 2-3. Está representada en la figura 32.
- Otra por el hallazgo de HSIL en citología y carcinoma escamoso en biopsia de la primera visita de seguimiento (sin poder determinar si infiltrante o *in situ*). También inmunodeprimida, se optó por histerectomía directamente, sin segunda conización. La pieza reveló carcinoma infiltrante estadio IB1 y su seguimiento posterior fue normal.
- La última por CIN 2-3 (sin poder descartar microinvasión) en biopsia de seguimiento y metrorragias anemizantes. El análisis final de la pieza de histerectomía confirmó CIN 3 sin microinfiltración.

5. DISCUSIÓN

5.1 Estudio anatomo-patológico previo a la conización

La citología continúa siendo hoy en día el principal método de *screening* del cáncer cervical. Idealmente, el grado de anomalía citológica debería reflejar la severidad de la lesión histológica subyacente; sin embargo, es bien conocido que un cierto número de CIN 2-3 histológicos son precedidos de anomalías citológicas mínimas (176;177). Este hecho, también conocido como discrepancia cito-histológica, es importante dado el riesgo de retrasar el diagnóstico y tratamiento de las verdaderas lesiones premalignas.

En nuestro estudio retrospectivo hubo un total de 100 pacientes con citología inicial levemente alterada (90 LSIL, 6 ASCUS y 4 con cambios VPH/células atípicas) en las que posteriormente se reveló un CIN 2-3 ya fuese en la biopsia preoperatoria o en la pieza de conización. Es decir, una tasa de discrepancia cito-histológica del 27%, más o menos acorde con lo publicado en la literatura (177;178).

En nuestro estudio prospectivo encontramos 25 pacientes con citología LSIL/ASCUS en las que histológicamente se constató CIN 2-3; esto supone una tasa de discrepancia del 26%.

Posibles explicaciones para este infra-diagnóstico citológico inicial de las CIN 2-3 histológicas son:

- El tamaño del CIN 2-3 medido en la pieza de conización: el número de células HSIL desprendidas es menor cuanto más pequeña sea la lesión histológica (178-180).

- La coexistencia de LSIL/CIN-1: los rasgos de las células LSIL exfoliadas son más fáciles de reconocer por el citólogo-patólogo distrayendo su atención de una búsqueda más exhaustiva de células con rasgos HSIL (177;178).
- La escasa calidad de los frotis ha sido otro factor destacado por varios autores (177;180). Esto puede ser debido a errores en la toma de la muestra, conservación inadecuada, tinción de calidad subóptima o contaminación del fondo del frotis.

5.2 Estudio viral previo a la conización

En el análisis retrospectivo, el test VPH previo a la conización resultó positivo en el 71,23% de las pacientes en las que dicho test estaba disponible, y en el análisis prospectivo fue positivo en el 70%.

Estas cifras son acordes con lo publicado por ciertos autores (64;96;122;151) aunque la mayoría de los estudios reflejan unas proporciones mayores, entre el 80 y 100%, de mujeres VPH-positivas pre-tratamiento (62;67-70; 72; 73; 75; 77 ; 78; 80; 83; 90; 93; 100; 101; 106; 113; 118; 120; 121; 124; 131; 133; 142; 149; 153; 154; 159; 170).

Entre las mujeres VPH-negativas pre-conización que, o bien permanecieron negativas durante todo el seguimiento o bien adquirieron una *nueva infección* que se aclaró espontáneamente en un tiempo breve, también se observaron recidivas. En concreto, 6 de las 32 recidivas (19%) del análisis retrospectivo y 2 de las 15 recidivas (13%) del análisis prospectivo ocurrieron en pacientes de estas características.

Esto es contradictorio con varios trabajos (70;90;96;101;133) que describen como factor de buen pronóstico el hecho de ser VPH-negativo previamente a la conización.

En cuanto a los **tipos virales** observados antes del tratamiento, tanto en el análisis retrospectivo como en el prospectivo, el más frecuente, y a gran distancia del resto, fue el tipo 16 (50,4% y 34% respectivamente).

El segundo tipo en frecuencia fue el 33 en el análisis retrospectivo (6,4%) y el 31 en el prospectivo (13%). El tercer lugar lo ocupaba el tipo 18 en ambos análisis (5,6% y 7% respectivamente).

Múltiples publicaciones destacan a estos mismos tipos virales entre los más frecuentemente encontrados en mujeres con CIN 2-3; no exactamente en el mismo orden, pero figurando siempre el 16 en primer lugar (64;69;73;78;80;83;94;96;100;113;133;142;154;170).

Wu D et al (133), han publicado recientemente que las infecciones preoperatorias por los tipos 16, 18, 33 o 45 se asocian con mayores tasas de recidiva/enfermedad residual en mujeres con márgenes libres de displasia. Además, las mujeres con infección múltiple previa a la conización presentan las tasas de recidivas más altas al compararlas con pacientes infectadas por un único tipo viral o pacientes VPH-negativas. De hecho, en este estudio, ninguna de las mujeres VPH negativas pre-tratamiento desarrolló recidiva, contrariamente a lo observado en nuestro análisis.

5.3 Tasa y tiempo de aparición de las recidivas

Nuestra tasa de recidivas fue del 8,6% en el análisis retrospectivo y del 15,4% en el prospectivo.

Teniendo en cuenta únicamente aquellos estudios que, al igual que nosotros, consideraron recidiva a las CIN 2-3 demostradas mediante biopsia, nuestros porcentajes se encuentran incluidos en el rango publicado que va del 3 al 17% (71;72;78;85;92;94;96;101). Sin embargo, este rango es mucho más amplio (1,5-48%) si incluimos varios artículos en los que una displasia de cualquier grado, generalmente en biopsia aunque algunos aceptan también la citología, fue considerada como recidiva (61-66;68;69;73-76;95).

El considerable aumento de recidivas en pacientes conizadas durante el año 2010 respecto al análisis retrospectivo, probablemente se deba, como comentaremos más adelante, a una mayor proporción de piezas con márgenes afectados (ya que las conizaciones a partir de ese año fueron más conservadoras) y a una media de edad de las pacientes más elevada.

En cuanto al momento de aparición de las recidivas, el 68,75% se detectaron durante el primer año de seguimiento en el análisis retrospectivo (tiempo medio de aparición de 19 meses), mientras que en el prospectivo, el 60% se detectaron ya en los primeros 6 meses (tiempo medio de aparición de 10 meses).

La mayoría de los estudios revisados, tienen un tiempo de seguimiento de 2 años. Muchos señalan que las recidivas ocurren, sobre todo, en el primer año (62;70;74;78;80;81;112) y algunos, igual que en nuestro análisis prospectivo, encuentran ya la mayoría de las recidivas en el primer control a

los 6 meses (65;73;138;140). Estos autores sugieren que estos casos tan precoces, incluso las recurrencias encontradas durante el primer año, serían una persistencia de la enfermedad más que una recidiva.

Otros destacan que el mayor pico de recidivas/persistencias ocurre durante los primeros 2 años post-conización. Esta afirmación tiene un valor limitado en aquellos estudios con un seguimiento precisamente de 2 años (72;85;91), pero cobra más fuerza en los que el seguimiento fue largo, de al menos 4 años (57;73;94;108).

Sin embargo, es importante señalar que en los pocos estudios con un seguimiento largo, se encuentran recidivas también más allá de los 2 primeros años, por lo que es fundamental un control estricto de estas pacientes. Así, Chua et al (113), describe que 9 de las 26 recurrencias objetivadas en su investigación, ocurrieron entre 2 y 8 años después del tratamiento.

En nuestro análisis retrospectivo, en el que el 76% de las mujeres se siguieron durante más de 2 años (figura 9), 8 de las 32 recidivas se desarrollaron tarde, entre 2 y 11 años post-conización.

5.4 Influencia de distintos factores epidemiológicos sobre la tasa de recidivas

1. Edad y estado menopáusico

En el análisis retrospectivo, la tasa de recidivas fue significativamente más alta en las mujeres de mayor edad (estableciendo el punto de corte tanto

en los 40 como en los 50 años) y, lógicamente, también lo fue entre las pacientes menopáusicas.

Sin embargo, en el análisis prospectivo, solo se encontraron más recidivas de forma estadísticamente significativa entre las mujeres mayores de 40 años, pero no entre las menopáusicas o mayores de 50 años ya que el 60% de las pacientes con recurrencia tenían entre 40 y 49 años.

Como ya hemos comentado anteriormente, existe gran discrepancia en la literatura en lo que se refiere a la edad como factor de riesgo de recurrencia. Mientras la mayoría de los estudios no encuentran relación entre la probabilidad de presentar una recidiva y la edad de las pacientes (62-65;67-70;72;76;79;89;90;92;101;110;114;123;124;134;142;155), varios autores señalan que las mujeres mayores de 35, 40 o 50 años tienen un riesgo aumentado, hasta 5 veces mayor, de enfermedad residual/recurrente (56;57;71;74;81;100;107;120;122;133;138;139). De todas formas, estos últimos no son capaces de aclarar por qué las mujeres mayores podrían tener una enfermedad más agresiva, señalando como posibles explicaciones una inmunidad alterada y una mayor persistencia viral post-tratamiento (71;107;120).

En cuanto al estado menopáusico, tampoco hay unanimidad entre los artículos revisados. Mientras Park et al (65) y Verguts et al (71) no relacionan la menopausia con un aumento de las recidivas, otros estudios (68;144) sí la definen como un factor de riesgo.

Lo que sí es cierto, es que el seguimiento en menopáusicas es más problemático debido a las frecuentes estenosis del canal endocervical que se producen tanto por el propio tratamiento como por la evolución natural del aparato genital en esa etapa de la vida (107).

2. Tabaco

En ninguno de nuestros análisis (retrospectivo ni prospectivo) encontramos diferencias significativas entre la tasa de recidivas de las mujeres fumadoras (de más o menos de 20 cigarros/día) y las no fumadoras.

Esto es acorde con la mayoría de la literatura consultada (65;71;72;74;81;101;114;155), aunque ciertos autores como Aclaudious (109) y Kocken (94) encontraron en sus estudios que fumar más de 10 cigarros al día incrementaba significativamente el riesgo de recurrencia.

También Sarian (120) destaca el tabaquismo como factor asociado a la persistencia del VPH post-conización, aunque no especifica si este hecho está relacionado con la tasa de recidivas.

3. Otras ETS

El antecedente de otras enfermedades de transmisión sexual no resultó un factor de riesgo de recurrencia estadísticamente significativo en nuestro análisis retrospectivo, sin embargo, sí lo fue en el prospectivo.

Son pocas las publicaciones que estudian este antecedente como posible factor predictor de recidivas. Fallani et al (101) y Verguts et al (71) no observaron ninguna relación; mientras que Brockmeyer et al (74) sí encontró significación estadística aunque solo en el análisis univariante. Se desconoce cual podría ser el mecanismo por el que otros microorganismos distintos del VPH favorecerían las recurrencias.

4. Edad de inicio de relaciones sexuales y paridad

La tasa de recidivas encontrada en nuestro estudio (análisis retrospectivo y prospectivo) fue equiparable en todos los grupos, sin diferencias significativas, independientemente de la edad de inicio de relaciones sexuales (tanto estableciendo el punto de corte a los 15 como a los 20 años) y del número de partos vaginales.

Coincidimos, por tanto, con los autores que analizaron estas variables como posibles factores de riesgo, ya que ninguno encontró significación estadística (62;63;65;68;72;79;94;101;120;122;155).

5. Inmunosupresión

Las mujeres inmunodeprimidas o con otras enfermedades médicas asociadas presentaron en nuestro estudio una tasa de recidivas similar a las mujeres sin patología añadida.

Nuestros resultados en este aspecto son concordantes con lo publicado por varios autores (65;71;101), pero, sin embargo, Coronado et al (145) y Brockmeyer et al (74) destacan el estado de inmunosupresión como factor favorecedor de persistencia-recurrencia de la displasia.

6. Método anticonceptivo

Tampoco encontramos en este estudio diferencias significativas en la tasa de recidivas según la paciente utilizase un método anticonceptivo u otro (barrera, hormonal, no barrera-no hormonal).

Los estrógenos parecen jugar un papel importante en las etapas más precoces de ciertas infecciones, ya que estimulan la inmunidad humoral y celular. Sin embargo, el hecho de que tengan un efecto protector o deletéreo depende del huésped y de la fase de la infección en la que nos encontremos. Los estrógenos aparentemente reducen la susceptibilidad a la infección primaria por HPV, pero también se ha sugerido una asociación entre los niveles hormonales (estrógenos y progesterona) y la progresión a cáncer en el contexto de una infección persistente (24;181).

Los datos publicados acerca de los efectos de la anticoncepción hormonal sobre la incidencia y persistencia de lesiones VPH-dependientes, son contradictorios, quizá por diferencias en el diseño de los estudios o por variables de confusión que generen sesgos (182;183).

Frega et al (143) llevó a cabo un importante estudio prospectivo de casos y controles (650 usuarias de ACOS frente a 670 no usuarias) en el que no encontró diferencias significativas en la tasa de recidivas de ambos grupos. Otros muchos coinciden con él y con nuestros propios resultados (71;72;74;94;114;120;155).

Varios autores concluyen que los beneficios de los ACOS superan los posibles riesgos asociados con la infección por VPH y que no deben suspenderse antes ni después de una conización por CIN 2-3 (143;184;185).

5.5 Aclaramiento VPH

De las pacientes VPH-positivo pre-conización, se objetivó un aclaramiento a lo largo del seguimiento del 90,75% en el análisis

retrospectivo y del 82,3% en el prospectivo. Esta pequeña diferencia podría deberse a que el seguimiento fue más largo en el retrospectivo.

Entre los casos VPH-persistentes, el tipo 16 fue el predominante en ambos análisis ya que representaba el 82% de los casos no aclarados en el retrospectivo y el 67% en el prospectivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aclaramiento según fuese el tipo viral previo a la conización ya que la mayoría de las infecciones se aclararon tras el tratamiento fuese cual fuese el tipaje original.

Nuestros porcentajes de aclaramiento concuerdan con lo publicado por múltiples autores que hablan de un 80-100% (63; 64; 68; 77; 80; 91; 101; 122; 124; 142; 149-154), aunque otros muchos describen cifras más bajas, entre un 26-77% (67; 69; 70; 72; 73; 78; 83; 93; 100; 106; 107; 111; 120).

Estas altas tasas de aclaramiento después del tratamiento, son explicadas por algunos gracias a la hipótesis de que la infección viral se encuentra restringida a la lesión displásica que es extirpada durante la conización (15;124;186;187). Sin embargo, el mecanismo de erradicación del virus no se comprende completamente y otros hablan de una respuesta inmune local desencadenada por la escisión del tejido displásico (110).

De todos modos, ya se conoce desde hace tiempo que el nivel de anticuerpos tipo-específicos contra el DNA viral, tanto séricos como locales en el moco cervical, descienden tras un tratamiento eficaz (188). Es decir, la mujer es nuevamente susceptible de reinfección por el mismo tipo de VPH, especialmente si su compañero sexual es portador del virus, y esta exposición permanente favorece la persistencia y recurrencia (169;170;189). Además, en

estas mujeres con antecedentes de CIN, la adquisición y susceptibilidad al virus está aumentada (190).

En cuanto a los **tipos virales** con mayor tendencia a persistir tras el tratamiento, varias publicaciones destacan, al igual que nosotros, el tipo 16 (83;97;103;142;158). En concreto, Nam K. et al (142) insiste que este tipaje viral es el único factor de riesgo independiente, de entre varios estudiados, para que el virus no se aclare después de la conización.

Sin embargo, otros investigadores discrepan en este aspecto. Así, Fen et al (106) encontraron que el tipo 33 era más persistente que el 16 y el 18, y, por otro lado, Kreimer et al (155) y Bollen et al (124) aportan varias explicaciones, como ya se ha comentado previamente, de por qué los tipos de alto riesgo tienen tasas de aclaramiento mayores que los de riesgo intermedio o bajo, aunque en un principio esta afirmación podría parecer contradictoria.

5.6 Tiempo de aclaramiento

En el análisis retrospectivo, el 72% de las pacientes que aclararon el virus lo hicieron durante el primer año de seguimiento (en concreto el 35% en los primeros 6 meses), el 3% más allá del primer año y el 25% en un momento desconocido.

En el prospectivo, el 91% lo aclararon en los primeros 6 meses y el 9% restante entre los 6 y 12 meses de seguimiento.

En ninguno de los dos análisis observamos diferencias significativas en el tiempo de aclaramiento según fuese el tipo viral original.

En general, la bibliografía refleja que las mujeres que aclaran el virus lo hacen rápidamente después de la conización. Varios estudios en los que la primera visita de seguimiento se realizaba a los 3 meses, encontraron unas tasas altas de aclaramiento ya en ese momento, entre el 54-92% (63;73;91;100;101;111;149).

Estos mismos autores y otros que realizan, como nosotros, la primera visita a los 6 meses, comentan que la mayor parte del aclaramiento se produce en esos 6 primeros meses y son muy pocas las mujeres que tardan más de 1 año en eliminar el virus (63;90;91;101;120;149;150;153;154;170).

Sin embargo, Brismar et al (64) y Costa et al (122) hablan de aclaramientos más lentos. El primero encontró en su estudio prospectivo que únicamente el 56% de sus pacientes habían eliminado el virus en el primer año de seguimiento, y explica que esto podría deberse a que el aclaramiento es un proceso inmunológico favorecido por la conización que en ocasiones se prolonga en el tiempo. Por su parte, Costa describe una hipotética tasa mensual de aclaramiento del 5,27%, es decir, al año *solo* el 63% lo habrían eliminado.

En cuanto a la rapidez del aclaramiento según fuese el tipo viral pre-conización, existen pocas referencias publicadas. En un reciente estudio prospectivo australiano con 1207 mujeres (154), se objetivó que los tipos virales que desaparecían más rápidamente (6 meses de media) eran el 16, el 18 y el 31, con una diferencia estadísticamente significativa en el caso del 16. Por el contrario, los más lentos (10 meses de media) fueron el 53 y 89, considerados de riesgo intermedio y bajo respectivamente. Estos hallazgos van en la misma línea que los de Kreimer et al (155) y Bollen et al (124), comentados en el apartado anterior.

5.7 Estado de los márgenes

En nuestro análisis retrospectivo, el 9,67% de las piezas de conización tenían los márgenes afectos mientras que en el estudio prospectivo esta tasa asciende hasta el 30%.

Ambos porcentajes se encuentran incluidos en el rango de afectación de márgenes descrito en la literatura, del 1 al 55% (61-65;67;69-71;73;75;79;81;91;93;95;100;101;117;118;120-131); sin embargo, es una diferencia llamativa que podría deberse a distintos factores:

- El aumento del riesgo de parto prematuro, con toda la morbi-mortalidad neonatal asociada que supone, ha quedado ampliamente demostrado en mujeres que habían sido sometidas a una conización (191;192). Por este motivo, las conizaciones han sido más conservadoras, con asas exclusivamente circulares y no triangulares, en la Unidad de Patología Cervical desde Enero de 2010.
- Las pacientes sometidas a conización a lo largo del año 2010 eran mayores que las del estudio retrospectivo: Sarian et al (120) encontraron en su estudio que los márgenes afectos estaban asociados mayoritariamente a mujeres de 35 años o más, y explicaban hipotéticamente que este hecho podría deberse a que las mujeres mayores, especialmente menopáusicas, tienden a presentar la unión escamo-columnar más profunda, dentro del canal endocervical, dificultando así la escisión completa de la CIN. En nuestro análisis prospectivo la media y mediana de edad fueron más altas que en el análisis retrospectivo (40 y 39 años en el prospectivo frente a 35,64 y 35 años en el retrospectivo) y, al igual que Sarian et al, encontramos

que la proporción de mujeres con márgenes afectos que a su vez eran mayores de 35 años fue alta en ambos análisis (69% en el prospectivo y 47% en el retrospectivo).

- Por último, se ha producido en los últimos años un relevo generacional entre los especialistas del Servicio de Anatomía Patológica que, probablemente por exceso de celo en la valoración del estado de los márgenes, los informen más frecuentemente como afectos.

En cuanto a la tasa de recidivas, en el análisis retrospectivo fue del 25% entre las pacientes con márgenes afectos y del 6,8% entre las de márgenes libres ($p=0,00024$). En el análisis prospectivo, estas tasas fueron del 40% y 4,7% respectivamente ($p=0,000013$). Por tanto, coincidimos con múltiples autores en que los márgenes afectos representan un factor de riesgo para desarrollar una recidiva, sin embargo, es un predictor muy inexacto ya que la gran mayoría de las mujeres con márgenes positivos nunca presentará persistencia/recidiva de la displasia y, por otro lado, un porcentaje pequeño, pero significativo de pacientes con márgenes libres sí la desarrollarán (62; 67; 70; 74; 79; 84; 90; 92; 96; 100; 101; 107; 110-112; 123; 125-127; 134-139).

Conviene subrayar que el aumento en las tasas de márgenes afectos y de recidivas en el análisis prospectivo, no ha supuesto un incremento en la tasa de cáncer infiltrante entre las pacientes de la unidad.

Por otro lado, Cruickshank et al (110) y Houfflin Debarge et al (75) especifican que los márgenes positivos predicen mejor la enfermedad residual (entendida como aquella que aparece durante el primer año de seguimiento) que una verdadera recurrencia (CIN 2-3 en biopsia tras un primer año de seguimiento completamente normal).

Para explicar las recidivas en los casos con márgenes libres, se han postulado diversas teorías:

- Difícil interpretación anatómo-patológica de los márgenes debido a los efectos de la electro-cauterización o a una incorrecta sección de la pieza (91;121;125;189).
- Repoblación de la nueva zona de transformación por células provenientes de lesiones satélites en displasias multifocales infectadas con VPH-AR persistente (81; 111; 118; 121; 122; 189; 193).

De todas formas, este concepto de multifocalidad es contradictorio respecto a los hallazgos de Tate et al (194), Nuovo et al (195), Cornelissen et al (186) y Syrjanen et al (187) que únicamente encontraron DNA viral en las células displásicas y no en el tejido sano adyacente.

- Recurrencia real o nueva enfermedad por persistir la exposición al VPH-AR (compañero sexual infectado) (169;170;189).

Por otro lado, la ausencia de recidivas en las pacientes con márgenes positivos se podría explicar por:

- La coagulación con bola de diatermia que se realiza rutinariamente sobre el cráter cervical para asegurar la hemostasia después de haber extirpado la pieza, supone una destrucción *extra* de los tejidos adyacentes al cono (125).

- Las respuestas inflamatoria e inmune que ocurren en el lecho quirúrgico durante el proceso de cicatrización por el tratamiento local (152;159;189;196;196;196).
- Jain et al (159) y Houfflin Debarge et al (75) concluyen en sus estudios prospectivos que, aunque los márgenes sean positivos, si el test VPH post-tratamiento es negativo el riesgo de lesión residual es despreciable.

5.8 Afectación endocervical

En nuestro análisis retrospectivo, el 25% de las pacientes tenían afectación endocervical. La tasa de recidivas en este grupo fue similar a la de las mujeres con el endocérvix libre (10,75% vs. 8%).

Sin embargo, en nuestro análisis prospectivo, el 42% tenían afectación endocervical y estas pacientes sufrieron una tasa de recurrencias significativamente más alta que el resto de las mujeres del estudio (27% vs. 8%).

De forma parecida a lo que ocurría con la afectación de los márgenes comentado en el apartado anterior, de nuevo nos encontramos ante una tasa de afectación endocervical considerablemente más alta entre las pacientes conizadas durante el año 2010. Este incremento probablemente se deba, principalmente, a que durante ese año prácticamente todas las conizaciones se realizaron con 2 asas circulares según la técnica del “sombrero de ala” de forma que el patólogo disponía de una pieza específicamente rotulada como *endocérvix*.

Sin embargo, durante los años del análisis retrospectivo, las conizaciones se practicaban tanto con esta técnica como con asas triangulares, remitiendo en este último caso al patólogo una única pieza cervical en la que quizá fuese más difícil distinguir exo y endocérvix.

De cualquier forma, la mayoría de los autores no encuentran relación entre la extensión glandular y la probabilidad de presentar una recidiva (65;68;120;140). Solo Paraskevaidis et al (81) en su estudio de casos y controles en el que todas las pacientes tenían los márgenes libres, objetivó que la afectación glandular era un factor de riesgo independiente para la recurrencia de la displasia.

5.9 Valor predictivo del test VPH, citología y doble test

Hemos obtenido en nuestro estudio una sensibilidad y un valor predictivo negativo altos para la citología a la hora de detectar recidivas. Especialmente en el análisis prospectivo donde ambos valores fueron del 100%, es decir, sin ningún falso negativo (tablas 7 y 13).

Del mismo modo el test VPH obtuvo una buena sensibilidad, aunque no tan alta como la de la citología, y un alto VPN, del 96% tanto en el análisis retrospectivo como en el prospectivo.

El doble test resultó, como es lógico, el mejor para predecir recurrencias aunque con mayor tasa de falsos negativos, por lo que su especificidad y valor predictivo positivo fueron los más bajos.

Nuestras cifras de sensibilidad de la **citología** se encuentran entre las más altas de las descritas en la bibliografía que oscilan entre el 20 y el 100% (62;78;100;110;119;121;131;149;159).

Sin embargo, la sensibilidad que obtuvimos para el **test VPH** (69% y 80% en análisis retrospectivo y prospectivo respectivamente) no fue tan elevada como la referida por varios autores que la sitúan entre un 83 y un 100% (62;65;67;71;72;75;78;82;97;100;118;119;131;149;162;197). De todas formas, Acladius et al (109) encontraron en su importante estudio de casos y controles ya comentado anteriormente, que a los 6 meses de la conización el test VPH tenía una sensibilidad baja, del 47%, para detectar precozmente las recurrencias.

Por su parte, Leguevaque et al (90) relacionaron el valor del test VPH con el estado de los márgenes. Concluyeron que dicha prueba realizada a los 6 meses del tratamiento, es sobre todo útil cuando el margen endocervical es positivo ya que en estos casos alcanza una sensibilidad del 93%, VPP del 97%, especificidad del 100% y VPN del 97%. Estas cifras, sobre todo el VPP, son menores cuando el margen endocervical está libre. A raíz de estos hallazgos, proponen un protocolo de seguimiento interesante que comentaremos más adelante.

Todos estos estudios aquí referidos no son homogéneos en el sentido de que algunos emplean la técnica de la PCR para la detección del ADN viral y otros utilizan la captura de híbridos. De todas formas, ya hemos señalado previamente que Söderland-Strand et al (147) y Kulmala et al (148) concluyeron en sus investigaciones comparativas entre ambas técnicas que los dos métodos son prácticamente equivalentes.

Por otro lado, la sensibilidad del test VPH encontrada en nuestro estudio fue menor que la de la citología, y esto no concuerda con lo publicado por varios autores que comparan ambas pruebas y señalan justo lo contrario (69-71;78;96;97;112;113;131;159).

Probablemente, en el futuro, mejore el valor predictivo del test VPH en nuestro hospital gracias a la técnica validada de Cobas 4800.

En cuanto al **doble test**, nuestro análisis retrospectivo coincide con la mayoría de los estudios al encontrar que el hecho de combinar la citología y el test VPH aumenta la sensibilidad y el VPN de cada uno por separado, llegando casi al 100%, aunque disminuye la especificidad. De esta forma se selecciona un grupo de pacientes con un riesgo mínimo de enfermedad persistente/recurrente y que podrían devolverse al cribado habitual más precozmente que al resto (69; 70; 72; 90; 91; 101; 109; 115; 116; 118; 119; 122; 131; 147; 149; 197; 198).

Sin embargo, en nuestro análisis prospectivo la citología sola ya tiene el 100% de sensibilidad y VPN por lo que el añadirle el test VPH únicamente supone un incremento en los falsos positivos.

Otros autores (78;117;168) tampoco encuentran una gran ventaja con el doble test, pero en estos casos es la citología la que no añade sensibilidad al test VPH que ya es excelente de forma aislada.

Igualmente, Sarian et al (85) y Bais et al (199) señalaron que el doble test tenía una sensibilidad muy parecida a la de cada prueba por separado, aunque, curiosamente, en estos 2 estudios la especificidad y VPP aumentaban al combinar ambos test.

Por último, Aschkenazi-Steinberg et al (171) también critican el doble test pues en su estudio (n=61), tanto la citología como el test VPH tenían la misma efectividad por separado y al combinarlos únicamente aumentaba significativamente el número de pacientes derivadas a colposcopia, pero sin aumentar las recidivas detectadas.

5.10 Concordancia citología-test VPH y citología-biopsia

Estas diferencias en la sensibilidad de la **citología y el test VPH** están claramente relacionadas con la falta de concordancia que observamos entre estas dos pruebas. Como ya hemos comentado, tanto en nuestro análisis retrospectivo como en el prospectivo, los resultados citológicos y virológicos coincidían de una forma débil (concordancia del 82% y 85% con kappa de 0,31 y 0,40 respectivamente).

Nuestros valores kappa se asemejan mucho al obtenido por Aschkenazi-Steinberg et al (171) que fue de 0,34 a lo largo de 120 visitas, pero quedan alejados del 0,59 que publicaron Zuna et al (200) en 266 visitas.

Matthews-Greer et al (201) publicaron un 78% de coincidencias entre ambas pruebas realizadas simultáneamente a 265 pacientes, que ascendía a un 88% tras la revisión al microscopio de las muestras citológicas no concordantes (kappa no calculado).

Por otro lado, ya hemos comentado previamente que como la infección VPH precede a la displasia, se esperan resultados discordantes en los que el VPH sea positivo aunque la citología sea normal, pero lo contrario (citología

positiva con VPH negativo) debería ser la excepción (201). Pues bien, Zuna et al (200) a pesar de publicar un buen índice kappa, obtuvo una proporción importante de resultados discordantes citología positiva-VPH negativo (17%), mucho más alta que las nuestras (5,8% y 4,6% en análisis retrospectivo y prospectivo respectivamente).

De todas formas, algunos incluso critican los casos con citología negativa-VPH-AR positivo y aconsejan revisar esos frotis para detectar posibles falsos negativos, más frecuentes, sobre todo, en lesiones glandulares (202;203).

En nuestro estudio, este tipo de casos discordantes (citología negativa-VPH positivo) fueron, lógicamente, más frecuentes que los opuestos (11,7% y 10% en el análisis retrospectivo y prospectivo respectivamente), pero no se revisaron las citologías para calcular exactamente los falsos negativos.

En cuanto a la **citología comparada con la biopsia**, la concordancia alcanzada en nuestro estudio fue moderada (80% y 68% con kappa de 0,53 y 0,49 en análisis retrospectivo y prospectivo respectivamente).

Izadi-Mood et al (204) y Joste et al (205) publican mejores resultados que nosotros, teniendo en cuenta, además, que las biopsias no fueron tomadas simultáneamente a las citologías, sino dentro de los 2 meses siguientes al frotis. Encontraron únicamente un 9% y 11% de discrepancias en sus respectivos estudios al comparar 670 y 1.582 pares de citología-biopsia (kappa no calculado).

Los falsos negativos de las citologías pueden explicarse por los razonamientos del infra-diagnóstico ya expuestos en el apartado 5.1.

Entre los falsos positivos citológicos, la mayoría fueron ASCUS y ya es bien conocido que no siempre se relaciona con infección VPH, sino que también puede deberse a cervicitis por otros gérmenes o inespecífica, atrofia, artefactos o cambios reactivos (206).

5.11 Protocolos propuestos

Ya se han explicado anteriormente los protocolos actuales de seguimiento post-conización de la SEGO (141) y la ASCCP (6), ambos del año 2006.

En general, se acepta que el primer control no debe realizarse antes de los 6 primeros meses para dar tiempo al aclaramiento viral y, por otro lado, para evitar los efectos de la cicatrización que dificultan la interpretación de citologías demasiado precoces. De esta forma se mejora la sensibilidad a la hora de diferenciar a las mujeres de mayor riesgo (93;101).

Jeong et al (62) en su reciente estudio prospectivo, sugiere doble test cada 6 meses durante 2 años y si éste es normal en los primeros 6 meses, podrían incluso ampliarse los intervalos de los controles aunque no concreta tiempos. Después, devolvería las mujeres al cribado habitual.

Prato et al (67) realizaría una primera visita a los 3 meses post-tratamiento con citología, colposcopia y test VPH. Según el resultado de este test VPH y el estado de los márgenes, define distintas categorías de riesgo que tendrían un seguimiento distinto para optimizar la relación coste/efectividad:

- Test VPH positivo y márgenes afectados (riesgo alto): Siguiendo control en otros 3 meses
- Test VPH positivo y márgenes libres (riesgo intermedio): Siguiendo control en 9 meses.
- Test VPH negativo (riesgo bajo): Siguiendo control en 18 meses.

En cualquier caso, insiste en que el seguimiento cuidadoso debe prolongarse durante al menos 10 años basándose en el estudio de Soutter et al (54), en el que se demostró que estas mujeres tienen un riesgo de desarrollar cáncer invasivo durante los 8 años siguientes a la conización 5 veces mayor que la población general.

En el estudio prospectivo de casos y controles de Zielinski et al del 2003 (149) y en su propia revisión bibliográfica de un año más tarde (160), concluyen que si el doble test es negativo en la primera visita a los 6 meses, el riesgo de recidiva es tan bajo, que podría obviarse el control de los 12 meses y no repetirlo hasta los 24 meses. Esto supondría una reducción de los costes y de las inconveniencias originadas a las mujeres con revisiones innecesarias. Sin embargo, si la citología, el test VPH o ambos son positivos a los 6 meses, el riesgo de recurrencia es mayor por lo que recomiendan nuevas visitas a los 12 y 24 meses hasta que el doble test sea negativo.

Otros autores como Nobbenhuis et al (78) y Bais et al (199) coinciden exactamente con Zielinski, devolviendo a la mujer de bajo riesgo al cribado habitual solo cuando el doble test es negativo en ambas citas de los 6 y 24 meses.

También Kocken et al (94;119), en sus recientes estudios holandeses, confirman que es posible obviar la cita de los 12 meses, si el doble test ha

sido negativo en la primera visita, y volver a control a los 2 años post-conización.

Explican que la guía clínica actual de los Países Bajos recomienda citología a los 6-12-24 meses y después citología anual si es necesario hasta que 3 consecutivas resulten negativas; entonces se deriva al cribado que consiste en citología cada 5 años.

Basándose en sus resultados, afirman que si el doble test es negativo a los 6 meses, el riesgo de recidiva en los siguientes 5 años es similar al que tendría una mujer con las citologías de los 6-12-24 meses negativas gracias al elevado VPN del test VPH.

Insisten, en contra de la ASCCP, en que es conveniente el doble test y no el test VPH aislado ya que no estamos hablando de un contexto de *screening*, sino del seguimiento de una enfermedad potencialmente letal.

Otro estudio holandés (198) señala algo similar, aunque tiene una metodología distinta al resto. Se desarrolló un modelo informático *Markov*, basado firmemente en observaciones clínicas, que comparó el seguimiento actual de Países Bajos con diferentes protocolos que incluían test VPH. Sugieren que lo más eficiente sería realizar un test VPH a los 6 meses y doble test a los 24 meses. Insisten en que la citología incluso a los 6 meses continúa siendo difícil de interpretar por el efecto de la cicatrización y por esto abogan por el test VPH aislado en ese momento. Consideran, al igual que Zielinski (149;160), que la reducción de los costes y de las molestias innecesarias a las pacientes son temas importantes a tener en cuenta.

Sin embargo, Cruickshank et al (110) considera que es suficiente un doble test a los 6 y 12 meses, y solo indica un control más exhaustivo ante una infección por VPH persistente. Dicho planteamiento es muy similar al

protocolo actual de la ASCCP (6), aunque éste no aboga por el doble test, sino por citología o test VPH a los 6 y 12 meses.

El trabajo americano de Skinner et al (138) defiende también un seguimiento abreviado, con citología a los 6 y 12 meses y posteriormente el cribado anual. Únicamente hablan de añadir el test VPH en los casos dudosos. Insisten en que este esquema debería ser suficientemente seguro dado que la mayoría de las recurrencias ya son detectadas en el primer control y que la progresión de CIN 2 a carcinoma in situ o invasivo es lenta, entre 41 a 80 meses dependiendo del grupo de edad (207).

Añaden, además, que con las restricciones en el gasto sanitario cada vez cobra más importancia el desarrollo de un protocolo de seguimiento coste-efectivo. Éste favorecería tanto a los profesionales como a las usuarias, en términos de menos horas de abstinencia laboral-familiar y menor ansiedad, sin comprometer la capacidad de detectar y tratar las recurrencias.

Kitchener et al (117) realizaron recientemente en Reino Unido un importante estudio prospectivo con 917 pacientes. Concluyen que si el doble test es negativo a los 6 meses, es seguro devolver a la mujer a un *screening* en el que la citología se repita cada 3 o 5 años y no anualmente como recomienda la guía nacional inglesa actual (174). Comentan que el valor añadido de la citología al test VPH es dudoso porque en su estudio, de las 39 mujeres VPH negativo-citología positiva a los 6 meses, solo 2 desarrollaron recidiva CIN 2-3 en los siguientes 2 años y es muy improbable que estos casos no se hubiesen detectado en el cribado.

Si el doble test fuese positivo a los 6 meses, se indicaría una colposcopia y si ésta es negativa, un nuevo control al año identificaría la mayoría de las persistencias/recurrencias.

De igual forma, Riethmuller et al (91) también defienden un protocolo muy breve en el que se realice el doble test a los 3-6 meses y si es normal ya se podría incluir a la mujer en un cribado citológico cada 3 años. Comentan que sería opcional otro doble test a los 18 meses antes de pasar al *screening*, dado que estas pacientes son una población especial con un riesgo elevado para una nueva infección-persistencia por el mismo u otro tipo de VPH.

Ante esta multitud de publicaciones, cada una con diferentes poblaciones de estudio y protocolos de seguimiento, son varios los que aconsejan prudencia: resaltan la necesidad de estudios prospectivos más grandes y a largo plazo, antes de implementar un seguimiento más relajado en las pacientes VPH negativo (85;154;171).

Nosotros, basándonos en los resultados de **nuestro análisis prospectivo**, planteamos que en las pacientes con márgenes libres y doble test negativo a los 6 y 12 meses, podría obviarse la visita de los 18 meses y citarlas directamente a los 24 meses.

En **nuestro análisis retrospectivo**, las citologías y test VPH no se realizaban en unos intervalos fijos, de forma que no podemos concluir lo mismo que en el prospectivo.

Sin embargo, cabe destacar que los 3 casos con recidiva en este análisis, en los que el doble test fue falsamente negativo, se detectaron gracias a la biopsias realizadas por la colposcopia rutinaria en nuestra Unidad. Por tanto, defendemos la práctica habitual de esta técnica en las visitas de seguimiento de estas pacientes, en contra de lo que publican algunos autores (197).

Por otro lado, este análisis tiene un tamaño muestral importante (n=372) y un seguimiento largo, de hasta 15 años. Así, hemos podido comprobar que 8 de las 32 recidivas (25%) ocurrieron más allá de 2 años post-tratamiento, en concreto hubo 3 a largo plazo (5, 7 y 11 años).

Es decir, coincidimos con varios autores (55-57;169) en que el riesgo de estas pacientes persiste durante largo tiempo y, por tanto, es conveniente no interrumpir el cribado a los 65 años, como en la población general, y prolongarlo durante al menos 20 o 25 años después de la conización, sobre todo si la mujer tenía más de 35-40 años en el momento del tratamiento.

Además, consideramos que la evidencia disponible no es suficientemente consistente como para abreviar el seguimiento en la Unidad de Patología Cervical por debajo de los 2 años.

La Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC) mantiene, de momento, su protocolo de seguimiento publicado en 2006 (141) en el que, tras un doble test con colposcopia a los 3-6 meses, si es negativo, le siguen 2 citologías anuales y después se devuelve al cribado, sin especificar que haya que prolongarlo en estas pacientes. Actualmente, el cribado en España consiste en citología cada 3 años o doble test cada 5 años, si son negativos.

Sin embargo, ya hemos comentado que la ASCCP, aunque remite más precozmente a las pacientes al *screening* (al año si la citología o test VPH a los 6 y 12 meses son negativos), insiste en que éste debe realizarse durante al menos 20 años. Además, en EEUU el cribado consiste en citología anual.

5.12 Piezas de conización sin displasia

En el análisis retrospectivo, de las 372 conizaciones, hubo 59 piezas informadas anatómo-patológicamente *sin displasia* (15,86%).

En el análisis prospectivo, la proporción fue del 11,34% (11 piezas *sin displasia* entre 97 conizaciones).

Estas cifras son acordes con las publicadas por otros autores, que van desde un 2,4% hasta casi un 18% (92;95;122;208;209).

Existen varias razones para explicar la ausencia de displasia en la pieza de una conización (92;208):

- En primer lugar, que la lesión CIN 2-3 sea focal y pequeña y, por tanto, sea extirpada completamente en la biopsia previa a la conización.
- Que el CIN 2-3 restante tras la biopsia con pinza de sacabocados sea pequeño y regrese espontáneamente.
- Que el CIN 2-3 no haya sido extirpado mediante la conización por encontrarse, por ejemplo, más alto en el canal endocervical y no haya sido alcanzado con el asa de diatermia. Este grupo pueden presentar enfermedad residual/persistente durante el seguimiento.
- Artefactos en la pieza de conización, sobre todo una extensa superficie cauterizada, dificultan la interpretación del patólogo.

- Por último, es posible que el foco displásico en el cono sea pequeño y no quede representado en ninguno de los cortes histológicos que analizará el patólogo.

Livasy et al (208) encontraron en su estudio que las pacientes con pieza de conización negativa, sin displasia, presentaban una tasa de recurrencias del 24%, muy similar al 27% del grupo con piezas de conización positivas.

En nuestro análisis retrospectivo, de las 59 pacientes cuya pieza fue informada como normal, 8 (13,5%) tuvieron alguna anomalía en el seguimiento: 6 de ellas presentaron citología alterada o CIN 1 en biopsia de forma puntual y las otras 2 desarrollaron una recidiva CIN 2-3 en biopsia.

En nuestro análisis prospectivo, solo una de las 11 pacientes sin displasia en el cono (9%) presentó ASCUS de forma puntual en la primera citología post-tratamiento a los 6 meses que se resolvió espontáneamente. Ninguna de ellas desarrolló recidiva histológica.

Por tanto, es conveniente que las mujeres con cono negativo, sean sometidas al mismo seguimiento que el resto de las pacientes conizadas ya que no están exentas de riesgo de presentar enfermedad residual/recidiva.

6.CONCLUSIONES

1. La **tasa de recidivas** obtenida (CIN 2-3 en biopsia) fue del 8,6% en el análisis retrospectivo y 15,4% en el prospectivo.
2. Se encontraron **márgenes afectados** en la pieza de conización en el 9,7% de las pacientes del análisis retrospectivo y en el 31% del prospectivo.
 - La principal explicación para este incremento, así como el aumento de las recidivas expuestas en el punto anterior, son las conizaciones más conservadoras a partir del año 2010.
 - Los márgenes afectados son un factor de riesgo de recidiva (diferencia estadísticamente muy significativa), sin embargo, la gran mayoría de las mujeres con márgenes positivos nunca presentará recurrencia y, un porcentaje pequeño, pero significativo de pacientes con márgenes libres sí la desarrollarán.
3. La **afectación endocervical** no supuso diferencias estadísticamente significativas en las tasa de recidivas en el análisis retrospectivo, pero sí en el prospectivo.
4. El **tiempo medio de aparición** de dichas **recidivas** fue de 19 meses en el análisis retrospectivo y de 10 meses en el prospectivo.
5. Las mujeres mayores de 40 años desarrollaron más recidivas de forma estadísticamente significativa.
 - Las menopáusicas también, pero solo en el análisis retrospectivo.
 - El antecedente de otras ETS resultó factor de riesgo solo en el prospectivo.

- No se encontró relación entre el resto de **variables epidemiológicas** estudiadas y la probabilidad de sufrir recurrencia.
6. El 70-71% de las pacientes eran VPH-positivas previamente a la conización.
El **tipo 16** era el más frecuente, con gran diferencia respecto al resto.
7. La tasa de **aclaramiento** viral post-tratamiento fue del 91% en el análisis retrospectivo y 82% en el prospectivo.
- Aunque el tipo 16 era el más frecuente entre los casos VPH-persistentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aclaramiento según fuese el tipo viral original.
8. El aclaramiento ocurría, sobre todo, entre los 6 y 12 meses post-conización (72% en el primer año en el análisis retrospectivo y 91% en los primeros 6 meses en el prospectivo).
- No hubo diferencias estadísticamente significativas en el **tiempo de aclaramiento** según fuese el tipo de VPH.
9. Entre las pacientes VPH-negativas antes de la conización, el 17% y 27% (análisis retrospectivo y prospectivo respectivamente) adquirieron una **nueva infección** por VPH durante el seguimiento.
- El tipo viral más frecuente fue nuevamente el 16
 - Aproximadamente el 60% de estas infecciones fueron aclaradas y todas las que persistieron originaron una recidiva.

- La susceptibilidad que estas mujeres conizadas ya han demostrado para contraer una infección por VPH y una displasia, permanece en el tiempo y las convierte en un grupo de alto riesgo.
10. La **citología** aislada presenta mejor **sensibilidad y VPN** que el **test VPH** aislado a la hora de detectar recurrencias.
- En el análisis retrospectivo el **doble test** mejora la sensibilidad de ambas pruebas por separado, pero el VPN es prácticamente igual.
 - En el prospectivo el doble test no añade nada a la citología porque ésta ya presenta una sensibilidad y VPN del 100%.
 - En el seguimiento de una población de riesgo como ésta, priman la sensibilidad y el VPN sobre la especificidad y el VPP.
11. La **concordancia** encontrada entre las **citologías y test VPH** de seguimiento post-conización fue débil.
- La concordancia entre las **citologías y las biopsias** guiadas por colposcopia fue moderada.
12. La **ausencia de displasia** en la pieza de conización (16% en el análisis retrospectivo y 11% en el prospectivo) no exime del riesgo de desarrollar una recidiva, por lo que estas pacientes deben cumplir el mismo seguimiento que el resto.
13. Los casos de recidivas más rebeldes, que precisan 3 conizaciones o histerectomía, no siempre ocurren en mujeres con factores de riesgo definidos.

14. Planteamos un **seguimiento en la Unidad de Patología Cervical** durante los 2 primeros años post-conización, como mínimo, con el siguiente esquema:

- Doble test y colposcopia a los 6-12-18-24 meses.
- En las pacientes con márgenes libres y doble test negativo a los 6 y 12 meses, podría obviarse la visita de los 18 meses y citarlas directamente a los 24 meses.
- Una vez reincorporadas al cribado habitual, éste debe prolongarse durante al menos 20 años post-tratamiento, sobre todo en las pacientes que tuviesen más de 35-40 años en el momento de la conización.

7. ANEXOS

ANEXO 1: Clasificación citológica, Bethesda 2001

Idoneidad de la muestra

Satisfactoria para evaluación (señalar la presencia o ausencia de células endocervicales o metaplásicas)

Insatisfactoria para valoración...(especificar el motivo)

- Muestra rechazada o no procesada...(especificar el motivo)
- Muestra procesada y examinada, pero insatisfactoria para valoración de anomalías epiteliales debido a...(especificar el motivo)

Categorización general (opcional)

Negativa para lesión intraepitelial o malignidad

Células epiteliales anormales

Otras

Interpretación / resultado

Negativa para lesión intraepitelial o malignidad

Organismos

- *Trichomonas vaginalis*
- Hongos morfológicamente compatibles con *Candida*
- Flora sugestiva de vaginosis bacteriana
- Bacterias morfológicamente compatibles con *Actinomyces*
- Cambios celulares compatibles con virus del herpes simple

Otros hallazgos no neoplásicos (opcional)

- Cambios celulares reactivos asociados a inflamación (incluye reparación típica), radiación o dispositivo intrauterino
- Células glandulares post-histerectomía
- Atrofia

Células epiteliales anormales

Células escamosas

- Células escamosas atípicas (ASC)
de significado indeterminado (ASC-US);
no puede excluir lesión escamosa intraepitelial de alto grado (ASC-H)
- Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL)
Incluye: cambios por virus del papiloma humano / displasia leve /
neoplasia cervical intraepitelial (CIN) 1
- Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL)
Incluye: cambios por displasia moderada y grave, carcinoma in situ;
CIN2 y CIN3
- Carcinoma escamoso

Células glandulares

- Células glandulares atípicas (AGC) (especificar endocervical,
endometrial o sin especificar)
- Células glandulares atípicas, posible neoplasia (AGC-N) (especificar
endocervical o sin especificar)
- Adenocarcinoma in situ endocervical (AIS)
- Adenocarcinoma
- *Otros*

Células endometriales normales en mujer \leq 40 años

LECTURA AUTOMATIZADA Y TÉCNICAS AUXILIARES (Incluir si precisa)

NOTAS DIDÁCTICAS Y SUGERENCIAS (opcional)

ANEXO 2: Tinción de Papanicolaou en HUCA

- Alcohol 70°	2 minutos
- Lavado con agua	2 minutos
- Hematoxilina de base acuosa	30 segundos
- Lavado con agua	10 minutos
- Agua ácida	1 minuto
- lavado con agua	5 minutos
- Alcohol 50°	1 minuto
- Alcohol 80°	1 minuto
- Alcohol 96°	2 minutos
- Reactivo Orange G	4 minutos
- Alcohol 96°	2 pases de 3 minutos
- Reactivo verde (EA-50)	6 minutos
- Alcohol 96°	2 pases de 3 minutos
- Alcohol absoluto	2 pases de 1 minuto
- Xilol	30 segundos
- Xilol	-

ANEXO 3: Criterios citológicos

➤ ASCUS

- Agrandamiento del tamaño nuclear, 2.5 o 3 veces el del núcleo de una célula intermedia normal, con ligero aumento de la relación núcleo/citoplasma.
- Variación en forma y tamaño nuclear; ocasional binucleación.
- Ligera hipercromasia, aunque con cromatina homogénea.
- Mínima irregularidad del contorno nuclear.

Como su diferenciación del LSIL es muy tenue, el término ASCUS se empleará:

- Cuando los "cambios inflamatorios o reparativos" sean muy marcados y no se puedan dar estos diagnósticos con seguridad.
- Si el número de células atípicas sea muy escaso.
- Cuando las células atípicas se vean en un material con fijación defectuosa.
- En presencia de un efecto citopático sugestivo pero no conclusivo de infección por el VPH (la coilocitosis clara debe ser considerada como LSIL).
- Presencia de células metaplásicas atípicas. En este caso los núcleos son 1,5 o 2 veces el tamaño de una célula metaplásica normal.
- Cambios reparativos con cierto apilamiento de los núcleos e irregularidades de la cromatina.
- En células atróficas, con núcleo 2 veces mas grande de lo normal, con cierta hipercromasia, o irregularidad del contorno y "células en renacuajo"

➤ **LSIL**

- Células escamosas maduras con grandes núcleos, 4-6 veces el tamaño de los núcleos de células intermedias normales.
- Hiperchromatismo
- Membranas nucleares irregulares y frecuente binucleación.
- Cromatina típicamente granular fina y uniformemente distribuida. Los nucleolos son raros.
- Las células son generalmente aisladas pero pueden verse en grupos.
- Alternativamente las células pueden mostrar cambios claros asociados con infección por VPH, el llamado efecto citopático del VPH. El marco de este cambio es el halo perinuclear citoplasmático (coilocitosis). Un coilocito diagnóstico tiene un halo perinuclear claro ópticamente bien definido, con un ribete periférico de citoplasma denso y al menos algún grado de anormalidad nuclear. Los cambios nucleares vistos pueden consistir en agrandamiento nuclear, membrana nuclear arrugada, hiperchromasia, bi y multinucleación y cambios degenerativos como cromatina “manchada” (smudging) o picnosis resultando en cambios a menudo descritos como “en pasa”.

➤ **HSIL**

- Células con citoplasma inmaduro, núcleos de características anormales y aumento de la relación núcleo-citoplasma.
- Las células se presentan aisladamente o en grupos o incluso en agregados sincitiales.
- Los núcleos de las células de HSIL son a menudo más pequeños que los de LSIL. El tamaño nuclear de las células de HSIL es de 2 a 5 veces el del núcleo de una célula intermedia.
- Hiperchromatismo con cromatina granular gruesa

- Membranas nucleares con aspecto arrugado y hay anisonucleosis.
- Estrecho ribete citoplasmático alrededor del núcleo hiper cromático.
- La displasia queratinizante es una variante de HSIL. A diferencia de las células inmaduras del clásico HSIL, en esta variante hay células con citoplasma queratinizado hiper maduro y a menudo forma de renacuajo.

➤ **ASC-H**

- Cambios en células escamosas de metaplasia inmadura o en células de reserva que aparecen dentro de un espectro que va desde los cambios celulares benignos a un auténtico HSIL.
- Citoplasma inmaduro y núcleo más grande que las células metaplásicas normales.
- Aumento de la relación núcleo-citoplasma con anisonucleosis, irregularidad de la membrana nuclear y leve hiper cromatismo, pero con cambios insuficientes para un diagnóstico de HSIL.
- Otra variante de ASC-H son grupos celulares con características tanto reparativas como de auténtica anormalidad epitelial, que incluso pueden sugerir carcinoma. Estas células en cuestión son típicamente células escamosas inmaduras o células glandulares con nucleolo prominente y pueden representar cambios benignos reparativos o procesos reparativos atípicos que incluyen el carcinoma invasivo como diagnóstico diferencial por lo que deben ser incluidas en la categoría de ASC-H para adecuado seguimiento clínico

➤ **AGUS**

Las células glandulares presentan atipia nuclear que excede los cambios reactivos o reparativos, pero carece de características certeras de adenocarcinoma endocervical in situ o adenocarcinoma invasor

➤ **AIS**

- Núcleos aglomerados y superpuestos.
- Los grupos de células tienen empalizada nuclear y aspecto “desfleado”
- Núcleos agrandados y estratificados
- Hiperchromasia nuclear con cromatina en grumos de distribución uniforme
- Frecuentes mitosis y cuerpos apoptóticos
- Cantidad de citoplasma y mucina menor que en las células normales
- Ausencia de diátesis tumoral y detritus inflamatorios

ANEXO 4: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ESTUDIO:

“VPH y otros factores determinantes en el seguimiento post-conización por displasia intraepitelial cervical de alto grado”

- La infección por VPH (Virus del papiloma humano) es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes. La presencia de infección por VPH no significa que sea reciente: el virus pudo haber sido adquirido varios meses o años antes. El papiloma virus infecta en algún momento de su vida hasta el 80% de las mujeres sexualmente activas.
- La mayoría de las mujeres que se infectan con el virus se curarán espontáneamente, es decir, sin necesidad de someterse a tratamiento, en el transcurso de un año.
- El factor de riesgo más importante para el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cérvico-uterino es la infección persistente por VPH, aunque no todas las infecciones crónicas derivan en cáncer.
- Las mujeres con infección por VPH que no tienen alterada la citología (también llamada prueba de Papanicolaou que identifica anomalías en las células del cervix) no requieren tratamiento.

- Las lesiones precursoras avanzadas de cáncer de cuello uterino (o displasia intraepitelial cervical de alto grado) son las que deben ser tratadas. El manejo médico estándar es la conización.
- En la Unidad de Patología Cervical del HUCA se realizan controles de seguimiento cada 6 meses después de haberse practicado una conización, consistentes en citología, cultivo del VPH y biopsia cervical guiada por colposcopia si precisa.
- El presente estudio se plantea con el objetivo de analizar estadísticamente la probabilidad de presentar de nuevo anomalías en la citología en función de que exista o no una nueva infección por el VPH.
- También se pretende estudiar la relación existente entre otros factores y la posibilidad de presentar de nuevo anomalías en la citología. Algunos de estos factores son la edad, número de hijos, método anticonceptivo, antecedentes de otras enfermedades de transmisión sexual, edad de inicio de relaciones sexuales, tabaquismo...
- Como estos controles son los que habitualmente se realizan en la Unidad de Patología Cervical del HUCA, el estudio no le supondrá a usted visitas extraordinarias a la consulta ni ninguna otra molestia. Únicamente le solicitamos su consentimiento para poder utilizar sus datos clínicos en el estudio, aunque, por supuesto, sus datos personales serán respetados.

Yo, (nombre y apellidos del paciente):

.....
.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He sido informado por (nombre y apellidos del investigador):

Dra. Yolanda Ruano Rodríguez

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º cuando quiera

2º sin tener que dar explicaciones

3º sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha

Firma del participante

Firma e identificación del investigador

ANEXO 5: Valoración del Comité de Ética



SERVICIO DE SALUD
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS

Comité Ético de Investigación Clínica
Regional del Principado de Asturias
C/ Celestino Villamil s/n
33006.-Oviedo
Tfno: 985.10.79.27/985.10.80.28
Fax: 985.10.87.11
e-mail: ceicr_asturias@hca.es

Área Sanitaria

Oviedo, 18 de octubre de 2010

El Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias, ha evaluado el Estudio nº 50/ 10, titulado: "VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) Y OTROS FACTORES DETERMINANTES EN EL SEGUIMIENTO POST-CONIZACIÓN POR DISPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRADO (HSL). Investigadora Principal: Dra. Yolanda Ruano Rodríguez del Servicio de Ginecología y Obstetricia del HUCA.

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado estudio reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y, en consecuencia, emite su autorización.

Le recuerdo que deberá guardar la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este estudio.

Le saluda atentamente.

Edo: Eduardo Arnáez Moral
Secretario del Comité Ético de Investigación
Clínica Regional del Principado de Asturias



8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) World Health Organization. Comprehensive Cervical Cancer Control: A guide to essential practice. Geneva, Switzerland: WHO; 2006.
- (2) International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. [Internet]. Globocan ; 2008. www.globocan.iarc.fr
- (3) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.
- (4) International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Cancer incidence in five continents, Vol IX. Lyon: IARC Scientific Publications No.160, 2007.
- (5) Puig-Tintoré LM, Cortés J, Castellsagué X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S et al. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol* 2006; 49 Supl 2:S5-S62.
- (6) Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197(4):340-345.
- (7) Bray F, Carstensen B, Moller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(9):2191-2199.
- (8) Baalbergen A, Ewing-Graham PC, Hop WC, Struijk P, Helmerhorst TJ. Prognostic factors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1):262-267.
- (9) Pak SC, Martens M, Bekkers R, Crandon AJ, Land R, Nicklin JL et al. Pap smear screening history of women with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2007; 47(6):504-507.
- (10) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4):244-265.
- (11) Syrjänen K, Hakama M, Saarikoski S, Vayrynen M, Yliskoski M, Syrjänen S et al. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of

- cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis* 1990; 17(1):15-19.
- (12) Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 1998; 132(2):277-284.
 - (13) Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000; 151(12):1158-1171.
 - (14) Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):14-19.
 - (15) Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(3):252-258.
 - (16) Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327(18):1272-1278.
 - (17) Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-428.
 - (18) Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001; 285(23):2995-3002.
 - (19) Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12(2):186-192.
 - (20) Lee SS, Collins RJ, Pun TC, Cheng DK, Ngan HY. Conservative treatment of low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 60(1):35-40.
 - (21) Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001; 358(9295):1782-1783.

- (22) Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(1):46-52.
- (23) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1072-1079.
- (24) Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3:S42-S51.
- (25) Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92(5):891-894.
- (26) Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004; 92(3):873-880.
- (27) Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):35-40.
- (28) Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P et al. Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *Am J Epidemiol* 2009; 169(4):480-488.
- (29) Castellsagué X, Muñoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):20-28.
- (30) La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Fasoli M, Gentile A, Tognoni G. Cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol* 1986; 123(1):22-29.
- (31) Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use

- as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* 2000; 82(7):1332-1338.
- (32) Winkelstein WJr. Smoking and genital cancer-current status: a review. *Am J Epidemiol* 1990; 131(6):945-957.
- (33) Luesley D, Blomfield P, Dunn J, Shafi M, Chenoy R, Buxton J. Cigarette smoking and histological outcome in women with mildly dyskaryotic cervical smears. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101(1):49-52.
- (34) Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ et al. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet* 1996; 347(9006):941-943.
- (35) Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312):1085-1092.
- (36) Thomas DB, Ray RM, Qin Q, WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. Risk factors for progression of squamous cell cervical carcinoma in-situ to invasive cervical cancer: results of a multinational study. *Cancer Causes Control* 2002; 13(7):683-690.
- (37) Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312):1093-1101.
- (38) Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, de Britton RC, Gaitan E et al. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 1989; 130(3):486-496.
- (39) Ozsaran AA, Ates T, Dikmen Y, Zeytinoglu A, Terek C, Erhan Y et al. Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999; 20(2):127-130.
- (40) Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283(8):1031-1037.

- (41) De Sanjosé S, Palefsky J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res* 2002; 89(2):201-211.
- (42) Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol* 2002; 55(1):19-24.
- (43) Galceran J, Marcos-Gragera R, Soler M, Romaguera A, Ameijide A, Izquierdo A et al. Cancer incidence in AIDS patients in Catalonia, Spain. *Eur J Cancer* 2007; 43(6):1085-1091.
- (44) Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hansson BG et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 2005; 116(1):110-115.
- (45) Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(21):1604-1613.
- (46) Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morre SA, Ronderos M, Franceschi S et al. Prevalence and determinants of Chlamydia trachomatis infections in women from Bogota, Colombia. *Sex Transm Infect* 2003; 79(6):474-478.
- (47) Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D et al. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol* 2005; 162(7):668-675.
- (48) Cortés J, Martín-Torres F, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol* 2010; 53 Supl 1:S1-S19.
- (49) Hall JE, Walton L. Dysplasia of the cervix: a prospective study of 206 cases. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 100(5):662-671.
- (50) Castellsagué X. Perspectiva de la prevención del cáncer de cérvix. En: Puig-Tintoré LM. II Jornada Prevención del cáncer cervical en el año 2009. Actualización en vacunas VPH y situación en España. Madrid: Wolters Kluwer Pharma Solutions España, S.A.; 2009. 3-10.

- (51) Paraskevaïdis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(2):205-211.
- (52) Vidart JA, Cristóbal I, Coronado P, García FJ, Ramírez M. Tratamiento y seguimiento de las lesiones producidas por el virus del papiloma humano. *Folia Clin Obstet Ginecol* 2007;(62):49-56.
- (53) Martin-Hirsch PP, Paraskevaïdis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(6):CD001318.
- (54) Soutter WP, de Barros LA, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaïdis E et al. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 1997; 349(9057):978-980.
- (55) Kalliala I, Anttila A, Pukkala E, Nieminen P. Risk of cervical and other cancers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: retrospective cohort study. *BMJ* 2005; 331(7526):1183-1185.
- (56) Strander B, Andersson-Ellstrom A, Milsom I, Sparen P. Long term risk of invasive cancer after treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 3: population based cohort study. *BMJ* 2007; 335(7629):1077.
- (57) Melnikow J, McGahan C, Sawaya GF, Ehlen T, Coldman A. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(10):721-728.
- (58) Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Cook E, Whittaker L, Rhodes-Morris H, Silva E. A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* 1998; 92(5):737-744.
- (59) Alvarez RD, Helm CW, Edwards RP, Naumann RW, Partridge EE, Shingleton HM et al. Prospective randomized trial of LLETZ versus laser ablation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1994; 52(2):175-179.

- (60) Nuovo J, Melnikow J, Willan AR, Chan BK. Treatment outcomes for squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 68(1):25-33.
- (61) Ribaldone R, Boldorini R, Capuano A, Arrigoni S, Di Oto A, Surico N. Role of HPV testing in the follow-up of women treated for cervical dysplasia. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282(2):193-197.
- (62) Jeong NH, Lee NW, Kim HJ, Kim T, Lee KW. High-risk human papillomavirus testing for monitoring patients treated for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35(4):706-711.
- (63) Kim YT, Lee JM, Hur SY, Cho CH, Kim YT, Kim SC et al. Clearance of human papillomavirus infection after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2010; 126(8):1903-1909.
- (64) Brismar S, Johansson B, Borjesson M, Arbyn M, Andersson S. Follow-up after treatment of cervical intraepithelial neoplasia by human papillomavirus genotyping. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(1):17-18.
- (65) Park JY, Bae J, Lim MC, Lim SY, Lee DO, Kang S et al. Role of high risk-human papillomavirus test in the follow-up of patients who underwent conization of the cervix for cervical intraepithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol* 2009; 20(2):86-90.
- (66) Fuste P, Bellosillo B, Santamaria X, Mancebo G, Marinoso L, Alameda F et al. HPV determination in the control after LEEP due to CIN II-III: prospective study and predictive model. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28(2):120-126.
- (67) Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, Marchetti I, Di Cristofano C, Di Coscio G et al. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18(1):90-94.
- (68) Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol* 2008; 108(3):549-554.

-
- (69) Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17(6):1271-1277.
- (70) Alonso I, Torne A, Puig-Tintore LM, Esteve R, Quinto L, Campo E et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006; 103(2):631-636.
- (71) Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen M et al. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. *BJOG* 2006; 113(11):1303-1307.
- (72) Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(5):908-914.
- (73) Nagai N, Mukai K, Oshita T, Shiroyama Y, Ohama K. Human papillomavirus DNA status after loop excision for cervical intraepithelial neoplasia grade III - A prospective study. *Int J Mol Med* 2004; 13(4):589-593.
- (74) Brockmeyer AD, Wright JD, Gao F, Powell MA. Persistent and recurrent cervical dysplasia after loop electrosurgical excision procedure. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(5):1379-1381.
- (75) Houfflin Debarge V, Collinet P, Vinatier D, Ego A, Dewilde A, Boman F et al. Value of human papillomavirus testing after conization by loop electrosurgical excision for high-grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol* 2003; 90(3):587-592.
- (76) Costa S, De Nuzzo M, Infante FE, Bonavita B, Marinelli M, Rubino A et al. Disease persistence in patients with cervical intraepithelial neoplasia undergoing electrosurgical conization. *Gynecol Oncol* 2002; 85(1):119-124.
- (77) Bekkers RL, Melchers WJ, Bakkers JM, Hanselaar AG, Quint WG, Boonstra H et al. The role of genotype-specific human papillomavirus

- detection in diagnosing residual cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2002; 102(2):148-151.
- (78) Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001; 84(6):796-801.
- (79) González DI, Jr., Zahn CM, Retzloff MG, Moore WF, Kost ER, Snyder RR. Recurrence of dysplasia after loop electrosurgical excision procedures with long-term follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(3):315-321.
- (80) Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol* 2000; 79(2):294-299.
- (81) Paraskevaidis E, Lolis ED, Koliopoulos G, Alamanos Y, Fotiou S, Kitchener HC. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after large loop excision with clear margins. *Obstet Gynecol* 2000; 95(6 Pt 1):828-831.
- (82) Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J, Mol BW, ten Kate FW, ter Schegget J et al. Prediction of recurrent and residual cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology. *Gynecol Oncol* 1999; 72(2):199-201.
- (83) Distefano AL, Picconi MA, Alonio LV, Dalbert D, Mural J, Bartt O et al. Persistence of human papillomavirus DNA in cervical lesions after treatment with diathermic large loop excision. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998; 6(5):214-219.
- (84) Nuovo G, Moritz J, Kowalik A, Chalas E, Kaplan B, Mann W. Human papillomavirus types and cervical squamous intraepithelial lesions that recur after cold-knife conization. *Gynecol Oncol* 1992; 46(3):304-308.
- (85) Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjanen KJ. HPV DNA test and Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical excision procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2004; 94(1):181-186.

- (86) Johnson N, Khalili M, Hirschowitz L, Ralli F, Porter R. Predicting residual disease after excision of cervical dysplasia. *BJOG* 2003; 110(10):952-955.
- (87) Lopes A, Morgan P, Murdoch J, Piura B, Monaghan JM. The case for conservative management of "incomplete excision" of CIN after laser conization. *Gynecol Oncol* 1993; 49(2):247-249.
- (88) Milojkovic M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76(1):49-53.
- (89) Cecchini S, Carozzi F, Confortini M, Zappa M, Ciatto S. Persistent human papillomavirus infection as an indicator of risk of recurrence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by the loop electrosurgical excision procedure. *Tumori* 2004; 90(2):225-228.
- (90) Leguevaque P, Motton S, Decharme A, Soule-Tholy M, Escourrou G, Hoff J. Predictors of recurrence in high-grade cervical lesions and a plan of management. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36(11):1073-1079.
- (91) Riethmuller D, Gabelle C, Ramanah R, Sautiere JL, Pretet JL, Schaal JP et al. Intérêt de la recherche du papillomavirus humain (HPV) dans le suivi post-conisation des CIN2-3. À propos de 386 cas. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2008; 37(4):329-337.
- (92) Ryu A, Nam K, Chung S, Kim J, Lee H, Koh E et al. Absence of dysplasia in the excised cervix by a loop electrosurgical excision procedure in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol* 2010; 21(2):87-92.
- (93) Dogan NU, Salman MC, Yuce K. The role of HPV DNA testing in the follow-up of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283(4):871-877.
- (94) Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, Louwers JA, Nobbenhuis MA, Bais AG et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol* 2011; 12(5):441-450.
- (95) Ding Z, Jiang C, Shore T, Pather S, Dalrymple C, Atkinson K et al. Outcome of cervical intraepithelial neoplasia 2 diagnosed by punch biopsy in 131 women. *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37(7):754-761.

- (96) Kreimer AR, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Gonzalez P, Burk RD et al. Long-term risk of recurrent cervical human papillomavirus infection and precancer and cancer following excisional treatment. *Int J Cancer* 2012; 131(1):211-218.
- (97) Heymans J, Benoy IH, Poppe W, Depuydt CE. Type-specific HPV geno-typing improves detection of recurrent high-grade cervical neoplasia after conisation. *Int J Cancer* 2011; 129(4):903-909.
- (98) Hermann A, Gómez J. Presentación tardía de carcinoma vaginal postneoplasia intraepitelial cervical III. *Prog Obstet Ginecol* 2002; 45(3):112-3.
- (99) Paraskevaïdis E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N et al. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24(6):541-543.
- (100) Baloglu A, Uysal D, Bezircioglu I, Bicer M, Inci A. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade cervical intraepithelial lesions. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282(1):69-73.
- (101) Fallani MG, Penna C, Marchionni M, Bussani C, Pieralli A, Andersson KL et al. Prognostic significance of high-risk HPV persistence after laser CO2 conization for high-grade CIN: a prospective clinical study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008; 29(4):378-382.
- (102) Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, Leo E, Costa S, Musiani M et al. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. *J Med Virol* 2008; 80(8):1434-1440.
- (103) Gök M, Coupe VM, Berkhof J, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Hogewoning CJ et al. HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. *Gynecol Oncol* 2007; 104(2):273-275.
- (104) Sarian LO, Derchain SF, Pittal DR, Andrade LA, Morais SS, Figueiredo PG. Human papillomavirus detection by hybrid capture II and residual or recurrent high-grade squamous cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *Tumori* 2005; 91(2):188-192.

- (105) Hernádi Z, Szoke K, Sapy T, Krasznai ZT, Soos G, Veress G et al. Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 118(2):229-234.
- (106) Fen J, Yoshinouchi M, Nakamura K, Kodama J, Nasu Y, Yamato K et al. Eradication of HPV post-surgical treatments, its correlation with specific types, types of surgery and the physical status. *Oncol Rep* 2004; 12(2):375-379.
- (107) Chao A, Lin CT, Hsueh S, Chou HH, Chang TC, Chen MY et al. Usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190(4):1046-1051.
- (108) Bar-Am A, Gamzu R, Levin I, Fainaru O, Niv J, Almog B. Follow-up by combined cytology and human papillomavirus testing for patients post-cone biopsy: results of a long-term follow-up. *Gynecol Oncol* 2003; 91(1):149-153.
- (109) Acladios NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M, Kitchener H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer* 2002; 98(3):435-439.
- (110) Cruickshank ME, Sharp L, Chambers G, Smart L, Murray G. Persistent infection with human papillomavirus following the successful treatment of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG* 2002; 109(5):579-581.
- (111) Bodner K, Bodner-Adler B, Wierrani F, Kimberger O, Denk C, Grunberger W. Is therapeutic conization sufficient to eliminate a high-risk HPV infection of the uterine cervix? A clinicopathological analysis. *Anticancer Res* 2002; 22(6B):3733-3736.
- (112) Paraskevaidis E, Koliopoulos G, Alamanos Y, Malamou-Mitsi V, Lolis ED, Kitchener HC. Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 2001; 98(5 Pt 1):833-836.
- (113) Chua KL, Hjerpe A. Human papillomavirus analysis as a prognostic marker following conization of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 1997; 66(1):108-113.

- (114) Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(18):1365-1371.
- (115) Aerssens A, Claeys P, Beerens E, Garcia A, Weyers S, Van Renterghem L et al. Prediction of recurrent disease by cytology and HPV testing after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Cytopathology* 2009; 20(1):27-35.
- (116) Mergui JL, Levêque J. Quel suivi après traitement chirurgical d'une lésion de haut grade du col utérin? *Gynecol Obstet Fertil* 2008; 36(4):441-447.
- (117) Kitchener HC, Walker PG, Nelson L, Hadwin R, Patnick J, Anthony GB et al. HPV testing as an adjunct to cytology in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG* 2008; 115(8):1001-1007.
- (118) Gallwas J, Ditsch N, Hillemanns P, Friese K, Thaler C, Dannecker C. The significance of HPV in the follow-up period after treatment for CIN. *Eur J Gynaecol Oncol* 2010; 31(1):27-30.
- (119) Kocken M, Uijterwaal MH, de Vries AL, Berkhof J, Ket JC, Helmerhorst TJ et al. High-risk human papillomavirus testing versus cytology in predicting post-treatment disease in women treated for high-grade cervical disease: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2012; 125(2):500-507.
- (120) Sarian LO, Derchain SF, Pitta DR, Morais SS, Rabelo-Santos SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *J Clin Virol* 2004; 31(4):270-274.
- (121) Negri G, Gampenrieder J, Vigl EE, Haitel A, Menia E, Mian C. Human papilloma virus typing at large loop excision of the transformation zone of the cervix uteri. *Anticancer Res* 2003; 23(5b):4289-4292.
- (122) Costa S, De Simone P, Venturoli S, Cricca M, Zerbini ML, Musiani M et al. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. *Gynecol Oncol* 2003; 90(2):358-365.

- (123) Ewies AA, Sant Cassia LJ. A review of the treatment failures following cervical intraepithelial neoplasia grade III treated by large loop excision of the transformation zone. *J Obstet Gynaecol* 2000; 20(4):399-402.
- (124) Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden, Mol BW, Boer K, ten Kate FJ et al. Clearance of cervical human papillomavirus infection by treatment for cervical dysplasia. *Sex Transm Dis* 1997; 24(8):456-460.
- (125) Gardeil F, Barry-Walsh C, Prendiville W, Clinch J, Turner MJ. Persistent intraepithelial neoplasia after excision for cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Obstet Gynecol* 1997; 89(3):419-422.
- (126) Jansen FW, Trimbos JB, Hermans J, Fleuren GJ. Persistent cervical intraepithelial neoplasia after incomplete conization: predictive value of clinical and histological parameters. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 37(4):270-274.
- (127) Paterson-Brown S, Chappatte OA, Clark SK, Wright A, Maxwell P, Taub NA et al. The significance of cone biopsy resection margins. *Gynecol Oncol* 1992; 46(2):182-185.
- (128) Mohamed-Noor K, Quinn MA, Tan J. Outcomes after cervical cold knife conization with complete and incomplete excision of abnormal epithelium: a review of 699 cases. *Gynecol Oncol* 1997; 67(1):34-38.
- (129) Murta EF, Resende AV, Souza MA, Adad SJ, Salum R. Importance of surgical margins in conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Arch Gynecol Obstet* 1999; 263(1-2):42-44.
- (130) Huang M, Anderson P. Positive margins after cervical conization as an indicator of residual dysplasia. *Prim Care Update Ob Gyns* 1998; 5(4):160-161.
- (131) Ostojic DV, Vrdoljak-Mozetic D, Stemberger-Papic S, FINDERLE A, Eminovic S. Cervical cytology and HPV test in follow-up after conisation or LLETZ. *Coll Antropol* 2010; 34(1):219-224.
- (132) Murdoch JB, Morgan PR, Lopes A, Monaghan JM. Histological incomplete excision of CIN after large loop excision of the transformation zone (LLETZ) merits careful follow up, not retreatment. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99(12):990-993.

- (133) Wu D, Zheng Y, Chen W, Guo C, Yu J, Chen G et al. Prediction of residual/recurrent disease by HPV genotype after loop excision procedure for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with negative margins. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011; 51(2):114-118.
- (134) Skjeldestad FE, Hagen B, Lie AK, Isaksen C. Residual and recurrent disease after laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1997; 90(3):428-433.
- (135) Baldauf JJ, Dreyfus M, Ritter J, Cuenin C, Tissier I, Meyer P. Cytology and colposcopy after loop electrosurgical excision: implications for follow-up. *Obstet Gynecol* 1998; 92(1):124-130.
- (136) Ghaem-Maghani S, Sagi S, Majeed G, Soutter WP. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia and risk of treatment failure: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007; 8(11):985-993.
- (137) Flannelly G, Langan H, Jandial L, Mana E, Campbell M, Kitchener H. A study of treatment failures following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104(6):718-722.
- (138) Skinner EN, Gehrig PA, Van Le L. High-grade squamous intraepithelial lesions: abbreviating posttreatment surveillance. *Obstet Gynecol* 2004; 103(3):488-492.
- (139) Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan JM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG* 2001; 108(10):1025-1030.
- (140) Dietrich CS, III, Yancey MK, Miyazawa K, Williams DL, Farley J. Risk factors for early cytologic abnormalities after loop electrosurgical excision procedure. *Obstet Gynecol* 2002; 99(2):188-192.
- (141) Comino R, Cararach M, Puig-Tintoré LM, Cortés J, Torné A, Dexeus S et al. Prevención del cáncer de cérvix uterino. En: *Documentos de consenso SEGO 2006*. Madrid: Meditex-Saned; 2007.123-178.
- (142) Nam K, Chung S, Kim J, Jeon S, Bae D. Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *J Gynecol Oncol* 2009; 20(2):91-95.
- (143) Frega A, Scardamaglia P, Piazzè J, Cerekja A, Pacchiarotti A, Verrico M et al. Oral contraceptives and clinical recurrence of human

- papillomavirus lesions and cervical intraepithelial neoplasia following treatment. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 100(2):175-178.
- (144) Lin H, Chang HY, Huang CC, Changchien CC. Prediction of disease persistence after conization for microinvasive cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(2):311-316.
- (145) Coronado PJ, Fasero M, Ramírez M, Arab C, Bellón M, García J et al. La inmunosupresión es un factor mayor de riesgo en la recidiva de las lesiones del tracto genital inferior asociadas al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol* 2010; 53(5):179-188.
- (146) Alba A. Técnicas de detección de VPH. Nuevas tecnologías. En: XVI Reunión de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia. Alicante 2004. Libro de ponencias. Madrid: AEPC; 2004.64-67.
- (147) Söderlund-Strand A, Rymark P, Andersson P, Dillner J, Dillner L. Comparison between the Hybrid Capture II test and a PCR-based human papillomavirus detection method for diagnosis and posttreatment follow-up of cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3260-3266.
- (148) Kulmala SM, Syrjänen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Podistov J et al. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6):2470-2475.
- (149) Zielinski GD, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Berkhof J, Snijders PJ, Risse EJ et al. HPV testing can reduce the number of follow-up visits in women treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Gynecol Oncol* 2003; 91(1):67-73.
- (150) Kucera E, Sliutz G, Czerwenka K, Breitenecker G, Leodolter S, Reinthaller A. Is high-risk human papillomavirus infection associated with cervical intraepithelial neoplasia eliminated after conization by large-loop excision of the transformation zone? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 100(1):72-76.
- (151) Kjellberg L, Wadell G, Bergman F, Isaksson M, Angstrom T, Dillner J. Regular disappearance of the human papillomavirus genome after conization of cervical dysplasia by carbon dioxide laser. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(5):1238-1242.

- (152) Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden, Mol BW, Lammes FB, ten Kate FW et al. Human papillomavirus DNA after treatment of cervical dysplasia: low prevalence in normal cytologic smears. *Cancer* 1996; 77(12):2538-2543.
- (153) Aerssens A, Claeys P, Garcia A, Sturtewagen Y, Velasquez R, Vanden Broeck D et al. Natural history and clearance of HPV after treatment of precancerous cervical lesions. *Histopathology* 2008; 52(3):381-386.
- (154) Moore EE, Danielewski JA, Garland SM, Tan J, Quinn MA, Stevens MP et al. Clearance of human papillomavirus in women treated for cervical dysplasia. *Obstet Gynecol* 2011; 117(1):101-108.
- (155) Kreimer AR, Katki HA, Schiffman M, Wheeler CM, Castle PE. Viral determinants of human papillomavirus persistence following loop electrical excision procedure treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(1):11-16.
- (156) Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Bratti MC et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(2):324-327.
- (157) Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 1:S16-S22.
- (158) Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(6):485-490.
- (159) Jain S, Tseng CJ, Horng SG, Soong YK, Pao CC. Negative predictive value of human papillomavirus test following conization of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 2001; 82(1):177-180.
- (160) Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59(7):543-553.

- (161) Maclean AB. Healing of cervical epithelium after laser treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1984; 91(7):697-706.
- (162) Chan BK, Melnikow J, Slee CA, Arellanes R, Sawaya GF. Posttreatment human papillomavirus testing for recurrent cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(4):422-429.
- (163) Arbyn M, Paraskeva E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005; 99(3 Suppl 1):S7-S11.
- (164) Lin CT, Tseng CJ, Lai CH, Hsueh S, Huang KG, Huang HJ et al. Value of human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing after conization in the prediction of residual disease in the subsequent hysterectomy specimen. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(5):940-945.
- (165) Rozendaal L, Walboomers JM, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJ et al. PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytologically normal cervical smears. *Int J Cancer* 1996; 68(6):766-769.
- (166) Hellsten C, Sjöström K, Lindqvist PG. A 2-year follow-up study of anxiety and depression in women referred for colposcopy after an abnormal cervical smear. *BJOG* 2008; 115(2):212-218.
- (167) Maissi E, Marteau TM, Hankins M, Moss S, Legood R, Gray A. The psychological impact of human papillomavirus testing in women with borderline or mildly dyskaryotic cervical smear test results: 6-month follow-up. *Br J Cancer* 2005; 92(6):990-994.
- (168) Chew GK, Jandial L, Paraskeva E, Kitchener HC. Pattern of CIN recurrence following laser ablation treatment: long-term follow-up. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9(6):487-490.
- (169) Strander B, Ryd W, Wallin KL, Warleby B, Zheng B, Milsom I et al. Does HPV-status 6-12 months after treatment of high grade dysplasia in the uterine cervix predict long term recurrence? *Eur J Cancer* 2007; 43(12):1849-1855.

- (170) Elfgren K, Jacobs M, Walboomers JM, Meijer CJ, Dillner J. Rate of human papillomavirus clearance after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 2002; 100(5 Pt 1):965-971.
- (171) Aschkenazi-Steinberg SO, Spitzer BJ, Spitzer M, Lesser M. The clinical usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of women after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis* 2004; 8(4):304-307.
- (172) Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis* 2003; 7(3):154-167.
- (173) ACOG Practice Bulletin no. 109: Cervical cytology screening. *Obstet Gynecol* 2009; 114(6):1409-1420.
- (174) Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekoussis T, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W et al. The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: the Cochrane colposcopy & cervical cytopathology collaborative group approach. *Cancer Treat Rev* 2006; 32(7):516-523.
- (175) Mateos ML, Chacón J, Rodríguez-Domínguez M, Sanz I, Rubio MD. Evaluación de un sistema de PCR a tiempo real (cobas 4800) para la detección separada de los genotipos 16 y 18 y otros genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano en la prevención del cáncer cervical. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(6):411-414.
- (176) Lyall H, Duncan ID. Inaccuracy of cytologic diagnosis in high grade squamous intraepithelial lesions (CIN 3). *Acta Cytol* 1995; 39(1):50-54.
- (177) Zuna RE, Sienko A, Lightfoot S, Gaiser M. Cervical smear interpretations in women with a histologic diagnosis of severe dysplasia: factors associated with discrepant interpretations. *Cancer* 2002; 96(4):218-224.
- (178) Songveeratham S, Kietpeerakool C, Khunamornpong S, Sribanditmongkol N, Srisomboon J. Preceding cervical cytology in women with high-grade squamous intraepithelial lesion. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283(6):1381-1384.

- (179) Barton SE, Jenkins D, Hollingworth A, Cuzick J, Singer A. An explanation for the problem of false-negative cervical smears. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96(4):482-485.
- (180) Howell S, Theodor M, Pacey NF, Patwardhan JR, Ayer B. Quality assurance in cytology. Rescreening of previously negative smears from high grade squamous intraepithelial lesions. *Acta Cytol* 1997; 41(4):1085-1090.
- (181) Brabin L. Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression. *AIDS Patient Care STDs* 2002; 16(5):211-221.
- (182) Piper JM. Oral contraceptives and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1985; 22(1):1-14.
- (183) Swan SH, Petitti DB. A review of problems of bias and confounding in epidemiologic studies of cervical neoplasia and oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1982; 115(1):10-18.
- (184) Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13(2):103-110.
- (185) Bertram CC. Evidence for practice: oral contraception and risk of cervical cancer. *J Am Acad Nurse Pract* 2004; 16(10):455-461.
- (186) Cornelissen MT, van den Tweel JG, Struyk AP, Jebbink MF, Briet M, van der Noordaa J et al. Localization of human papillomavirus type 16 DNA using the polymerase chain reaction in the cervix uteri of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 1989; 70(10):2555-2562.
- (187) Syrjänen K, Syrjänen S. Concept of the existence of human papillomavirus (HPV) DNA in histologically normal squamous epithelium of the genital tract should be re-evaluated. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989; 68(7):613-617.
- (188) Elfgren K, Bistoletti P, Dillner L, Walboomers JM, Meijer CJ, Dillner J. Conization for cervical intraepithelial neoplasia is followed by disappearance of human papillomavirus deoxyribonucleic acid and a decline in serum and cervical mucus antibodies against human papillomavirus antigens. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(3):937-942.

- (189) White CD, Cooper WL, Williams RR. Cervical intraepithelial neoplasia extending to the margins of resection in conization of the cervix. *J Reprod Med* 1991; 36(9):635-638.
- (190) Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354(9172):20-25.
- (191) Van Hentenryck M, Noel JC, Simon P. Obstetric and neonatal outcome after surgical treatment of cervical dysplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 162(1):16-20.
- (192) Bruinsma FJ, Quinn MA. The risk of preterm birth following treatment for precancerous changes in the cervix: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2011; 118(9):1031-1041.
- (193) Macnab JC, Walkinshaw SA, Cordiner JW, Clements JB. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N Engl J Med* 1986; 315(17):1052-1058.
- (194) Tate JE, Resnick M, Sheets EE, Crum CP. Absence of papillomavirus DNA in normal tissue adjacent to most cervical intraepithelial neoplasms. *Obstet Gynecol* 1996; 88(2):257-260.
- (195) Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A, Delvenne P. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by in situ hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1991; 139(4):847-854.
- (196) Nuovo GJ, Pedemonte BM. Human papillomavirus types and recurrent cervical warts. *JAMA* 1990; 263(9):1223-1226.
- (197) Smart OC, Sykes P, Macnab H, Jennings L. Testing for high risk human papilloma virus in the initial follow-up of women treated for high-grade squamous intraepithelial lesions. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010; 50(2):164-167.
- (198) Coupe VM, Berkhof J, Verheijen RH, Meijer CJ. Cost-effectiveness of human papillomavirus testing after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG* 2007; 114(4):416-424.
- (199) Bais AG, Eijkemans MJ, Rebolj M, Snijders PJ, Verheijen RH, van Ballegooijen M et al. Post-treatment CIN: randomised clinical trial

- using hrHPV testing for prediction of residual/recurrent disease. *Int J Cancer* 2009; 124(4):889-895.
- (200) Zuna RE, Moore W, Dunn ST. HPV DNA testing of the residual sample of liquid-based Pap test: utility as a quality assurance monitor. *Mod Pathol* 2001; 14(3):147-151.
- (201) Matthews-Greer J, Rivette D, Reyes R, Vanderloos CF, Turbat-Herrera EA. Human papillomavirus detection: verification with cervical cytology. *Clin Lab Sci* 2004; 17(1):8-11.
- (202) Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, van der Linden HC, Runsink AP et al. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer* 2001; 85(3):398-404.
- (203) Walboomers JM, Roda Husman AM, Snijders PJ, Stel HV, Risse EK, Helmerhorst TJ et al. Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. *J Clin Pathol* 1995; 48(8):728-732.
- (204) Izadi-Mood N, Sarmadi S, Sanii S. Quality control in cervicovaginal cytology by cytohistological correlation. *Cytopathology* 2011. [Internet]. www.onlinelibrary.wiley.com.
- (205) Joste NE, Crum CP, Cibas ES. Cytologic/histologic correlation for quality control in cervicovaginal cytology. Experience with 1,582 paired cases. *Am J Clin Pathol* 1995; 103(1):32-34.
- (206) Alameda F, Gimferrer E, Albert S, Romero E, Soler I, Ferrer MD et al. ASCUS y control citológico. *Rev Esp Patol* 2003; 36(1):65-70.
- (207) Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1983; 61(5):609-614.
- (208) Livasy CA, Moore DT, Van Le L. The clinical significance of a negative loop electrosurgical cone biopsy for high-grade dysplasia. *Obstet Gynecol* 2004; 104(2):250-254.
- (209) Li ZG, Qian dY, Cen JM, Chen GD, Shu YH. Three-step versus "see-and-treat" approach in women with high-grade squamous intraepithelial lesions in a low-resource country. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 106(3):202-205.